

Dicle Univ Vet Fak Derg

ISSN 1307-9972

e-ISSN: 1308-0679



YIL/YEAR: 2022

CİLT/VOLUME: 15

SAYI/ISSUE:1

DİCLE ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

Dicle University Journal of Faculty of Veterinary Medicine



Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Organıdır
Published by Dicle University Faculty of Veterinary Medicine



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



Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi



Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Adına Sahibi

Prof. Dr. Aydın VURAL

EDİTÖR GRUBU

Prof. Dr. Hasan İÇEN
Prof. Dr. Hüsnü Şahan GÜRAN
Doç. Dr. İbrahim KÜÇÜKASLAN
Doç. Dr. Simten YEŞİLMEN ALP
Doç. Dr. Hanifi DURAK
Doç. Dr. Tahir BAYRIL
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Şener YILDIZ
Dr. Öğr. Üyesi Nurdan KARACAN SEVER
Araş. Gör. Nahit SAYLAK

YAYIN KURULU

Prof. Dr. Fahrettin ALKAN, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Servet BADEMKIRAN, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ümüt CİRİT, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Serkan İKLİZ, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Abdullah KAYA, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. M. Aydın KETANİ, (Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Mehmet KILINÇ, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Narin LİMAN, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Berna GÜNEY SARUHAN, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Aydın VURAL, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Beran YOKUŞ, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Feray ALTAN, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Neval Berrin ARSERİM, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi

DANIŞMA KURULU

Prof. Dr. Abit AKTAŞ, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Yılmaz ARAL, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ali ARSLAN, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. M. Sedat BARAN, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Cengiz CEYLAN, Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Burhan ÇETİNKAYA, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ülker EREN, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Aydın GİRGIN, Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Abdurrahman GÜL, Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Hakkı KARA, Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Narin LİMAN, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Abdullah ÖZEN, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ayşe SERBEST, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Kazım ŞAHİN, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Tekin ŞAHİN, Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Nihat ŞINDAK, Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Muzaffer TAŞ, Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Necati TİMURKAN, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Emine ÜNSALDI, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Murat YILDIRIM, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. M. Osman ATLI, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Bülent ELİTOK, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Serkan ERDOĞAN, Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Zela KARAKOÇ, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Ersin UYSAL, Dicle Üniversitesi

İÇİNDEKİLER/CONTENTS

ARAŞTIRMA MAKALELERİ /RESEARCH ARTICLES

	Sayfa Page
1. A Survey on Prevalence of <i>Toxocara vitulorum</i> in Calves in Siirt <i>Burçak ASLAN ÇELİK, Özgür Yaşar ÇELİK, Adnan AYAN, Özge OKTAY AYAN</i>	1-4
2. Effect of Energy Deficiency at The End of Pregnancy on Sheep and Lamb Birth Weights <i>Mehmet Hanifi DURAK, Atila ATEŞ, Tanay BİLAL</i>	5-8
3. Diyarbakır Yöresinde İshalli Buzağılarda <i>Cryptosporidium spp.</i> Yaygınlığı ve Moleküler Karakterizasyonu <i>Duygu Neval SAYIN İPEK</i>	9-13
4. Dondurulmuş Deniz Ürünlerinde <i>Vibrio spp.</i> 'nin İlimiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon (Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP) Yöntemiyle Belirlenmesi <i>A. Ezgi TELLİ, Yusuf DOĞRUER, Nihat TELLİ, Yusuf BİÇER</i>	14-19
5. Farklı Kedi Irklarının Testislerinde Sitokeratin 8'in İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu <i>Uğur TOPALOĞLU, Zela KARAKOÇ, Mehmet Erdem AKBALIK, Berna SARUHAN, Nursin AYDIN</i>	20-24
6. Ovaryohistektomi Sırasında Monitörizasyon Parametrelerinin Köpeklerin Ağırlıklarına Göre Değerlendirilmesi <i>Serhan Serhat AY, Gülşah SARAL, Firdevs BİNLİ</i>	25-30
7. Yetiştirici Koşullarında Halep Keçisi Oğlaklarında Doğrusal ve Doğrusal Olmayan Yöntemlerle Büyümenin Tahmin Edilmesi <i>Halit Deniz ŞİRELİ, Mehmet ÇOLAK</i>	31-36
8. Some Slaughter and Carcass Traits of Simmental Cattle slaughtered in Kırıkkale Province <i>Aykut Asım AKBAŞ, Cansu ATEŞ</i>	37-40
9. <i>Blastocystis sp.</i> 'nin İnsanlara Bulaşında İnsanlarla Yakın İlişkili Hayvanların Rolü <i>Fatih ÇAKIR, Muttalip CİCEK, Hasan İÇEN, İbrahim YILDIRIM, Akın KOÇHAN</i>	41-44
10. Hematological Status in Septic or Non Septic Dogs due to Parvoviral Enteritis <i>Erdem GÜLERSOY, Amir NASERİ</i>	45-52

DERLEME/REVIEW

11. Antimikrobiyel Direnç: Küresel Bir Sorun <i>Murat GÜLMEZ</i>	53-58
12. Propolis ve Ruminantlarda Alternatif Yem Katkı Maddesi Olarak Kullanımı <i>Ali KABİLOĞLU, Neşe KOCABAĞLI</i>	59-64



A Survey on Prevalence of *Toxocara vitulorum* in Calves in Siirt

Burçak ASLAN ÇELİK^{1,a,✉}, Özgür Yaşar ÇELİK^{2,b}, Adnan AYAN^{3,c}, Özge OKTAY AYAN^{4,d}

¹Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Siirt University, Siirt, TÜRKİYE

²Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Siirt University, Siirt, TÜRKİYE

³Department of Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, Van Yuzuncu Yil University, Van, TÜRKİYE

⁴Department of Parasitology, Van Yuzuncu Yil University Faculty of Medicine, Van, TÜRKİYE

^aORCID: 0000-0002-0130-970X; ^bORCID: 0000-0001-6365-2688; ^cORCID: 0000-0002-6564-3416; ^dORCID: 0000-0003-2577-3774

Geliş Tarihi/Received
14.12.2021

Kabul Tarihi/Accepted
18.02.2022

Yayın Tarihi/Published
30.06.2022

Abstract

Toxocara genus has important risk for public health and is a concern for both human and veterinary medicine. *Toxocara vitulorum* is the largest nematode for cattle and infests the small intestines of water buffalo, bison, and cattle living in tropical and subtropical regions with humid climates. The objective of the present study is to investigate the prevalence of *T. vitulorum* in calves in Siirt province of Turkey. This study was carried out in the Siirt province, located in the Southeast Anatolian region. The animal material of the study consisted of a total of 100 calves of ages up to 6 months. Fecal samples were collected directly from the rectum using disposable latex gloves, after which they were placed in individual fecal containers. Samples brought to the laboratory were stored at +4°C until analysis. Fülleborne saturated saline flotation technique was applied to fecal samples. The samples were then evaluated under a light microscope. As a result of the study, a positivity rate of 7% (7/100) was detected in the samples examined for *T. vitulorum* by microscopic method. In conclusion, the prevalence of the *T. vitulorum* in Siirt province was revealed, and considering the losses caused by the infection, it was concluded that the disease should not be neglected. Farmers should be informed about the disease and appropriate treatment options for it.

Key Words: Calf, Siirt, *Toxocara vitulorum*, prevalence.

Siirt İli Buzağlarında *Toxocara vitulorum* Prevalansı Üzerine Bir Çalışma

Öz

Toxocara cinsi, beşerî ve veteriner halk sağlığı açısından önemli olan türleri içermektedir. Bunlardan *Toxocara vitulorum* sığırların en büyük nematodu olup, nemli iklime sahip, tropik ve subtropik bölgelerde, siğir, manda ve bizonların ince bağırsaklarında yaşamaktadır. Bu çalışmada, Siirt ilindeki buzağlarda *T. vitulorum* prevalansının araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma Güneydoğu Anadolu bölgesinde yer alan Siirt ilinde gerçekleştirildi. Araştırmanın hayvan materyalini 6 aylık yaşa kadar olan toplam 100 buzağı oluşturdu. Dışkı numuneleri tek kullanımlık lateks eldiven kullanılarak doğrudan rektumdan alınıp bireysel dışkı kaplarına konuldu. Laboratuvara getirilen dışkı örnekleri +4 °C'de saklandı. Dışkı örneklerine Fülleborne'un tuzlu su yüzdürme tekniği uygulandı. Daha sonra örnekler ışık mikroskobu altında incelendi ve örneklerin 7'sinde (%7) *T. vitulorum* yumurtası tespit edilmiştir. Bu çalışma ile *T. vitulorum*'un Siirt ilindeki prevalansı ortaya konulmuş olup, enfeksiyonun meydana getirdiği kayıplar göz önüne alındığında, hastalığın ihmal edilmemesi gerektiği, çiftçilerin hastalık ve uygun tedavi seçenekleri hakkında bilgilendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Buzağı, Siirt, *Toxocara vitulorum*, prevalans.

INTRODUCTION

Toxocara genus contains species like *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *Toxocara malaysiensis* and *Toxocara vitulorum*, all of which pose important risks for public health, and are a concern for both human and veterinary medicine (1, 2). Amongst these, *T. vitulorum* (Syn: *Neoscaris vitulorum*, Goeze, 1782, Travassos, 1927), is the largest nematode for cattle and infests the small intestines of water buffalo, bison, and cattle living in tropical and subtropical regions with humid climates (2-8).

Toxocara vitulorum is among the most destructive parasites of young ruminants like calves and buffalo calves,

which are the definitive hosts for this parasite (9). The disease is mostly seen in 1 to 3-month-old calves, and it is rarely seen in animals older than 6 months (3, 7, 8, 10). Transmission of the parasite to calves occurs in the prenatal period through the intrauterine path, and through milk in the postpartum period (3, 6, 8, 10, 11). The eggs can be observed in the feces of newborn infected animals as early as the 16th - 23rd days postpartum (7-10). Under suitable temperature, humidity, and oxygen conditions for the eggs, infective larvae can develop in less than three weeks (7). Eggs shed with feces include L₁ stage larvae that develop into L₃ larvae within 2-4 weeks. Eggs containing L₃ do not crack in the environmental until ingested. Larvae ingested by calves become

adults within 3-4 weeks, after which they also shed eggs through feces (9). Adult female *T. vitulorum* can produce thousands of eggs every day (7, 9).

Clinical signs appear 10-15 days after birth and can be observed for six months (7). Adult parasites can cause digestive system problems such as loss of appetite, weakness, diarrhoea, dehydration, constipation, greasy and foul-smelling stools, and death, especially in young animals. The air exhaled by clinically infected animals smells like garlic (butyric acid) (3, 8). Approximately 70-500 adult parasites are believed to be needed for clinical findings to occur (4).

The larval form of the *T. vitulorum* can cause focal lesions of the liver and lungs, inflammation of local lymph nodes, and eosinophilia throughout the parasite's life cycle (10). Human ingestion of infected eggs has been reported to cause visceral larva migrans in humans (7, 8, 10).

The objective of the present study is to investigate the prevalence of *T. vitulorum* in calves in Siirt province of Turkey.

MATERIAL AND METHODS

The Study Area

This study was carried out in the Siirt province (Merkez, Kurtalan, and Şirvan), located in the Southeast Anatolian region (Figure 1). Siirt province is in a semi-arid climate region. The average highest and lowest temperatures are between 37.1 °C and 19 °C in summer, and 8.8 °C and -0.5 °C in winter. Water shortages are common during the summer.

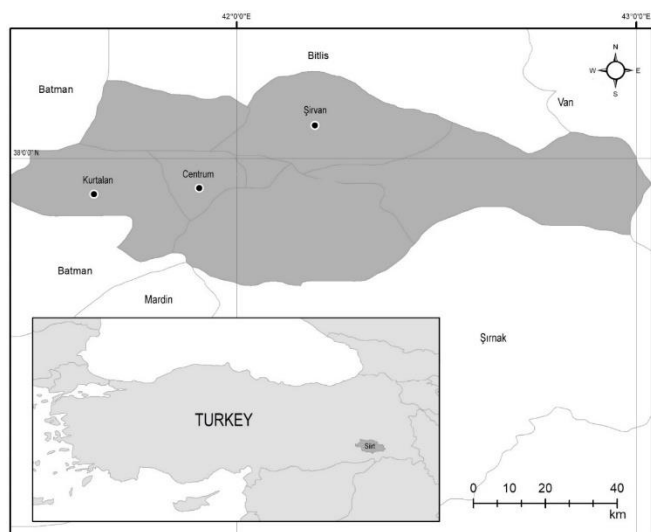


Figure 1. The Siirt province map. Black circles indicate the study areas.

Animal Material and Sample Collection

This study was carried out between March - September 2021. The animal material of this study consisted of a total of 100 calves (38 males and 62 females) of ages up to 6 months. Fecal samples were collected directly from the rectum using disposable latex gloves, after which they were placed in individual stool containers. Location, age, gender, diarrhoea status and anthelmintic usage status for the samples were recorded. Fecal samples brought to the Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Siirt

University and were stored at +4°C until analysis. Fülleborn's saturated saline flotation technique was applied to fecal samples. The samples were then evaluated under a light microscope.

Statistical Analysis

The data obtained in the study were analyzed using the SPSS V16.0 program. The relationship between grouped variables was calculated using the Chi-square test.

Ethical Approval

This study was approved by Siirt University Animal Experiments Local Ethics Committee (Decision number: 2021.04.26).

RESULTS

The anamnesis gathered from the animal owners included the information that the calves were not given any anthelmintic drugs. As a result of this study, *T. vitulorum* egg was detected in seven (7%) of the examined feces samples of 100 animals by microscopic method (Table 1). Among the sexes, the highest positivity rate was encountered in males ($p>0.05$), and among age groups, in the 1-3 month group ($p>0.05$). For locations, the highest positivity rate was in the Merkez district ($p>0.05$), and in terms of stool form, diarrhoea had higher positivity ($p>0.05$). No statistically significant difference was detected between the groups in any criteria.

Table 1. *T. vitulorum* analysis for sex, age, location and presence of diarrhoea in calves

Variable	Number of calves (n)	Positive (n)	Positive (%)	P
Sex				
Female	62	4	6.45	0.784
Male	38	3	7.89	
Age (month)				
<1	27	2	7.41	0.759
1-3	44	4	9.09	
4-6	29	1	3.45	
Diarrhoea				
Yes	41	5	12.20	0.119
No	59	2	3.39	
Location				
Centrum	25	2	8.00	0.946
Kurtalan	41	3	7.32	
Şirvan	34	2	5.88	
Total	100	7	7.00	

DISCUSSION AND CONCLUSION

Toxocara vitulorum infections are seen in many tropical and subtropical regions that have humid climates, but it is reported that it spreads at a high rate in Africa, Philippines, Sri Lanka, India, Europe, and Australia (3, 4, 12). In addition to the direct transmission of the parasite, its transmission through placenta and milk makes the disease control difficult, and the prevalence can reach 100% if the disease is not properly controlled. Most importantly, it can cause death in calves (4, 13).

Different prevalence ratios have been reported by studies conducted in different parts of the world. A prevalence of 2.94% was reported in Syria (14). The prevalence rate was 2.7% in 0-1 months, 7.6% in 2-3 months, and 0.9% in 5-6 months in a study performed in Mali (15). This number changes to 22.6% in Lao (13), to 37.50% in Pakistan (9), to 12.4% in Cambodia (6), to 26.16% in India (Guwahati) (16), to a distinctively high 63% in Ethiopia (17), to 9% in the USA (18). Another study has reported and 40% (19) positivity for the USA as well.

The first detailed study on the prevalence of the disease in Turkey was conducted by Güralp et al. (1985) in which 0.8% positivity was reported. The prevalences reported in other studies are as follows: 16% (12) and 17.7% (21) in Van, 2.2% in Bursa (22), 0.63% in Samsun (23), 7.5% in Kars (8), 1.76% in the Thrace region (11), 28.96% in Hakkari (10), 1.1% (3) and 22.2% (5) in Erzurum, 0.28% among young and 0.41% among adults in Konya (24), and 0.83% in Afyon (7).

As a result of the present study, *T. vitulorum* egg was detected in 7 (7%) of the 100 samples examined, and the result obtained was similar to the findings reached by various researchers (8, 15, 18). Geographical conditions, climate (humidity and temperature), shelter structure, age of the animal, anthelmintic treatment, and care and feeding conditions can be counted among the reasons for the differences between studies.

It has been reported that the incidence of the disease is higher in regions with heavy rainfall and that there must be sufficient temperature and humidity in the barn for the eggs to develop (3). The data obtained in the present study reveal a lower prevalence rate than the results of studies carried out in many regions of the world (6, 9, 10, 13, 16, 17, 19, 21). The fact that Siirt province is quite hot, especially in summer, along with the low humidity rates of the region, might be the cause for this situation.

Many researchers (3, 7, 8, 10, 11, 16) reported that males are more sensitive than females to the infestation. Researchers (5, 7, 24) reported that there was no statistically significant difference between gender groups. As a result of the present study, positivity was determined to be higher in males (7.89%) compared to females (6.45%), but no statistically significant difference was detected ($p>0.05$). These results are similar to the findings of the researchers.

In many studies carried out, it is reported that *T. vitulorum* infections are mostly seen in the 1–3-month age group (3, 4, 6, 8, 10, 12, 16-18, 22), and that the infection rate decreases until 1 year of age and is rarely seen after the first year (4, 5). The fact that the highest positivity was detected in the 1-3 age group as a result of this study also supports these researchers. The reason for the uncommon infestation of old cattle is due to the short prepatent period of the parasite and the expulsion of the parasites in a short time due to age-related resistance (8).

Diarrhoea is also seen among the clinical symptoms of this infection (3). In a study carried out by Arslan et al. (2008), it is reported that the two samples detected positive were diarrheal. As a result of this study, it was determined that the prevalence of diarrheal calves was higher than those

with normal stools, but it was not statistically significant ($p>0.05$).

Among the locations surveyed in the study, the highest positivity was found in the Merkez district and the lowest positivity was found in the Şirvan district. No statistically significant difference was determined between the locations ($p>0.05$).

It is stated that unsuitable animal husbandry, care and feeding conditions, along with climate and vegetation properties, play an important role in the spread of the parasite (10, 20, 22, 24). When the disease is not controlled, morbidity rates can reach 100% and mortality rates can reach 80% in calves. This situation is very important for both animal and human health (visceral larva migrans). As a result of this study, the prevalence of the disease in Siirt province was revealed, and considering the losses caused by the infection, it was concluded that the disease should not be neglected. Farmers should be informed about the disease and appropriate treatment options for it.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

REFERENCES

1. He X, Lv M-N, Liu G-H, Lin R-Q. (2018). Genetic Analysis of *Toxocara cati* (Nematoda: Ascarididae) from Guangdong Province, Subtropical China. Mitochondrial DNA Part A. 29 (1): 132-135.
2. Oğuz B. (2018). Genetic Characterization of *Toxocara vitulorum* in Turkey by Mitochondrial Gene Markers (cox1). Acta Sci Vet. 46: 1558.
3. Arslan MÖ, Sarı B, Taşçı G, Aktaş MS. (2008). Prevalence of *Toxocara vitulorum* in Calves of Erzurum Province. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 14 (1): 37-40.
4. Arslan MÖ, Umur Ş, Özcan K. (1997). The Case of Fatal *Toxocarosis vitulorum* in Calves. Türkiye Parazitoloj Derg. 21 (1): 79-81.
5. Avcioglu H, Balkaya I. (2011). Prevalence of *Toxocara vitulorum* in Calves in Erzurum, Turkey. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 17 (3): 345-347.
6. Dorny P, Devleeschauwer B, Stolaroff V, et al. (2015). Prevalence and Associated Risk Factors of *Toxocara vitulorum* Infections in Buffalo and Cattle Calves in Three Provinces of Central Cambodia. Korean J Parasitol. 53 (2): 197-200.
7. Kozan E, Birdane FM, Erez MS, Göksu A. (2021). Prevalence of *Toxocara vitulorum* in Calves in Afyonkarahisar, Turkey. Kocatepe Vet J. 14 (2): 225-230.
8. Umur Ş, Gıcık Y. (1995). Prevalence of *Toxocara vitulorum* in Cattle in Kars District, Turkey. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 42 22-29.
9. Raza MA, Murtaza S, Ayaz MM, et al. (2013). *Toxocara vitulorum* Infestation and Associated Risk Factors in Cattle and Buffalo at Multan District, Pakistan. Sci Int (Lahore). 25 (2): 291-294.
10. Aydın A, Goz Y, Yuksek N, Ayaz E. (2006). Prevalence of *Toxocara vitulorum* in Hakkari Eastern Region of Turkey. Bull Vet Inst Pulawy. 50: 51-54.
11. Toparlak M, Arslan MÖ, Gargılı A, Tüzer E. (1996). Prevalence of *Toxocarosis vitulorum* in Cattle in Thracia, Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 20 (5): 341-342.

12. Toparlak M, Değer S, Yılmaz H. (1989). Prevalence of *Toxocara (Neosascaris) vitulorum* Infection in Cattle Around Van, Turkey. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 36 (2): 404-412.
13. Rast L, Lee S, Nampanya S, et al. (2013). Prevalence and Clinical Impact of *Toxocara vitulorum* in Cattle and Buffalo Calves in Northern Lao PDR. Trop Anim Health Prod. 45 (2): 539-546.
14. El-Moukdad A. (1979). Helminth Fauna of Syrian cattle. Angew Parasitol. 20 (1): 11-16.
15. Wymann MN, Traore K, Bonfoh B, et al. (2008). Gastrointestinal Parasite Egg Excretion in Young Calves in Periurban Livestock Production in Mali. Res Vet Sci. 84 (2): 225-231.
16. Das G, Phukan A. (2018). Studies on Prevalence of *Toxocara vitulorum*. Infection in Calves. Int J Sc. Res. 7 (5): 246-249.
17. Tamire M, Beredo B. (2019). Study on Prevalence of *Toxocara vitulorum* in Bovine of Senkale Faris Peasant. Association of Ambo districts, West Shewa Zone, Ethiopia. Am J Epidemiol. 3 (1): 1-6.
18. Davila G, Irsik M, Greiner EC. (2010). *Toxocara vitulorum* in Beef Calves in North Central Florida. Vet Parasitol. 168 (3-4): 261-263.
19. Chelladurai JJ, Bader C, Snobl T, et al. (2015). *Toxocara vitulorum* Infection in a Cohort of Beef Calves in Iowa. Vet Parasitol. 214 (1-2): 96-99.
20. Güralp N, Tınar R, Doğanay A, Çoşkun Ş. (1985). The Occurrence of *Toxocara vitulorum* in Cattle in Turkey. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 32 (2): 280-287.
21. Goz Y, Altug N, Yuksek N, Ozkan C. (2006). Parasites Detected in Neonatal and Young Calves with Diarrhoea. Bull Vet Inst Pulawy. 50: 345-348.
22. Akyol ÇV. (1993). Epidemiology of *Toxocara vitulorum* in Cattle Around Bursa, Turkey. J Helminthol. 67: 73-77.
23. Celep A, Açıcı M, Çetindağ M, Gürbüz İ. (1994). Parasito-Epidemiological Studies in Cattle in Samsun Region. Etlik Vet Mikrobiyol Derg. 7 (5): 153-162.
24. Altinöz F, Gökçen A, Uslu U. (2000). Prevalence of *Toxocara vitulorum* in Cattle in Konya Region. Türkiye Parazitolo Derg. 24 (4): 405-407.

✉ **Corresponding Author:**

Burçak ASLAN ÇELİK

Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Siirt University, Siirt, TÜRKİYE

E-mail: burcakaslan@siirt.edu.tr



Effect of Energy Deficiency at The End of Pregnancy on Sheep and Lamb Birth Weights

Mehmet Hanifi DURAK^{1,a,✉}, Atila ATEŞ^{2,b}, Tanay BİLAL^{3,c}

¹Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Dicle University, Diyarbakır, TÜRKİYE

²Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, İstanbul University-Cerrahpaşa, İstanbul, TÜRKİYE

³Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, İstanbul University-Cerrahpaşa, İstanbul, TÜRKİYE

^aORCID: 0000-0003-0702-6660; ^bORCID: 0000-0002-9013-930X; ^cORCID: 0000-0001-7258-6862

Geliş Tarihi/Received
30.12.2021

Kabul Tarihi/Accepted
23.03.2022

Yayın Tarihi/Published
30.06.2022

Abstract

This study was carried out in Chios breed pregnant sheep which created experimentally energy deficiency. To determine the effect of low energy feeding on the birth weights of sheep and lambs in the last period of pregnancy. 38 Chios breed sheep, 4-6 years old, were used in the study. The live weight weights of the ewes before the pregnancy were done on the zero day and the other weight weights on the days 120, 127, 134, 141 and 148 of the pregnancy. On the 105th day of pregnancy, pregnant and non-pregnant sheep were divided into 3 groups as normal energy pregnant group (PNE), deficient energy pregnant group (PLE) and non-pregnant normal energy group (N-PNE). From the 106th day of pregnancy to delivery; The pregnant sheep in the PNE group were fed with the ration containing 13% HP and 10 MJ/kg ME, the pregnant sheep in the PLE group were fed with ration containing 13% HP and 8.0 MJ/kg ME. The sheep in the N-PNE group were fed with ration containing 11% HP and 8.8 MJ/kg ME. PLE and N-PNE groups were found to have lower body weight than the PNE group. However, there was no statistical difference between these groups. In all pregnant sheep, body weight was higher than 120 days of pregnancy, it was found to be higher than day 0 ($p < 0.05$) and after 120 days there was no statistically significant difference between groups. In the study, there was no statistically significant difference between the birth weights of PNE and PLE group. This can be explained by the fact that fetal growth is not affected by %13 HP ve 8.0 MJ/kg ME and does not cause serious energy deficiency in animals.

Key Words: Energy deficiency, ewe, lamb, live weight, pregnancy.

Gebeliğin Sonunda Uygulanan Enerji Eksikliğinin Koyun ve Kuzu Doğum Ağırlıkları Üzerine Etkisi

Öz

Bu çalışma, deneysel olarak enerji eksikliği oluşturulan ikizlik oranı yüksek Sakız Irkı gebe koyunlarda, gebeliğin son döneminde düşük enerji ile beslenmenin, koyunların ağırlıkları ile yeni doğan kuzuların doğum ağırlıkları üzerine olan etkisini saptamak amacıyla yapıldı. Araştırmada ikizlik oranı yüksek, 4-6 yaşlarında, 38 adet Sakız ırkı koyun kullanıldı. Koyunların gebelik öncesi canlı ağırlıkları 0. gün, diğer ağırlık tartımları ise gebeliğin 120, 127, 134, 141 ve 148 günlerinde yapıldı. Gebeliğin 105. gününde gebe ve gebe olmayan koyunlar, normal enerjili gebe grup (PNE), yetersiz enerjili gebe grup (PLE) ve gebe olmayan normal enerjili grup (N-PNE) olarak 3 gruba ayrıldılar. Gebeliğin 106. günü ile doğum arası, PNE grubundaki gebe koyunlar %13 HP ve 10 MJ/kg ME içeren rasyon, PLE grubundaki gebe koyunlar %13 HP ve 8.0 MJ/kg ME içeren rasyon ile beslendi. N-PNE grubundaki gebe olmayan koyunlar ise %11 HP ve 8.8 MJ/kg ME içeren rasyon ile beslendi. Araştırmada PLE ve N-PNE grupları, PNE gruptan daha düşük vücut ağırlığına sahip olduğu tespit edildi. Ancak bu gruplar arasında istatistikî farkın olmadığı görüldü. Bütün gebe koyunlarda vücut ağırlığı gebeliğin 120. günü, 0. güne göre daha yüksek bulunmuş olup ($p < 0.05$), 120. günden sonra ise gruplar arasında istatistikî olarak anlamlı bir fark saptanamadı. Çalışmada PNE ve PLE grubundaki yavruların doğum ağırlıkları arasında istatistikî bir farkın olmadığı görüldü. Bu durum, fetal büyümenin %13 HP ve 8.0 MJ/kg ME'den etkilenmediğini ve hayvanlarda ciddi bir enerji yetersizliğine yol açmamış olması ile açıklanabilir.

Anahtar Kelimeler: Canlı ağırlık, gebelik, koyun, kuzu, yetersiz enerji.

INTRODUCTION

The most critical periods in the feeding of sheep are known as pregnancy and lactation period (1). Energy needs of sheep in the last period of pregnancy is increasing significantly. In particular, in the last 6 weeks of pregnancy, 70-80% of fetal growth is due to adequate growth and development of fetus in mother's womb due to balanced diet of mother (1,2). The weakness of the mother in the last months of pregnancy causes the fetus not to be fed well and therefore the lambs' ability to survive (3,4).

The daily nutrient requirement for sheep's normal life share is 8.4 MJ/kg ME (Metabolic energy) and 9.4% HP (Crude protein). Nutrition of pregnant sheep is discussed in two periods as first 15 weeks of pregnancy and last four weeks according to energy and nutrient requirements. For a first 15 weeks of gestation, fetus growth is 30% and nutritional requirements are 8.8 MJ/kg ME and 10.6% HP in a 55 kg body weight sheep. During the last four weeks of pregnancy, the development of fetus is very fast and the nutritional needs of the sheep increase considerably. Nutritional needs of

sheep carrying single offspring go up to 9.6 MJ/kg ME and 11.8% HP, while double sheep carry 10 MJ/kg ME and 12.8% HP (5,6). In the last 6 weeks of pregnancy, the balanced ration application increases the live weight of the sheep depending on the nutrition level and decreases the weight loss at birth (3).

The aim of this study was to determine the effect of low energy feeding on the weights of sheep and birth weights of newborn lambs in Chios breed sheep with experimentally low energy level.

MATERIAL AND METHODS

A total of 38 Chios breed 4-6 aged sheep were used for the study. Estrus synchronization was applied to sheep and sheep were placed in boxes with 1 Chios ram per 10 ewes for mating. After the sponges were removed, the first weights of the sheep before the pregnancy (day 0) were taken. Other weights were detected on days 120, 127, 134, 141 and 148 of pregnancy. The numbers, genders and weights of the lambs were determined by following the births of pregnant sheep.

On the 105th day from the date of introduction of ram, sheep were examined by ultrasound to separate pregnant sheep and form groups. According to the results of the examination, 24 out of 38 animals were found to be pregnant. These animals were divided into three groups as normal energy pregnant (PNE, n=12), deficient pregnant (PLE, n=12) and normal energy non-pregnant (N-PNE, n=14). From the 105th day of pregnancy, the animals were started to be fed appropriately to the groups in which they were present (Table 1). This continued until the birth of the animals. All sheep were fed with ad libitum water and from the group of feeds, about 700 grams per sheep, at 08:00 am and 16:00 pm. Considering feed tables, energy and crude protein levels of rations were determined approximately. Two ewes died in the PNE group during the final periods of pregnancy. It was determined that 2 ewes had acute pneumonia in the PLE group and 4 ewes had metritis in the N-PNE group. In total 8 ewes were removed from the 3 groups in this study.

Nutrition between 0-105 days; the pregnant and non-pregnant sheep were fed with ration containing 11% HP and 8.8 MJ/kg ME (n=38, 1400 g/day/animal) (Table 1).

Table 1. Composition of the diets (%)

Ingredients	PNE	PLE	N-PNE
Grass hay	34.00	65.00	75.00
Cracked barley	1.60	3.80	5.00
Cracked maize	28.00	1.00	7.50
Sunflower meal	21.00	18.50	1.10
Razmol	3.00	4.30	8.00
Wheat bran	6.00	3.00	1.50
Cracked wheat	6.00	4.00	1.50
Zeolitea	0.10	0.10	0.10
Vitamin premixb	0.10	0.10	0.10
Salt	0.10	0.10	0.10
Marble powder	0.10	0.10	0.10

^a In 1kg zeolite, 48.58% SiO₂, 14.72% Al₂O₃, 11.11% CaO, 11.65% MgO, 9.19% F₂O₃, 2.50% LiO, 1.28% Na₂O, 0.44% K₂O There are 0.38% TiO₂, 0.16% MnO, 0.06% Cr₂O₃, and 0.03% P₂O₅.

^b 1 kg of vitamin premix of 10.000.000 IU of vitamin A, 1.500.000 IU of vitamin D₃, 25 g of vitamin E, 20 g of niacin, 7 g of pantothenic acid, 2.5 g of vitamin B₂, 1.5 g of vitamin B₁, 1.5 g of vitamin B₆ and 15 mg contains vitamin B₁₂.
PNE = Pregnant normal energy, PLE = Pregnant low energy, N-PNE = Non-pregnant normal energy

Nutritional feeding on day 106 of pregnancy; PNE group (n=10) 13% HP and 10 MJ/kg ME ration, PLE group (n=10) 13% HP and 8.0 MJ/kg ME ration, N-PNE group (n=10) were fed with 11% HP and 8.8 MJ / kg ME ration (1400g/day/animal). Since the 106th day of pregnancy, HP content of feed was increased due to fetus requirements of pregnant animals.

Statistical Analysis

Statistical comparisons of maternal weight and lamb birth weight were performed by the Independent-Student t-test among pregnant sheep fed by PNE and PLE ration, and sheep fed by PNE and N-PNE ration. In addition, statistical comparisons of maternal weight between days of blood collection in each group were evaluated by variance analysis (Duncan test). These tests were performed using SPSS 10.00 package program. The results were shown as mean standard deviation ($\bar{X} \pm SD$). A significance level of P<0.05 was employed in the analysis of data from treatment groups.

RESULTS

The average body weights of pregnant sheep fed by PNE and PLE ration are shown in table 2. Although PLE and N-PNE sheep had lower body weight than PNE sheep, no statistically significant difference was found between these groups. In all pregnant sheep, body weight was higher than 120 days of pregnancy, it was found to be higher than day 0 (p<0.05). It was also found that body weight did not change during blood collection periods in non-pregnant sheep.

Table 2. Body weights of non-pregnant sheep fed by pregnant sheep fed by PNE and PLE rations and N-PNE ration (kg, n=10, $\bar{X} \pm SD$)

Group	Pregnancy					
	Day 0	Day 120	Day 127	Day 134	Day 141	Day 148
PNE	55.7±8.83b	65.5±9.79a	66.4±9.01a	66.7±9.02a	67.5±7.48a	67.1±7.42a
PLE	51.4±5.82b	58.7±5.61a	59.1±5.38a	60.4±5.79a	60.7±6.16a	63.3±5.16a
N-PNE	51.6±6.64a	53.7±6.60a	54.8±6.40a	52.6±5.93a	54.1±6.53a	54.7±5.85a

^{ab} statistical difference between the days in the same row with different letters are significantly (p<0.05).

PNE = Pregnant normal energy, PLE = Pregnant low energy, N-PNE = Non-pregnant normal energy

In the study, pregnant sheep fed by PNE, 22 lambs, and pregnant sheep fed by PLE gave birth to 18 lambs. The birth weights of the lambs are shown in Table 3. There was no significant difference between the two groups in terms of birth weights of the lambs.

Table 3. Birth weights of lambs born from pregnant sheep fed by PNE and PLE rations (kg, $\bar{X} \pm SD$)

	Single Lamb	Multiple Lambs
	n=4	3.97 ± 0.32
n=4	4.36 ± 0.46	n=14

PNE = Pregnant normal energy, PLE = Pregnant low energy

DISCUSSION AND CONCLUSION

In the last 6 weeks of pregnancy, the balanced ration application increases the live weight of the sheep depending on the nutritional level and decreases the weight loss at birth (3,7). Inadequate feeding of the sheep during pregnancy may lead to decreased body condition, decreased live weight gain, premature birth risk, high lamb deaths and low milk yield due to insufficient breast development and even death

in many cases (4,8-10). In addition, with sufficient energy consumption during the last 6 weeks of pregnancy, it has been reported that the increase in the reproductive organs during pregnancy is caused by growth and proliferation in the fetus, uterus, placenta and amniotic fluid, and this situation increases the body weight of the mother and lamb (10,11). They reported a 10 kg increase in live weight of single sheep and an increase of 16-17 kg in twin births (10). Steyn et al. (12) reported that pregnant sheep fed with sufficient energy levels (10.8 MJ/kg ME) had a higher weight than those fed with insufficient energy levels (9.1 MJ/kg ME). On the other hand, Aktaş et al. (13) reported that birth weight and survival rate were not significantly affected by the feeding level of sheep in the last period of pregnancy. In the study, no significant difference was found between pregnant sheep and malnourished sheep in terms of body weights. However, normal-fed pregnant sheep were found to tend to have more body weight than the poorly fed pregnant group (Table 2). In this respect, the findings of the study were reported by Steyn et al. (12) and Alçiçek and Yurtman (10), while they show similarities, Aktaş et al. (13) are compatible with the study.

In humans and animals, malnutrition of mother during pregnancy leads to slowing of fetus weight, uterine and placental growth (14,15). In pregnant sheep, it has been reported that alteration of protein and energy ratios in feed is effective on placenta, fetal growth is usually not affected by feeding changes in early and mid-term pregnancy, fetal growth is low in mid pregnancy, when mother is seriously malnourished (16). Dandrea et al. (17) reported that the fetus weights of pregnant sheep fed with insufficient energy level and placenta masses were lower than those fed enough. In a study by Aktaş et al. (13) the birth weights of single-born lambs were significantly higher than twin-born lambs. Şirin et al. (11) reported that additional feeding during the last period of pregnancy increased maternal weight and lamb birth weight. However, Mathews et al. (18) reported that maternal malnutrition did not affect the birth weight of the lamb. As in our study, no statistically significant difference was found between lamb birth weights in PNE and PLE groups. In this respect, the data of the study are consistent with the findings of Mathews et al. (18). The reason why there was no significant difference between the PNE and PLE pregnant groups in our study suggests that a serious lack of energy was not applied to the animals. Borwick et al. (19) reported that the birth weight of the sheep fed with insufficient energy (8.5 MJ/kg ME) was 18% lower than that of those fed enough (12.2 MJ/kg ME). However, the birth weight of the offspring in the PNE and PLE groups did not show a statistically significant difference (Table 3). This may be explained by the fact that, as Perry et al. (16) states, fetal growth is not affected by the energy insufficiency applied, the lack of a serious energy deficiency in animals. As a result, it was concluded that the nutrient energy values at the end of pregnancy should be lower than 8.0 MJ/kg ME in order to determine the effect of sheep fed with insufficient energy on body weights and fry birth weights at the end of pregnancy.

CONFLICTS OF INTEREST

The author declares that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

REFERENCES

- Demirel M, Aygün T, Altın T, Bingöl M. (2000). The Effect of Different Levels of Feeding in Late Gestation on Ewe Weight, Lamb Birth Weight and Lamb Growth of Karakaş and Hamdani Ewes. *Türk J Vet Anim Sci.* 24: 243-249.
- Cristian RS, Jauhiainen L. (2001). Comparison of Hay and Silage For Pregnant and Lactating Finnish Landrace Ewes. *Small Rum Res.* 39: 47-57.
- Filya İ, Karabulut A, Akgündüz V. (1999). The Effect of Different Levels of Nutrition at Last Period of Gestation on Liveweight of Ewes, Growth and Survival Rates of Their Lambs. *Türk J Vet Anim Sci.* 23 (1): 95-99.
- Johnson KA. (1997). Nutritional Management of the Sheep Flock. Washington State Cooperative Extension USD.
- Dawson LER, Carson AF, Kilpatrick DJ. (1999). The Effect of The Digestible Undegradable Protein Concentration of Concentrates and Protein Source Offered to Ewes in Late Pregnancy on Colostrum Production and Lamb Performance. *Anim Feed Sci Tech.* 82: 21-36.
- National Research Council (1985). Nutrients Requirements of Sheep. 6th. rev. ed. National Academy Press, Washington D.C. USD.
- Gonda HL, Lindberg JE, Holtenius K. (1997). Plasma Levels of Energy Metabolites and Pancreatic Hormones in Relation to the Level of Intake and Intraruminal Infusions of Volatile Fatty Acids in Fed Wether Sheep. *Comp Biochem Physiol.* 116A, 65-73.
- Abecia JA, Forcada F, Lozano JM. (1999). A Preliminary Report the Effect of Dietary Energy on Prostaglandin F_{2α} Production in Vitro, Interferon-Tau Synthesis by the Conceptus, Endometrial Progesterone Concentration on Days 9 and 15 of Pregnancy and Associated Rates of Embryo Wastage in Ewes. *Theriogenology.* 52: 1203-1213.
- Yaakub H, O'Collaghan D, Boland MP. (1999). Effect of Roughage Type and Concentrate Supplementation on Follicle Numbers and in Vitro Fertilisation and Development of Oocytes Recovered From Beef Heifers. *Anim Rep Sci.* 55: 1-12.
- Alçiçek A, Yurtman Y. (2009). Nutrition in Intensive Sheep Production. *Uludağ Üniv Ziraat Fak Derg.* 23 (2): 1-13.
- Şirin E, Uçan Ü, Şen U, Soydan E. (2017). Effect on Birth and Other Weights of the Lambs of Add Feeding at Late Gestation in Akkaraman Sheep. *TURJAF.* 5 (11): 1353-1359.
- Steyn C, Hawkins P, Saito T, Noakes DE, Kingdom JCP, Hanson MA. (2001). Undernutrition During the First Half of Gestation Increases the Predominance of Fetal Tissue in Late-Gestation Ovine Placentomes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 98: 165-170.
- Aktaş AH, Gurkan M, Erdem H. (2013). Effect of Feeding at Different Levels of Single or Twin Pregnant Konya Merino Ewes on the Live Weights, Body Condition of Ewes and Growth of Lambs. *Eurasian J Vet Sci.* 29 (4): 198-204.
- Holemans K, Aerts L, Assche FAV. (1998). Fetal Growth and Long-Term Consequences in Animal Models of Growth Retardation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 81: 149-156.
- Symonds ME, Budge H, Stephenson T. (2000). Limitations of Models Used to Examine the Influence of Nutrition During Pregnancy and Adult Disease. *Arch Dis Child.* 83: 215-219.

16. Perry VEA, Norman ST, Owen JA, Daniel RCV, Phillips N. (1999). Low Dietary Protein During Early Pregnancy Alters Bovine Placental Development. *Anim Rep Sci.* 55: 13-21.
17. Dandrea J, Wilson V, Gopalakrishnan G. et al. (2001). Maternal Nutritional Manipulation of Placental Growth and Glucose Transporter 1 (GLUT-1) Abundance in Sheep. *Reproduction.* 122 (5): 793-800.
18. Mathews F, Yudkin P, Neil A. (1999). Influence of Maternal Nutrition on Outcome of Pregnancy. *Br Med J.* 319: 339–343.
19. Borwick SC, Rae MT, Brooks J, McNeilly AS, Racey PA, Rhind SM. (2003). Undernutrition of Ewe Lambs in Utero and in Early Post-Natal Life Does Not Affect Hypothalamic-Pituitary Function in Adulthood. *Anim Rep Sci.* 77: 61-70.

✉ **Corresponding Author:**

Mehmet Hanifi DURAK
Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Dicle University, Diyarbakır, 21280, TÜRKİYE
E-mail: hanifidurak@hotmail.com



Diyarbakır Yöresinde İshalli Buzağlarda *Cryptosporidium spp.* Yaygınlığı ve Moleküler Karakterizasyonu

Duygu Neval SAYIN İPEK^{1,a,✉}

¹Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, TÜRKİYE

^aORCID: 0000-0002-7486-232X

Geliş Tarihi/Received
08.12.2021

Kabul Tarihi/Accepted
25.03.2022

Yayın Tarihi/Published
30.06.2022

Öz

Bu çalışma insan ve birçok evcil hayvanda ishale neden olan *Cryptosporidium*'un Diyarbakır ve çevresinde ishalli buzağlarda yaygınlığının ve türlerinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. *Cryptosporidiosis* yaygınlığını belirlemek için bölgede bir aylığa kadar olan ishalli 64 buzağıdan dışkı örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler ookist varlığı yönünden direkt immünfloresan antikor tekniği kullanılarak incelenmiştir. *Cryptosporidium spp.* ookistleri 64 örneğin 36 'sında (%56.25) tespit edilmiştir. Mikroskopik olarak *Cryptosporidium spp.* ookistlerinin tespit edildiği pozitif bütün örneklerden SSU rRNA lokusunun PCR ürünleri elde edilmiş ve iki *Cryptosporidium* türü tanımlanmıştır. Tanımlanan *C. parvum* (32/36, %88.9) baskın tür olarak belirlenirken, *C. ryanae* (4/36, %11.1) tanımlanan diğer türdür. Bu çalışmanın sonucunda Diyarbakır ve çevresinde ishalli buzağlarda cryptosporidiosisin önemi ve yine ishalli buzağlarda potansiyel zoonotik öneme sahip olan *C. parvum* türüne yüksek oranda rastlanmasıyla buzağların diğer hayvan ve insanlar için bulaş kaynağı olabileceği ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Buzağı, *Cryptosporidium*, Diyarbakır, Nested PCR, zoonoz

Prevalence and Molecular Characterization of *Cryptosporidium spp.*'in Calves with Diarrhea in Diyarbakır Province

Abstract

This study was carried out in calves with diarrhea in order to determine the prevalence and species of *Cryptosporidium*, which causes diarrhea in humans and many domestic animals, in Diyarbakır and its surroundings, located in the southeast of Turkey. Stool samples were taken from the rectums of 64 calves with diarrhea up to one month old, using sterile gloves to determine the prevalence of *Cryptosporidiosis*. The samples were examined for the presence of oocysts using direct immunofluorescence antibody technique. *Cryptosporidium spp.* oocysts were detected in 36 (56.25%) of 64 samples. PCR products of the SSU rRNA locus were obtained from all positive samples and two *Cryptosporidium* species were identified. While *C. parvum* identified 32 (88.9%) was determined as the dominant species, *C. ryanae* was the other identified 4 (11.1%) species. As a result of this study, the importance of cryptosporidiosis in diarrheal calves in Diyarbakır and its district. and the high incidence of *C. parvum* species, which has a potential zoonotic importance in diarrheal calves, have been revealed to be a source of transmission to other animals and humans.

Key Words: Calves, *Cryptosporidium*, Diyarbakır, Nested PCR, zoonosis

GİRİŞ

Cryptosporidium insan dahil birçok memelinin sindirim sistemi epitel hücrelerine hücre içi ekstrasitoplazmik olarak yerleşen paraziter bir protozoondur. Zoonoz karakterdeki bu parazitin türlerinin neden olduğu cryptosporidiosis yiyecek ve su kaynaklı bir enfeksiyon olup özellikle yeni doğan ve immun supresif hayvan ve insanlarda enfeksiyona neden olmaktadır (1-4). Hayvan sayılarının artmasına bağlı olarak artan hayvansal atık miktarı ile birlikte bu parazitin taşınmasında önemli bir faktör olan su kaynaklarının *Cryptosporidium spp.* ookistleri ile kirliliği artış göstermiştir (5-6). Özellikle hayvancılıkla uğraşanlar, veteriner hekimler, hijyenik

koşulların yetersiz olduğu yerlerde yaşayanlar ve enfekte kişilerle yakın temas edenlerde hastalığın yaygınlığının yüksek olduğu bildirilmiştir (7).

Cryptosporidium'un 20'den fazla farklı türü tanımlanırken bulunduğu konaklardaki yaygınlığına göre *Cryptosporidium parvum* ve *C. andersoni* (memelilerde), *C. nesorum* (balıklarda), *C. serpentis* (sürüngenlerde), ve *C. meleagridis* ve *C. baileyi* (kanatlılarda) olmak üzere yaygın olan 6 temel tür belirtilmektedir (8-10). Sığırların evcil hayvanlar arasında *Cryptosporidium* türlerinin en yaygın konakçısı olduğu bilinmektedir. Dünyada yapılan çalışmalarda sığırlarda 16'dan fazla tür ve genotip bildirilmiş ve bunların arasında *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* ve *C. ryanae* türleri en yaygın olan ve sığırların cryptosporidiosisine neden olan etkenler olarak

kabul edilmektedir. Süt sığırlarında *Cryptosporidium* türlerinin yaşa bağlı dağılımı ile ilgili yapılan çalışmalarda, *C. parvum*'un süttten kesilmemiş buzağlarda, *C. bovis* ve *C. ryanae*'nin süttten kesilmiş buzağlarda ve gençlerde, *C. andersoni*'nin ise çoğunlukla yetişkinlerde hastalık yaptığı bildirilmiştir (11-13).

Yenidoğan buzağlarda yapılan çalışmalarda; ishalin hem büyüme hızını hem de karkas kalitesini azalttığı gibi ölüm riskini de artırdığı gösterilmiştir (14, 15). *C. parvum* buzağların yeni doğan ishallerinde primer etiyolojik ajan olarak tespit edildiği ve bu türün buzağlarda sarı sulu dışkı ile ishale, ilerleyici dehidrasyona, kilo kaybına, gecikmiş büyüme ve ara sıra ölüme neden olan bir enfeksiyon tablosu oluşturduğu bildirilmiştir (13, 16). *C. parvum* ile enfekte olmuş süttten kesilmemiş buzağlar, zoonotik bulaşma için de önemli rezervuarlar olarak kabul edilmektedir (17). Ayrıca, sığır sürülerinde, enfekte hayvanlar, özellikle ishalli buzağlar, altı haftalıktan büyük asemptomatik hayvanlar ookist çıkararak diğer çiftlik hayvanları için doğrudan enfeksiyon kaynağı olarak hareket etmektedir (13, 17-19).

Cryptosporidiosis'den kaynaklanan ishal salgınlarına, son yıllarda birçok ülkede sıkça rastlanılmaktadır, Türkiye'de de özellikle Cryptosporidiosis'den kaynaklanan neonatal buzağı ishalleri ve buna bağlı ölüm olayları büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır (20-29).

Bu çalışma Diyarbakır merkez ve ilçelere bağlı köylerde, bir aylıktan küçük ishalli buzağlardan toplanan dışkı örneklerinin mikroskopik ve moleküler yöntemlerle *Cryptosporidium spp.* yaygınlığının ve türlerinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma Ocak-Aralık 2018 yılında Diyarbakır ve çevresinde yürütülmüştür. Bir aylıktan küçük ishalli 64 buzağın rektumlarından dışkı örnekleri steril eldiven ve swap kullanılarak toplanmıştır.

Mikroskopik Analiz

Dışkı örnekleri soğuk zincirde laboratuvara getirilerek *Cryptosporidium* ookistlerinin varlığı yönünden ticari olarak temin edilen Crypto / Giardia-Cel FITC Staining Kit (Cellabs Inc., Brookvale, Avustralya) kullanılarak floresan mikroskopunda 200 x, 400 x ve 1000 x büyütme altında incelenmiştir. Örnekler moleküler analiz yapılabildiği kadar -20°C saklanmıştır.

DNA Ekstraksiyonu Gen Amplifikasyonu Sekans Analizi

Total DNA izolasyonu ZR Fecal DNA MiniPrep kiti (Zymo Research, Irvine, CA) kullanılarak yapılmıştır. Türlerin tanımlanması amacıyla, tüm DNA ekstraktları, *Cryptosporidium*'un SSU rRNA geninin 830 bp parçasını amplifiye etmek için Nested PCR protokolüne tabi tutulmuştur. PCR'ın birinci turunda 1325 bp'lik bir PCR ürünü, 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' ve 5'-CCCTAATC CTTCGAAACAGGA-3' kullanılarak amplifiye edilmiştir. PCR'nin ikinci turu 5'-GGAAGGGTTGTATTATTA-GATAAAG-3' ve 5'-AAGGAGTAAGGACAACCTCCA-3' primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonları, 10 x PCR tamponu, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, her primerden 20 pmol ve 2 U Taq DNA polimeraz içeren toplam 50 µL hacimde

ve 3 dk 94°C'de ilk denatürasyon 35 döngü, 45 sn 94°C'de 45 sn için 55°C ve 1 dk 72°C'de ve 7 dk için 72°C'de son uzatma koşulları altında gerçekleştirilmiştir. İkinci adım PCR karışımı ve koşulları, 1.5 mM MgCl₂ konsantrasyonunun kullanılması dışında birincil PCR ile aynı olarak gerçekleştirilmiştir (30, 31). PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuş ve etidyum bromür ile boyanarak görselleştirilmiştir. İkincil PCR ürünleri, Sanger dizi analiz yöntemi ile (ABI PRISM 310 modeli; Perkin-Elmer, ABD) sekanslanmıştır.

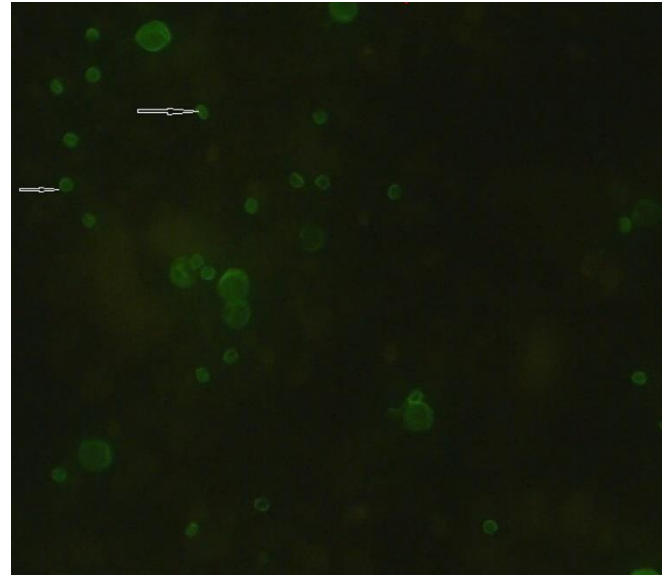
BULGULAR

Mikroskopik Analiz

Mikroskopik inceleme sonucunda bir aylığa kadar olan ishalli 64 buzağın *Cryptosporidium spp.* yaygınlığı %56.25 (36/64) olarak belirlenmiştir. (Tablo 1, Şekil 1).

Tablo 1. Diyarbakır ve çevresinde ishalli buzağlarda *Cryptosporidium*'un prevalansı ve türleri

	DİFAT	%
Örnek sayısı	64	
Pozitif	36	56.25
Negatif	28	43.75
	Nested PCR	%
Örnek sayısı	36	
<i>C. parvum</i>	32	88.9
<i>C. ryanae</i>	4	11.1

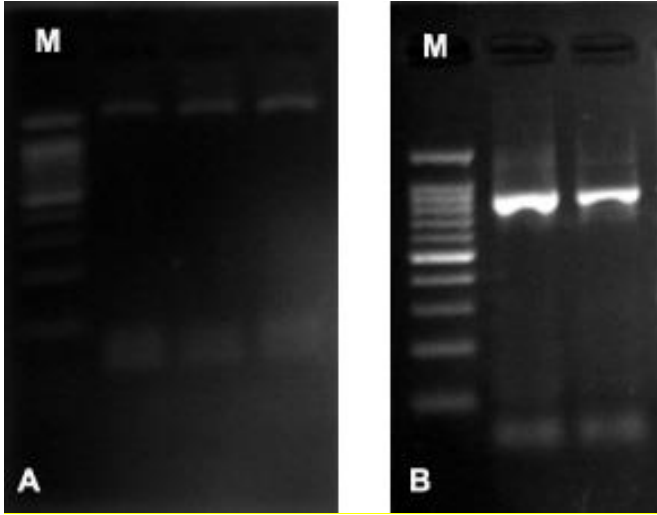


Şekil 1. Fluoresan mikroskopunda X 40 objektifte DIFAT ile pozitif belirlenen bir örneğe ait resim görüntüsü

Moleküler Analiz

Cryptosporidium oositlerinin mikroskopik olarak tanımlandığı 36 numunenin SSU rRNA lokusundan PCR ürünleri başarıyla elde edilmiş ve iki *Cryptosporidium* türü tanımlanmıştır. Tanımlanan *C. parvum* (36/32, %88.9) baskın tür olarak belirlenirken, *C. ryanae* (36/4, %11.1) tanımlanan diğer türdür. (Tablo 1, Şekil 2). Örnekler sekans analizi için ticari bir firmaya gönderilmiş ve elde ettiğimiz veriler GenBank'taki verilerle karşılaştırılmıştır. Çalışmada belirlenen *C. parvum*, MN918240.1, MN918160 Genbank numarası ile benzerlik ve

C. ryanae, MF671876.1 Genbank numarası ile benzerlik göstermiştir.



Şekil 2. A: *Cryptosporidium* spp. pozitif örneklerin SSU rRNA geninin 1325 bp %1 agaroz jel görüntüsü, B: *Cryptosporidium* spp. pozitif örneklerin SSU rRNA geninin 830 bp %1.4 agaroz jel görüntüsü, M: Marker (100 bp DNA ladder)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Cryptosporidium türleri buzağlarda neonatal dönemde ishale neden olan en önemli etkenlerdendir. Son yıllarda cryptosporidiosis üzerine moleküler çalışmaların artması ile birlikte buzağlarda görülen *Cryptosporidium* türleri ve bunların zoonotik önemleri ortaya konmaya başlanmıştır (32).

Türkiye’de buzağlarda *Cryptosporidium*’un varlığı ilk olarak Burgu (33) tarafından bildirilmiştir. Ülkemizde daha sonra yapılan çalışmalarda bu protozoonun yaygınlığı belirlemek için çeşitli mikroskopik tanı yöntemleri kullanılmakla birlikte günümüzde moleküler yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalarda artış olmuştur. Farklı illerde çeşitli mikroskopik yöntemlerle yürütülmüş çalışmalarda ishalleri buzağlarda *Cryptosporidium* spp. oookistlerine Kars’ta %25.7, %37.7, %5.94 (34-36), Aydın’da %10.7 (37), Ankara’da %63.3 (38), Konya’da %39.4 (39), Sivas’ta %7 (40), Erzurum’da %30.3 (41), %13.6 (22) oranında rastlandığı bildirilmiştir. Yine ishalleri buzağlarda *Cryptosporidium* spp. varlığını belirlemek üzerine yapılan moleküler çalışmalarda, Aysul ve ark. (42) Aydın’da %24.2, Şimşek ve ark. (43) Nevşehir’de %19.3, Yıldırım ve ark. (21) Burdur’da %57.5, Kayseri’de %58.2, Güven ve ark. (22) Erzurum’da %13.6, Bin Kabir ve ark. (24) Konya’da %27.4 oranında *Cryptosporidium* spp. tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Dünyada farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda ishalleri buzağlarda *Cryptosporidium*’un prevanlansı Cezayir’de %40.5 (44), Tunus’ta %55.5 (45), Fransa’da %88.6 (46), Çin’de %52.6 (47) Hindistan’da % 32.3 (48), %50 (49), Kanada’da % 40.6 (50) oranlarında rapor edilmiştir. Diyarbakır ve çevresinde yapılan bu çalışmada bir aylağa kadar olan ishalleri 64 buzağda *Cryptosporidium*’un prevanlansı %56.25 olarak belirlenmiştir. Bu oran Burdur, Kayseri, Hindistan, Çin ve Tunus’ta bildirilen oranlarla benzerlik gösterirken, Ankara ve Fransa’da bildirilen oranlardan düşük diğer bildirilen oranlardan daha yüksektir (21, 22, 24, 34-50). Çalışmalar arasında

görülen bu farklılığa toplanan materyal sayısının, çiftlik koşullarının, buzağların yaşının, çiftliklerdeki hayvan sayısının etkili olabileceği düşünülmektedir.

Tüm dünyada sığırları enfekte ettiği bilinen başlıca *Cryptosporidium* türlerinin *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* ve *C. andersoni* olduğu rapor edilmiştir (51). Türkiye’deki *Cryptosporidium* türlerinin moleküler karakterizasyonu sonucunda, *C. parvum* (20-24, 42, 43), *C. bovis* (20, 24, 42) ve *C. ryanae* (20, 21, 23, 42) olmak üzere 3 türün varlığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ishalleri buzağlarda *C. parvum* ve *C. ryanae* olmak üzere Türkiye’de görülen iki tür tespit edilmiştir.

Dünyada ve Türkiye’de buzağlarda bildirilen bu türler arasında zoonotik bir hastalık olan cryptosporidiosis’e neden olması açısından bilinen en önemli tür *C. parvum*’dur (52-55). Dünya’da farklı ülkelerde yapılan birçok çalışmada *C. parvum* sütte kesilmemiş buzağlarda en yaygın tür olarak bildirilmiştir (56-60). Dünyada bildirilene benzer şekilde Türkiye’de de buzağlarda *C. parvum*’un baskın tür olarak görüldüğü bildirilen çalışmalar bulunmaktadır (20-24, 42, 43). Aydın’da ishalleri buzağlarda PCR-RFLP sonucu *C. parvum* teşhis edilmiş olup, yaygınlığı %24.2 oranında olduğu bildirilmiştir (42). Nevşehir’de Real Time PCR ile buzağlarda *C. parvum* yaygınlığını %15.3 (23/150) olarak bildirirken, *C. ryanae* (2 /150), *C. bovis* (1/150) türleri de saptadıklarını raporlamışlardır (43). Kars yöresinde ishalleri buzağlarda PCR-RFLP ile yapılan çalışmada en yaygın türün *C. parvum* olduğu belirlenmiş olup, *C. bovis* ve *C. ryanae* türleri de bulunmuştur (20). Güven ve ark. (22) yaptıkları çalışmada ishalleri buzağlarda *C. parvum* tek tür olarak bildirilirken, Özkan ve ark. (23) *C. parvum* (27/28), *C. ryanae* (1/28) tespit ettiklerini bildirmişlerdir (22, 23). Konya’da *C. parvum* %27.1, *C. bovis* %0.3 oranında rastlandığı bildirilirken (24), Kayseri’de *C. parvum*’a %53.6, Burdur’da ise *C. parvum*’a %52.5 oranında baskın tür olarak rastlandığı bildirilmiştir (21). Bu çalışmada örneklerin SSU rRNA lokusundan elde edilen PCR ürünlerinin sekans analizleri sonucu Dünya’da ve Türkiye’de bildirilenlere benzer şekilde *C. parvum* (%88.9) baskın tür olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak ishalleri buzağlarda enfeksiyonun prevalansının yüksek olması neonatal buzağı ishallerinde cryptosporidiosis bölge için önemini ortaya koymaktadır. Ayrıca ishalleri buzağlarda potansiyel zoonotik öneme sahip olan *C. parvum* türüne yüksek oranla rastlanması ishalleri buzağların diğer hayvan ve insanlar için bulaşma kaynağı olabileceği kanısı oluşturmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğü tarafından VETERİNER.17.016 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Caccio SM, Thompson ARC, McLauchlin J, Smith HV. (2005). Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* Epidemiology. Trends Parasitol. 21(9): 430–437.
2. Dubey JP, Speer CA, Fayer R. (1990). Cryptosporidiosis of Man and Animals. CRC Press, USA.

3. Lee SH, Kim HY, Choi EW, Kim D. (2019). Causative Agents and Epidemiology of Diarrhea in Korean Native Calves. *J Vet Sci.* 20(6): e64.
4. Fredes F, Díaz A, Raffo E, Munoz P. (2008). *Cryptosporidium spp.* Oocysts Detected Using Acid-Fast Stain in Faeces of Gentoo Penguins (*Pygoscelis papua*) in Antarctica. *Antarct Sci.* 20(5): 495-496.
5. Wells B, Shaw H, Hotchkiss E, Gilray et al. (2015). Prevalence, Species Identification and Genotyping *Cryptosporidium* from Livestock and Deer in a Catchment in the Cairngorms with a History of a Contaminated Public Water Supply. *Parasites Vectors.* 8(1): 66
6. Wells B, Paton C, Bacchetti R, et al. (2019) *Cryptosporidium* Prevalence in Calves and Geese Co-Grazing on Four Livestock Farms Surrounding Two Reservoirs Supplying Public Water to Mainland Orkney Scotland. *Microorganisms.* 7(11): 513
7. Usluca S, Aksoy Ü. (2006). Su kaynaklı Bir Parazit: *Cryptosporidium*. *DEU Tıp Derg.* 20(1): 65-74.
8. Olson ME, O'Handley RM, Ralston, BJ, McAllister TA, Thompson RA. (2004). Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends parasitol.* 20(4): 185-191.
9. Thompson RA, Palmer CS, O'handley R. (2008). The Public Health and Clinical Significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Domestic Animals. *Vet Journal.* 177(1): 18-25.
10. Muhid A, Robertson I, Ng J, Ryan U. (2011). Prevalence of and Management Factors Contributing to *Cryptosporidium sp.* Infection in Pre-weaned and Post-weaned Calves in Johor, Malaysia. *Exp Parasitol.* 127(2): 534- 538.
11. Fayer R, Santin M, Trout JM, Greiner E. (2006). Prevalence of Species and Genotypes of *Cryptosporidium* Found in 1-2-Year-Old Dairy Cattle in the Eastern United States. *Vet Parasitol.* 135(2):105-112.
12. Fayer R, Santin M, Trout JM. (2007). Prevalence of *Cryptosporidium* Species and Genotypes in Mature Dairy Cattle on Farms in Eastern United States Compared with Younger Cattle from the Same Locations. *Vet Parasitol.* 145(3-4): 260-266.
13. Santin M, Trout JM, Fayer R. (2008). A Longitudinal Study of Cryptosporidiosis in Dairy Cattle from Birth to 2 Years of Age. *Vet Parasitol.* 155(1-2):15-23.
14. Gulliksen SM, Lie KI, Loken T, Osteras O. (2009). Calf Mortality in Norwegian Dairy Herds. *J Dairy Sci.* 92(6): 2782-2795.
15. Pardon B, Hostens M, Duchateau L, Dewulf J, De Bleeker, K, Deprez P. (2013). Impact of Respiratory Disease, Diarrhea, Otitis and Arthritis on Mortality and Carcass Traits in White Veal Calves. *BMC Vet Res.* 9(1):1-14.
16. Imre K, Lobo LM, Matos O, Popescu C, Genchi C, Dărăbuş G. (2011). Molecular Characterisation of *Cryptosporidium* Isolates from Pre-weaned Calves in Romania: Is There an Actual Risk of Zoonotic Infections? *Vet Parasitol.* 181(2-4):321-324.
17. Xiao L, Fayer R. (2008). Molecular Characterisation of Species and Genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and Assessment of Zoonotic Transmission. *Int J Parasitol.* 38(11):1239-1255.
18. Xiao L. (2010). Molecular Epidemiology of Cryptosporidiosis: An Update. *Exp Parasitol.* 124(1):80-89.
19. Díaz P, Varcasia A, Pipia AP, et al. (2018). Molecular Characterisation and Risk Factor Analysis of *Cryptosporidium spp.* in Calves from ITALY. *Parasitol Res.* 117(10):3081-3090.
20. Arslan M, Ekinci A. (2012). Determination of *Cryptosporidium parvum* Subtypes in Cattle in Kars Province of Turkey. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 18(supplA): A221- A226.
21. Yıldırım A, Adanir R, İnci A, et al. (2020). Prevalence and Genotyping of Bovine *Cryptosporidium* species in the Mediterranean and Central Anatolia Region of Turkey. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 69:101425.
22. Guven E, Avcioglu H, Balkaya I, Hayirli A, Kar S, Karaer Z. (2013). Prevalence of Cryptosporidiosis and Molecular Characterization of *Cryptosporidium spp.* in Calves in Erzurum. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 19(6): 969-974.
23. Taylan-Ozkan A, Yasa-Duru S, Usluca S, et al. (2016). *Cryptosporidium* Species and *Cryptosporidium parvum* Subtypes in Dairy Calves and Goat Kids Reared under Traditional Farming Systems in Turkey. *Exp Parasitol.* 170:16-20.
24. Kabir MHB, Ceylan O, Ceylan C, et al. (2020). Molecular Detection of Genotypes and Subtypes of *Cryptosporidium* Infection in Diarrheic Calves, Lambs, and Goat Kids from Turkey. *Parasitol Int.* 79:102163.
25. J Quilez J, Torres E, Chalmers RM, Robinson G, Del Cacho E, Sanchez-Acedo C. (2008). *Cryptosporidium* Species and Subtype Analysis from Dairy Calves in SPAIN. *Parasitology.* 135(14):1613-1620.
26. Kaupke A, Rzeżutka A. (2015). Emergence of Novel Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in Calves in Poland. *Parasitol Res.* 114(12):4709-4716.
27. Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. (2003). Subgenotype Analysis of *Cryptosporidium* Isolates from Humans, Cattle, and Zoo Ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol.* 41(6):2744-2747.
28. Lichtmannsperger K, Hinney B, Joachim A, Wittek T. (2019). Molecular Characterization of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* from Calves with Diarrhoea in Austria and Evaluation of Point-of-care tests. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 66:101333.
29. Mahmoudi M, Hazrati Tapeh K, Abasi E, Sayyadi H, Aminpour A. (2021). Prevalence and Genetic Characterization of *Cryptosporidium* in Pre-weaned Cattle in Urmia (Northwestern Iran). *J Infect Dev Ctries.* 15(3):422-427.
30. Xiao L, Morgan UM, Limor J, et al. (1999). Genetic Diversity within *Cryptosporidium parvum* and Related *Cryptosporidium* Species. *Appl Environ Microbiol.* 65(8):3386-3391.
31. İpek DS. (2017). Prevalence and Molecular Characterisation of *Cryptosporidium spp.* in Diarrhoeic Pre-weaned Goat Kids Reared under Traditional Farming System in Diyarbakır, Southeastern Anatolia City, Turkey. *Rev Med Vet.* 168(10-12): 229-234.
32. Hatam-Nahavandi K, Ahmadvpour E, Carmena D, Spotin A, Bangoura B, Xiao L. (2019). *Cryptosporidium* infections in Terrestrial Ungulates with Focus on Livestock: A Systematic Review and Meta-analysis. *Parasit Vectors.* 12(1):1-23.
33. Burgu A. (1984). Türkiye'de Buzağlarda *Cryptosporidium*'ların Bulunuşu ile İlgili İlk Çalışmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 31(3): 573-585.
34. Aydın F, Umur Ş, Gökçe G, Genç O, Güler MA. (2001). Kars Yöresindeki İshalli Buzağlardan Bakteriyel ve Paraziter Etkenlerin İzolasyonu ve İdentifikasyonu. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 7(1):7-14.
35. Arslan MÖ, Gıcık Y, Erdoğan HM, Sarı B. (2001). Prevalence of *Cryptosporidium spp.* Oocysts in Diarrhoeic calves in Kars, Province. Turkey. *Turk J Vet Anim Sci.* 25(2):161-164.
36. Çitil M, Arslan MÖ, Güneş V, Erdoğan HM. (2004). Neonatal Buzağı İshallerinde *Cryptosporidium* ve *Eimeria spp.* Enfeksiyonlarının Rolü. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 10(1): 59-64.
37. Özlem MB, Eren H, Kaya O. (1997). Aydın Yöresi Buzağlarda *Cryptosporidium*'ların Varlığının Araştırılması. *Bornova Vet Kont Araş Enst Derg.* 22: 15-22.

38. Emre Z, Fidancı H. (1998). Prevalence of Mix Infections of *Cryptosporidium* spp., *Escherichia coli* K 99 and *Rotavirus* in the Faeces of Diarrhoeic and Healthy Cattle in Ankara, Turkey and in Vitro Resistance of *Escherichia coli* K 99 to Antimicrobial Agents. Turk J Vet Anim Sci. 22: 175-178.
39. Ekinci Ö, Sevinç F, Coşkun A, Işık N, Sevinç N. (2011). İshalli Buzağlarda *Cryptosporidiosis*ın Yaygınlığı. Eurasian J Vet Sci. 27(2):123-126.
40. Kuliğ CC, Coşkun A. (2019). Sivas ve İlçelerindeki Neonatal İshalli Buzağlarda *E. coli*, *Cryptosporidium*, *Clostridium perfringens*, *Rotavirüs* ve *Coronavirüs* Prevalansı. Turkish Vet J. 1(2): 69-73.
41. Sarı B, Aktaş MS, Arslan MÖ. (2008). Erzurum Yöresinde Buzağlarda *Cryptosporidium* Türlerinin Prevalansı. Türkiye Parazitoloj Derg. 32(2): 116-119.
42. Aysel N, Ulutaş B, Ünlü H, Hoşgör M, Atasoy A, Karagenc T (2009) Aydın ilinde İshalli Buzağlarda Bulunan *Cryptosporidium* türlerinin Moleküler Karakterizasyonu. XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım, Adana -Türkiye.
43. Şimşek A, İnci A, Yıldırım A, Çiloğlu A, Bişkin Z. Düzlü Ö. (2012). Nevşehir Yöresindeki Yeni Doğan İshalli Buzağlarda *Cryptosporidiosis*'in Real Time PCR ve Nested PCR Yöntemleri ile Saptanması. Erciyes Üniv Vet Fak Derg. 9(2): 79-87.
44. Ouakli, N, Belkhiri A, de Lucio A, et al. (2018). *Cryptosporidium*-Associated Diarrhoea in Neonatal Calves in Algeria. Vet Parasitol: Reg Stud Rep. 12: 78-84.
45. Soltane R, Guyot K, Dei-Cas E, Ayadi A. (2007). *Cryptosporidium parvum* (Eucoccidiorida: Cryptosporiidae) in Calves: Results of a Longitudinal Study in a Dairy Farm in Sfax, Tunisia. Parasite. 14(4): 309-312.
46. Mammeri M, Chevillot A, Chenafi I. et al. (2019). Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Isolates from Diarrheal Dairy Calves in France. Vet Parasitol: Reg Stud Rep. 18:100323.
47. Wu Y, Zhang K, Zhang Y. et al. (2020). Genetic Diversity of *Cryptosporidium parvum* in Neonatal Dairy Calves in Xinjiang, China. Pathogens. 9(9):692.
48. Paul S, Chandra D, Ray DD. et al. (2008). Prevalence and Molecular Characterization of Bovine *Cryptosporidium* Isolates in India. Vet Parasitol. 153(1-2):143-146.
49. Singh BB, Sharma R, Kumar H. et al. (2006). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* Infection in Punjab (India) and Its Association with Diarrhea in Neonatal Dairy Calves. Vet Parasitol. 140(1-2):162-165.
50. Trotz-Williams LA, Jarvie BD, Martin SW, Leslie KE, Peregrine AS. (2005). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* Infection in Southwestern Ontario and its Association with Diarrhea in Neonatal Dairy Calves. Can Vet J. 46(4):349-51.
51. Santín M, Trout JM, Xiao L, Zhou L, Greiner E, Fayer R. (2004). Prevalence and Age-related Variation of *Cryptosporidium* Species and Genotypes in Dairy Calves. Vet Parasitol. 122(2):103-17.
52. Gong C, Cao XF, Deng L, et al. (2017). Epidemiology of *Cryptosporidium* Infection in Cattle in China: A Review. Parasite. 24(1).
53. Xiao L, Feng, Y. (2008). Zoonotic *Cryptosporidiosis*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 52(3), 309-323.
54. Guerrant RL. (1997). *Cryptosporidiosis*: an emerging, highly infectious threat. Emerg Infect Dis. 3(1):51-57.
55. Gharieb RMA, Bowman DD, Liotta JL, Xiao L.(2019). Isolation, Genotyping and Subtyping of Single *Cryptosporidium* Oocysts from Calves with Special Reference to Zoonotic Significance. Vet Parasitol. 271:80-86.
56. Quilez J, Torres E, Chalmers RM, Robinson G, Del Cacho E, Sanchez-Acedo C. (2008). *Cryptosporidium* Species and Subtype Analysis from Dairy Calves in Spain. Parasitology. 135(14):1613-1620.
57. Kaupke A, Rzezutka A. (2015). Emergence of Novel Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in Calves in Poland. Parasitol Res. 114(12):4709-16.
58. Soba B, ogar J. (2008). Genetic Classification of *Cryptosporidium* Isolates from Humans and Calves in Slovenia. Parasitology. 135(11):1263-70.
59. Lichtmannsperger K, Hinney B, Joachim A, Wittek T. (2019). Molecular Characterization of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* from Calves with Diarrhoea in Austria and Evaluation of Point-of-care Tests. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 66:101333.
60. Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. (2003). Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* Isolates from Humans, Cattle, and Zoo Ruminants in Portugal. J Clin Microbiol. 41(6):2744-2747.

✉ Sorumlu Yazar:

Duygu Neval SAYIN İPEK

Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, TÜRKİYE

E-posta: dnsayin@hotmail.com



Dondurulmuş Deniz Ürünlerinde *Vibrio spp.*'nin İlimiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon (Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP) Yöntemiyle Belirlenmesi

Yusuf DOĞRUER^{1,a}, A. Ezgi TELLİ^{1,b,✉}, Nihat TELLİ^{2,c}, Yusuf BİÇER^{1,d}

¹Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE

²Konya Teknik Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Konya, TÜRKİYE

^aORCID: 0000-0002-3712-5021; ^bORCID: 0000-0001-8899-4537; ^cORCID: 0000-0002-4121-4588; ^dORCID: 0000-0001-7549-8323

Geliş Tarihi/Received
30.03.2022

Kabul Tarihi/Accepted
04.05.2022

Yayın Tarihi/Published
30.06.2022

Öz

Araştırmada, deniz ürünlerinde halk sağlığı bakımından yüksek riskli olarak tanımlanan *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* ve *V. cholerae*'nin varlığının belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla örneklerde etken tespiti için hızlı ve etkin bir yöntem olan İlimiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon (Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP) metodu kullanıldı.

Araştırma materyali olarak farklı satış noktalarından temin edilen dondurulmuş deniz ürünleri kullanıldı (n=212). Örneklerde klasik kültür yöntemiyle etken izolasyonu için ISO / TS 21872-1:2007 ve ISO 21872-2:2007 yöntemleri uygulandı. Elde edilen şüpheli izolatlarda gerçekleştirilen DNA ekstraksiyonu sonrasında genus spesifik PCR reaksiyonuyla *gyrB1* gen bölgesi hedeflenerek *Vibrio spp.* varlığı doğrulandı. Pozitif örnekler *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* ve *V. cholerae* için sırasıyla *toxR*, *vwA* ve *ompW* hedef gen bölgelerine yönelik LAMP primer setleri kullanılarak turbidite bazlı Real-Time LAMP uygulandı. Araştırma bulguları değerlendirildiğinde, klasik kültürel yöntemle örneklerin %16.98'inde (36/212) *Vibrio spp.* kontaminasyonu olduğu belirlendi. Bununla birlikte *Vibrio spp.* pozitif izolatlarda LAMP reaksiyonu bulgularına göre *V. cholerae* varlığı tespit edilemezken *V. parahaemolyticus* ve *V. vulnificus* kontaminasyon düzeyleri ise sırasıyla %36.1 (13/36) ve %5.5 (2/36) olarak saptandı. Bu çalışma, dondurulmuş muhafaza uygulanarak satışa sunulan deniz ürünlerinde *V. parahaemolyticus* ve *V. vulnificus* gibi patojenik suşların varlığının tespiti ve bu gıdaların vibriosis bakımından önemini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda deniz ürünlerinde dondurulmuş muhafaza öncesi mikrobiyal kalitenin ve muhafaza esnasındaki koşulların ve hijyenik standartların oluşturulmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Dondurulmuş deniz ürünleri, LAMP, *Vibrio spp.*

Presence of *Vibrio spp.* in Frozen Seafoods by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method

Abstract

In the study, it was aimed to determine the presence of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. cholerae*, which are defined as high risk for public health in seafood. For this purpose, Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) method, which is a fast and effective method for agent detection in samples, was used. Frozen seafoods obtained from different sales points were used as research material (n=212). ISO / TS 21872-1:2007 and ISO 21872-2:2007 methods were applied for the isolation from the samples using the classical cultural method. After DNA extraction performed on the suspected isolates, presence of *Vibrio spp.* was confirmed by genus-specific PCR reaction using the *gyrB1* gene region. A turbidity-based Real-Time LAMP was applied to positive samples using LAMP primer sets for *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. cholerae* targeted gene regions of *toxR*, *vwA* and *ompW*, respectively.

When the results were evaluated, it was determined that 16.98% (36/212) of the samples were contaminated with *Vibrio spp.* using the classical cultural method. However, the presence of *V. cholerae* could not be detected in *Vibrio spp.* positive isolates according to the LAMP reaction, while the contamination levels of *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* were found to be 36.1% (13/36) and 5.5% (2/36), respectively. This study reveals the presence of pathogenic strains such as *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in seafood products sold in frozen storage and the importance of these foods in terms of vibriosis. In this context, it is thought that it is important to establish microbial quality before frozen storage, conditions during storage and hygienic standards in frozen seafood.

Key Words: Frozen seafood, LAMP, *Vibrio spp.*

GİRİŞ

Vibriosis, genellikle yetersiz ısıtma maruz bırakılan balık ve kabuklu deniz ürünlerinin tüketilmesiyle meydana gelen gıda enfeksiyon ve intoksikasyon vakalarında en sık rastlanan etkenlerden olan *Vibrio spp.* tarafından meydana getirilen

hastalık olarak tanımlanmaktadır (1, 2). *Vibrio* türlerinden *V. anguillarum* ve *V. tapetis* gibi türler yalnızca akuatik hayvanlarda gözlenirken *V. cholerae* gibi türler de yalnızca insanlar için oldukça patojen olarak kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra genus içindeki *V. parahaemolyticus* ve *V. vulnificus* gibi

çok az tür de hem insan hem de akuatik hayvanlar için patojen olarak kabul edilmektedir (2-4).

Vibrinoceae familyası; Gram negatif, virgül şeklinde, polar flagellaları ile hareket özelliğine sahip, fakültatif anaerob, katalaz ve oksidaz pozitif basillerden oluşmaktadır. *Vibrio* türleri; D-glikoz, dekstrin, glikojen, N-asetil-D-glikozamin, D-fruktoz, maltoz, D-trehaloz, metil pirüvat, L-asparjin asonit, L-prolin veya inosini karbonhidrat kaynağı olarak kullanırlar (3).

Deniz kaynaklı ürünlerin halofilik *Vibrio* spp., *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* gibi patojenleri bulundurabildiği ve dışıyla kirlenmiş su kaynaklarından elde edilen balık ve kabuklu su ürünlerinin *V. cholerae* gibi fırsatçı patojenleri içerebildiği belirtilmektedir (5). Bunun yanı sıra, soğuk sularda yaşayan balıkların derisinde hakim durumda olan bakteri cinsleri arasında *Vibrio* spp.'nin yer aldığı (6), tatlı su ve deniz balıklarının bağırsak mikroflorasında *Vibrio* türlerine ait bakterilerin bulunduğu bilinmektedir (4, 7). Özellikle yüksek risk taşıyan *Vibrio* türleri (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) dünya genelinde halk sağlığını tehdit eden mikroorganizmalar olarak kabul edilmektedir. Nitekim gıda kaynaklı mikrobiyal etkenler olarak yüksek risk taşıyan *Vibrio* türlerinin gıda ve çevresel kaynaklarda varlığının tespiti yönünde yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. *Vibrio* türleri; gastroenteritis, yumuşak doku enfeksiyonları ve bakteriyeminin ilerlemesiyle sistemik enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Bunun yanı sıra sistemik enfeksiyonlar, duyarlı bireylerde *Vibrio* spp. tarafından oluşturulan fatal septisemi sonucu meydana gelebilmektedir (1, 8).

İlimiğe dayalı izotermal çoğaltma yöntemi (Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP) DNA'yı izotermal koşullarda, yüksek seçicilik, etkinlik ve hızda çoğaltmayı sağlayan bir moleküler yöntemdir. Bu yöntem, DNA polimeraz enzimi ve bakteriye özel gen bölgelerini içeren iki ya da üç çift primerden oluşan primer setini içermektedir (9). İner olarak adlandırılan primer, hedef DNA'ya bağlanarak reaksiyonu başlatıcı etki gösterir. Bir sonraki aşama ise, dış primer vasıtasıyla tek iplikçikli DNA'nın açığa çıkmasıdır. Daha sonra ikincil iç ve dış primerlerin gerçekleştirdiği DNA sentezi için şablon oluşturulmaktadır. Söz konusu primerler, kopyalanacak DNA'nın diğer uç bölgesine bağlanarak kök DNA ilmik parçasını üretir. Bir sonraki aşama ise, iç primerin üretilen ilmiğe hibridize olarak DNA'nın ayrılmasının başlaması ile orijinal kök ilmik DNA ve aynı uzunluktaki yeni kök ilmik DNA elde edilmesidir (10). Reaksiyon döngüsüyle, yaklaşık bir saat gibi kısa bir sürede başlangıç DNA miktarı 10^9 kopyaya erişebilmektedir. PCR bazlı moleküler yöntemler, ek donanımlar gerektirdiğinden geniş kapsamlı laboratuvar şartlarına ihtiyaç duyulmaktadır (9). LAMP metodunun PCR metodundan en önemli farkı, izotermal sıcaklıklarda gerçekleşmesidir. Bunun yanı sıra LAMP metodunda, pozitif olarak tespit edilen örnekler herhangi ileri bir işleme gerek duyulmaksızın gözle görülebilir beyaz bir çökelti oluşumuyla karakterizedir. Bu çökelti, amplifikasyon sonucu oluşan ürünlerin magnezyum sülfat ile birleşmesi sonucu oluşan magnezyum pirofosfattır. Magnezyum pirofosfatın oluşturduğu bulanıklık, çıplak gözle kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (11). Bunun yanı sıra turbidite tespiti sağlayan basit düzenekli cihazlarla kantitatif ölçüm de gerçekleştirilebilmektedir. Son yıllarda geliştirilen ve

pahalı bir aygıt gerektirmeyen, hızlı ve yüksek özgünlüğe sahip olan LAMP, bu özelliği sayesinde teşhisin hızlı yapılması gerekliliği olan gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonların tanısında önümüzdeki yıllarda daha yaygın olarak kullanılacak bir yöntem olarak görülmektedir. LAMP metodu çok sayıda patojen mikroorganizmada olduğu gibi *Vibrio* türlerinin tespitinde de uygulanmıştır (12-16).

Düşük sıcaklıklarda özellikle de dondurulmuş muhafazada mikrobiyal ve enzimatik reaksiyonlar kontrol altına alınsa da patojenler tam olarak yıkılmamakta ve önemli bir kısmı uygun muhafaza sıcaklıklarında yeniden metabolik olarak aktif hale gelebilmektedir. Bu nedenle özellikle son yıllarda Türkiye'de ve Dünya'da tüketimi giderek artan dondurulmuş muhafaza edilen deniz ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesi halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Bu çalışmada, dondurulmuş olarak satışa sunulan deniz ürünlerinde yüksek riskli *Vibrio* türleri olan *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* ve *V. cholerae*'nin LAMP yöntemi ile tespit edilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Numunelerin Temini

Araştırma materyali olarak Konya ilinde bulunan süpermarket ve balık hallerinden 2018 yılı Mart ve Temmuz ayları arasında toplanan örnekler kullanıldı. Toplam 212 adet dondurulmuş deniz ürünü; hamsi fileto (*Engraulis encrasicolus*, n=20), hamsi bütün, (*E. encrasicolus*, n=25), mezgit balık köfte (*Merlangius merlangus*, n=10), ahtapot (*Octopus vulgaris*, n=6), karides (*Parapenaeus longirostris*, n=20), kalamar halka (*Loligo vulgaris*, n=20), kalamar çitir halka (*L. vulgaris*, n=15), kabuklu Akivades midyesi (*Tapes decussatus*, n=15), iç Akdeniz midye (*Mytilus galloprovincialis*, n=15), kabuklu Akdeniz midye (*Mytilus galloprovincialis*, n=15), kabuklu Vongole midye (*Donax trunculus*, n=5), uskumru fileto (*Scomber scombrus*, n=10), sardalya (*Sardina pilchardus*, n=20), surimi çubuk (n=10), kaya levreği (*Argyrosomus regius*, n=6) toplanarak örnekler laboratuvar ortamına parçalanmış buz içeren numune toplama kaplarında getirilip en fazla 2 saat içerisinde analize alındı.

Klasik Kültürel Metot

Klasik kültürel metot, ISO/TS 21872-1:2007 (17) ve ISO 21872-2:2007 (18) prosedürlerine göre uygulandı. Buna göre 25 g numune ve 225 mL alkali tuzlu peptonlu su (ASPW, Liofilchem, 610377), stomacher (Interscience, Fransa) kullanılarak steril bir stomacher poşeti (VWR, 432-3119) içerisinde 2 dk boyunca homojenize edildi. Homojenat, 37°C'de 6 saat ön inkübasyona alındı. Daha sonra, homojenatın üst kısmından 1'er mL alınarak 9'ar mL taze ASPW broth içeren tüplere aktarıldı. *V. parahaemolyticus* ve *V. cholerae* için 41±1°C, *V. vulnificus* için de 37±1°C'de 24 saat inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında ön zenginleştirme kültüründen tiyosülfat sitrat bile sükröz besiyeri (TCBS, Merck, 110263, Almanya) üzerine yayma plak yöntemi uygulanarak 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. TCBS Agarda gözlenen şüpheli *Vibrio* kolonilerinden 5'er adet seçildi ve %3 NaCl (w/v) ilaveli Nutrient Agar (Merck 105450, Almanya) üzerine yayma plak

yöntemiyle ekildi. Daha sonra şüpheli izolatlar oksidaz, katalaz, Gram boyama, mikroskop altında motilite testi, %0 ve %6 NaCl'de üreme açısından test edildi. *Vibrio spp.* şüpheli kolonilerin klasik PCR reaksiyonu ile doğrulanması amacıyla 493 bp büyüklüğündeki *gyrB* gen bölgesinin tespitine yönelik olan ve Teh ve ark. (19) tarafından dizayn edilen primer çifti kullanıldı (Tablo 1).

Tablo 1. *Vibrio* türlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler

Primer	Sekans	Kaynak
<i>toxR</i> -FIP	TGAGATTCGCGAGGGTTGTAA-TTATTTTT-GGCACCTACTACCG	20
<i>toxR</i> BIP	GTTCCGTCAGATTGGTGTAGATC-TAGAAGGCAACCGATTGTT	
<i>toxR</i> -F3	TTGGATTCCACGCGTTAT	
<i>toxR</i> -B3	CGTTCAATGCACGTCTCA	
<i>toxR</i> -Loop	AGAACGTACCAGTGATGACACC	
<i>vvhA</i> -FIP	TGCCACTCGGCTACGATAACGTTTTT-GAGCTGTCACGGCAGTTG	12
<i>vvhA</i> -BIP	ACGCAGACAAAACGCTCACAGTTTTT-GAGCTTATCGCTTCCCAAT	
<i>vvhA</i> -F3	TGGTTCGGTTAACGGCTG	
<i>vvhA</i> -B3	GCCATCAACATAGCGGCTAA	
<i>ompW</i> -FIP	CAAGCGTTAACCCTAAGTGGGTATTTTT-TAAAGTGTTAAACACTCAAAGTGAG	21
<i>ompW</i> BIP	ACATCAGTTTTGAAGTCTCGCTTTTTAT-CACCAAGGCTACCTAAC	
<i>ompW</i> -F3	CGGTAGTACCTAATGACAGTAG	
<i>ompW</i> -B3	GCAAATGTTTTGTTCCACCAAT	
<i>ompW</i> -Loop	ACATAAGATTTCTACCTCTGGTGGT	
<i>gyrB1</i>	AGCCAAACNAAAGAYAARYT	19
<i>gyrB2</i>	CGYARYTRTCYGGRTTRTRYTC	

Referans Suşlar

Genus düzeyi ve tür düzeyinde pozitif kontrol amaçlı *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. vulnificus* ATCC 29307 ve *V. cholerae* ATCC 14035 suşları referans olarak kullanıldı.

DNA Ekstraksiyonu

Saf kültür ve toplanan numunelerden DNA ekstraksiyonu amacıyla kaynatma yöntemi kullanıldı. Bu amaçla *Vibrio spp.* şüpheli olduğu tespit edilen kolonilerden 3-4 adet seçilerek 200 µL Tris-EDTA (TE, pH:8.0) solüsyonu içerisinde vorteks-lendi. Elde edilen bu bakteri süspansiyonu 95°C'lik ısıtıcı blokta 8 dk bekletildikten sonra 2-3 dk süre ile -20°C'deki buzdolabında bekletildi. Son olarak 10.000 g'de santrifüj işlemi (Nüve NF 1200 R, Türkiye) gerçekleştirildikten sonra süpernatant yeni bir eppendorf tüpe aktararak LAMP reaksiyonu uygulanacak zamana kadar -20°C'deki buzdolabında muhafaza edildi.

LAMP

Klasik kültürel yöntemde *Vibrio spp.* şüpheli olarak değerlendirilen ve sonrasında *gyrB* bazlı PCR ile pozitif olarak doğrulanan örnekler LAMP yöntemi uygulandı. LAMP yönteminde hedef gen bölgeleri için, önceki çalışmalarda (12, 20, 21) dizayn edilen primerler kullanılmıştır.

LAMP reaksiyonu ile *V. parahaemolyticus* (*toxR*), *V. vulnificus* (*vvhA*) ve *V. cholerae* (*ompW*)'nın tür düzeyinde belirlenebilmesi ve Klasik PCR yöntemi ile *Vibrio spp.* (*gyrB*) şüpheli izolatlarının genus düzeyinde doğrulanması için kullanılan gen bölgelerine ait primer setleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Farklı konsantrasyonlardaki *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* ve *V. vulnificus* saf kültürlerinden elde edilen DNA dilüsyonları ile hazırlanan LAMP reaksiyon karışımının Real Time Turbidimetre (MVL300 Loopamp Realtime Turbidimetre LA-500, Eiken, Japonya)'de sıcaklık, reaksiyon süresi, MgSO₄ konsantrasyonu, primer oranları yönünden optimizasyonu sağlandı. Buna göre, LAMP reaksiyon karışımı, F3 ve B3 primerleri (0.5 µM), FIP ve BIP primerleri (0.8 µM), Loop Primerleri (0.4 µM), Reaksiyon Tampon çözeltisi (10X) (2.5 µL), MgSO₄ (6 mM), 1 mL Bst DNA polimeraz (8U/µL, New England Biolab) ve 2 µL hedef DNA içerecek şekilde hazırlandı. Optimize edilen koşullarda analiz edilen örneklerdeki hedef bakteri varlığı, elde edilen time threshold (*tt*) değerine göre belirlendi.

BULGULAR

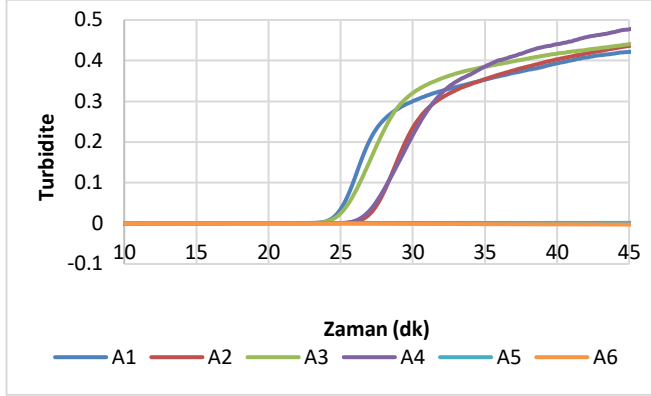
Araştırma sonuçlarına göre, analiz edilen 212 adet dondurulmuş deniz ürününün 36 (%16.98)'sı *Vibrio spp.* olarak doğrulandı. *Vibrio spp.* pozitif örneklerde LAMP metodu ile tespit edilen patojen türlerin sayısı ise 15/36 (%41.7) olarak belirlendi (Tablo 2).

Numune türleri	<i>Vibrio spp.</i>	V.c	V.p	V.v	TOPLAM
Hamsi (fileto n=20)	1	-	-	-	-
(<i>Engraulis encrasicolus</i>)					
Hamsi (bütün, n=25)	4	-	-	-	-
(<i>E. encrasicolus</i>)					
Balık köfte (mezgıt, n=10)	-	-	-	-	-
(<i>Merlangius merlangus</i>)					
Ahtapot (n=6)	1	-	1	-	1
<i>Octopus vulgaris</i>					
Karides (n=20)	3	-	1	-	1
<i>Parapenaeus longirostris</i>					
Kalamar (halka, n=20)	4	-	3	-	3
<i>Loligo vulgaris</i>					
Kalamar (çıtır halka, n=15)	10	-	6	2	8
<i>Loligo vulgaris</i>					
Kabuklu Akivades midyesi (n=15)	2	-	-	-	-
<i>Tapes decussatus</i>					
İç Akdeniz midye (n=15)	2	-	2	-	2
<i>Mytilus galloprovincialis</i>					
Kabuklu Akdeniz midye (n=15)	1	-	-	-	-
<i>Mytilus galloprovincialis</i>					
Kabuklu Vongole midye (n=5)	2	-	-	-	-
<i>Donax trunculus</i>					
Uskumru fileto (n=10)	1	-	-	-	-
<i>Scomber scombrus</i>					
Sardalya (n=20)	5	-	-	-	-
<i>Sardina pilchardus</i>					
Surimi çubuk* (n=10)	-	-	-	-	-
Kaya levreği (n=6)	-	-	-	-	-
<i>Argyrosomus regius</i>					
TOPLAM	36	-	13	2	15

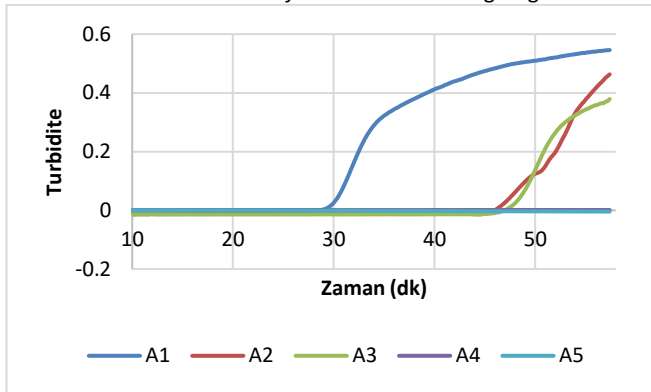
V.c.: *V. cholerae*; V.p.: *V. parahaemolyticus*; V.v.: *V. vulnificus*

*: İçerik bilgisinde çeşitli beyaz etli balık türlerinden üretildiği belirtilmektedir.

V. parahaemolyticus ve *V. vulnificus* pozitif örneklerin bazılarının Real Time Turbidimetredeki *tt* değerlerine ait grafikler Grafik 1 ve Grafik 2'de gösterilmektedir.

Grafik 1. *V. parahaemolyticus* pozitif örneklerinin bazılarında time threshold (tt) grafiği

A1: Pozitif kontrol (*V. parahaemolyticus* ATCC 17802); A2-A4: Pozitif örnekler; A5,A6: Negatif kontrol

Grafik 2. *V. vulnificus* örneklerinin tt grafiği

A1: Pozitif kontrol (*V. vulnificus* ATCC 29307); A2,A3: pozitif örnekler; A4, A5: Negatif kontrol

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada dondurulmuş deniz ürünlerinde önemli patojen etkenlerden olan *Vibrio spp.*'nin analize alınan örneklerdeki tespit oranı 36/212 (%16.98) olarak bulunmuştur. Taze ve dondurulmuş deniz ürünlerinde *Vibrio spp.* varlığını belirlemeye yönelik olarak gerçekleştirilen ulusal ve uluslararası düzeydeki çalışmalarda çalışmamızdan yüksek (22-25) ve düşük (26) kontaminasyon oranlarının tespit edildiği gözlemlenmiştir.

Noorlis ve ark. (22), Malezya'da hipermarketlerde satışı sunulan tatlı su balıklarından Asya kedi balığı (*Pangasius hypophthalmus*) ve kırmızı tilapia (*Oreochromis sp.*) türlerine ait 150 numunede MPN-PCR metoduyla *Vibrio spp.* ve *V. parahaemolyticus* varlığını araştırmışlardır. Araştırmacılar, örneklerde *Vibrio spp.* kontaminasyon oranlarını %98.67 olarak bulmuşlardır. Benzer bir çalışmada Raissy ve ark. (23), 100 adet istakoz ve 32 adet yengeç örneğinde *Vibrio spp.* kontaminasyon oranını %25 olarak tespit etmişlerdir. Son yıllarda yapılan ulusal bir çalışmada ise Avşar ve ark. (24), Sinop ilindeki balıkçılardan temin edilen 44 adet hamsi ve zargana balık örneklerinden klasik kültürel yöntemle 12 adet (%27.27) *Vibrio spp.* izole etmişlerdir. Dondurulmuş örneklerde benzer düzeyde kontaminasyon oranları, Vu ve ark. (25) tarafından Berlin'de *Vibrio spp.* varlığının araştırıldığı çalışmada 6/29 (%34.6) olarak bulunmuştur. Mevcut çalışmamızdan

daha düşük *Vibrio spp.* kontaminasyon düzeyi (%11) Ripabelli ve ark. (26) tarafından İtalya ve bazı Avrupa ülkelerinden toplanan dondurulmuş deniz ürünlerinde belirlenmiştir.

Bu çalışmada kontaminasyon oranının taze ürünlerdeki oranlara göre düşük bulunması, düşük sıcaklıkta muhafaza özellikle de dondurulmuş muhafazanın patojen kontrolünde etkili olduğu görüşünü destekler niteliktedir. Dondurulmuş muhafazanın etken tespit oranını azaltması yönünde sağlamış olduğu etkinin yanı sıra, deniz ürünlerinde mikrobiyal kaliteyi etkileyen birçok faktörün (örn., suyun mikrobiyal kalitesi, sıcaklığı, tuzluluk oranı, kirliliğin olduğu yerleşim bölgelerine olan mesafe, sudaki doğal bakteriyel flora, balıklar tarafından tüketilen besinler, avlama yöntemleri ve soğutma koşulları) kontaminasyon oranlarında farklılıklar oluşturabileceği ifade edilmektedir (27, 28).

Çalışmada *Vibrio spp.* olarak tespit edilen izolatlarda *toxR* gen bölgesinin tespitine yönelik gerçekleştirilen LAMP reaksiyonunda 13 (13/36, %36.1) örneğin *V. parahaemolyticus* pozitif olduğu tespit edilmiştir. Tüm örnekler dikkate alındığında ise *V. parahaemolyticus* pozitif örnekler 13/212 (%6.13) olarak tespit edilmiştir. Araştırma bulgularından daha yüksek (29, 30, 31) ve daha düşük (23, 32, 33, 34) kontaminasyon oranları elde edilen çalışmalar bulunmaktadır. Nitekim, Elhadi ve ark. (32) tarafından Malezya'da satışa sunulan 768 adet deniz ürününde *V. parahaemolyticus* kontaminasyon oranı %6.7 olarak bulunmuştur. Benzer şekilde Yang ve ark. (29) Çin'de marketler, balık çiftlikleri, restoranlar ve pişirme yerlerinden topladıkları 1293 adet deniz ürününün 251 (%19.4) tanesinin *V. parahaemolyticus* ile kontamine bulunduğunu bildirmişlerdir. Daha yüksek kontaminasyon oranına sahip bir başka çalışmada ise Tang ve ark. (31) Malezya'da *V. parahaemolyticus* varlığı ve antibiyotik direnç özelliklerini belirlemeye yönelik yapmış oldukları çalışmada toplam 80 adet midye, istiridye ve deniz tarağı örneğinde örnek gruplarına göre %40 ile %80 arasında bir kontaminasyon oranı tespit etmişlerdir. Bunun yanı sıra, Popovic ve ark. (33) tarafından 2010 yılında Hırvatistan'da yapılan bir çalışmada balık, midye, kabuklu ve yumuşakça türlerinden oluşan taze ve dondurulmuş deniz ürünlerinde *V. parahaemolyticus* tespit edilen örneklerin %5, İran'da Raissy ve ark. (23) tarafından yengeç ve istakozlarda yapılan çalışmada %3.03 ve daha yakın zamanda COVID pandemisi öncesi Dünya'nın deniz aşırı altı farklı bölgesinden Çin'e ihraç edilen deniz ürünlerinde incelenen 140 örneğin 8'inde (%5.7) pozitif olarak gözlemlenen kontaminasyon oranı ile çalışmamızdan daha düşük düzeye sahip olduğu gözlemlenmiştir (34). Taze ve dondurulmuş ürünlerde daha önce yapmış olduğumuz çalışmamızda ise dondurulmuş balık ve karideslerde *V. parahaemolyticus* kontaminasyon oranı LAMP yöntemiyle sırasıyla %2 ve %4 olarak tespit edilmiştir (16). Mevcut çalışmamızda gözlemlenen nispeten daha yüksek kontaminasyon oranının ise ön zenginleştirme ve klasik kültürel yöntemin dondurulmuş muhafaza esnasında hasara uğramış olan bakteri hücrelerinin yeniden kültüre edilebilir forma geçebilmeleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde Sadeghi ve ark. (35), dondurulmuş karideslerde ön zenginleştirme işleminin direkt kültür yöntemiyle karşılaştırıldığında TCBS agarda üreyen *V. parahaemolyticus*'un selektivitesini arttırdığını ortaya koymuştur.

İzolatlarda *V. vulnificus* varlığının tespiti amacıyla gerçekleştirilen LAMP reaksiyonunda iki izolatin (2/36, %5.5) tür spesifik *vvhA* gen bölgesine sahip olduğu bulunmuştur. *V. vulnificus* kontaminasyon oranının daha yüksek (23, 36) ve daha düşük bulunduğu çalışmalar (25) bulunmaktadır. Nitekim, Raissy ve ark. (23) yengeç ve istakozlarda *Vibrio* spp. türlerini belirledikleri çalışmada *V. vulnificus* tespit düzeyini %13.6 olarak bulmuşlardır. Benzer bir çalışmada Turner ve ark. (36), toplam 210 adet su ve plankton örneğinden *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* ve *V. cholerae* izole etmişlerdir. Örneklerden en çok identifiye edilen *Vibrio* türleri, çalışmamızla benzer şekilde sırasıyla *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* ve *V. cholerae* şeklinde olmuştur. Daha düşük kontaminasyon oranı, Vu ve ark. (25) tarafından Berlin'de satışı sunulan deniz ürünlerinde toplam 160 adet örnekte gerçekleştirilen çalışmada %0.6 olarak tespit edilmiştir.

V. cholerae'nin belirlenmesi amacıyla yapılan *ompWA* gen bölgesinin tespitine yönelik LAMP reaksiyonunda ise izolatların hiçbirinde *V. cholerae* bulunamamıştır. Benzer şekilde *V. cholerae*'nin tespit edilmediği çalışmalar (23, 37) olduğu gibi mikroorganizmanın farklı düzeylerde kontaminasyon varlığını bildiren çok sayıda araştırma da (32, 38, 39) bulunmaktadır.

Ulusal düzeydeki bir çalışmada İrkin ve ark. (37), Marmara ve Ege Denizi'nden avlanan ve işlenerek ihraç edilen karides numunelerinde klasik kültürel yöntemle *V. cholerae* varlığının saptanmadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Raissy ve ark. (23) yengeç ve istakoz örneklerinde *Vibrio* spp. olarak tespit ettikleri izolatlarda *V. cholerae* varlığına rastlamadıklarını ifade etmişlerdir. Mevcut çalışmamızdan farklı şekilde Wong ve ark. (38), dondurulmuş deniz ürünlerinde *Vibrio* spp. türlerini identifiye ettikleri çalışmada *V. cholerae* kontaminasyon oranını %14.9; Elhadi ve ark. (32) ise Malezya'da karides, kalamar, yengeç, istiridy ve midyelerde *V. cholerae* kontaminasyon oranını %4.7 olarak tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, Ottaviani ve ark. (39) tarafından lokal ve ithal deniz ürünlerinde O1 ve non-O139 *V. cholerae* tespiti amacıyla yapılan çalışmada toplam *V. cholerae* kontaminasyon oranı %5.6 olarak tespit edilmiştir.

Araştırma sonuçlarına göre *Vibrio* spp. pozitif örneklerde en çok identifiye edilen tür *V. parahaemolyticus* ve daha sonra *V. vulnificus* şeklinde olmuştur. Bu açıdan değerlendirildiğinde benzer kontaminasyon oranlarına sahip çalışmalar (36) bulunmakla birlikte örneklerin toplanma yeri, su sıcaklığı, avlanma dönemi ve suyun tuzluluk oranı gibi pek çok faktöre bağlı olarak daha farklı kontaminasyon dağılımına sahip çalışmalar da (38, 40) bulunmaktadır.

Wong ve ark. (38) tarafından satışı sunulan dondurulmuş deniz ürünlerinde *Vibrio* türlerini belirlemeye yönelik gerçekleştirilen çalışmada *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* ve *V. fluvialis*'in tespit oranlarının sırasıyla %36.0, %15.8, %14.9 ve %13.2 olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızdan farklı tür dağılımlarına sahip bir başka çalışmada Yano ve ark. (40), Tayland'da yetiştirme karideslerde patojenik *Vibrio* türlerinin prevalansını araştırdıkları çalışmada 16 karides örneğinin 15 tanesinde *V. cholerae*, 6 tanesinde *V. parahaemolyticus* ve 2 tanesinde *V. vulnificus* tespit etmişlerdir.

Araştırma kapsamında deniz ürünleri kaynaklı gıda enfeksiyon ve intoksikasyon vakalarında en sık rastlanan etkenlerden olan *Vibrio* spp. tespiti halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde özellikle dondurulmuş deniz ürünlerinde uygun çözündürme ve yetersiz ısı işlem uygulanmasının enfeksiyon ve intoksikasyon riskini arttırabileceği göz önüne alınmalıdır. Bununla birlikte, gıda kaynaklı hastalıkların önemli bir kaynağını oluşturan deniz ürünlerinde önem arz eden mikrobiyal etkenlerin LAMP gibi pahalı alt yapı gerektirmeyen, yüksek özgünlüğe sahip, kısa sürede tespit sağlayan moleküler yöntemlerle araştırılmasının yaygınlaştırılması gerektiği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Araştırmayı 15401068 numaralı proje ile destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederiz. Araştırma özeti "3rd International Congress on Advances in Veterinary Science and Technics (ICAVST)" Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

1. Ina-Salwany MY, Al-saari N, Mohamad A et al. (2019). Vibriosis in Fish: A Review on Disease Development and Prevention. J Aquat Anim Health. 31 (1): 3-22.
2. Helmi AM, Mukti AT, Soegianto A, Effendi MH. (2020). A Review of Vibriosis in Fisheries: Public Health Importance. Sys Rev Pharm. 11 (8): 51-58.
3. Janda JM, Newton AE, Bopp CA. (2015). Vibriosis. Clin. Lab. Med. 35(2): 273-288.
4. Baker-Austin C, Oliver JD, Alam M et al. (2018). *Vibrio* spp. infections. Nat Rev Dis Primers. 4(1): 1-19.
5. Heperkan D. (2016). Temel Gıda Mikrobiyolojisi, Editör: Heperkan D. Bölüm: Gıdaların Normal Mikrobiyolojik Kalitesi ve Önemi. Osmanlı Mücellit Matbaacılık, Bursa. s.41-50.
6. Al-Ashhab A, Alexander-Shani R et al. (2022). Fish Skin Microbiota Under Healthy and Diseased Conditions. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1311488/v1>.
7. Liu C, Zhao LP, Shen YQ (2021). A Systematic Review of Advances in Intestinal Microflora of Fish. Fish Physiol. Biochem. 47(6): 2041-2053.
8. Zarei M, Borujeni MP, Jamnejod A, Khezrzhadeh M. (2012). Seasonal Prevalence of *Vibrio* species in Retail Shrimps with an Emphasis on *Vibrio parahaemolyticus*. Food Control. 25: 107-109.
9. Garg N, Ahmad FJ, Kar S. (2022). Recent Advances in Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Rapid and Efficient Detection of Pathogens. CRMICR, 3, 100120. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100120>
10. Mori Y, Notomi T. (2009). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): a Rapid, Accurate, and Cost-effective Diagnostic method for Infectious Diseases. J. Infect. Chemother. 15(2): 62-69.
11. Tomita N, Mori Y, Kodama H, Notomi T. (2008). Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of Gene Sequences and Simple Visual Detection of Products. Nat Protoc. 3: (877-882).

12. Ren CH, Hu CQ, Luo P, Wang QB. (2009) Sensitive and Rapid Identification of *Vibrio vulnificus* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Microbiol Res.* 164(5): 514-521.
13. Okada K, Chantaroj S, Taniguchi T, Suzuki Y, Roobthaisong A, Puiprom O, Honda T, Sawanpanyalert P. (2010). A Rapid, Simple and Sensitive Loop-mediated Isothermal Amplification Method to Detect Toxigenic *Vibrio cholerae* in Rectal Swap Samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 66:135-139.
14. Jones JL, Hara-Kudo Y, Krantz JA et al. (2012) Comparison of Molecular Detection Methods for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *Food Microbiol.* 30:105-111.
15. Telli AE, Doğruer Y. (2019). Discrimination of Viable and Dead *Vibrio parahaemolyticus* Subjected to Low Temperatures Using Propidium Monoazide—quantitative Loop Mediated Isothermal Amplification (PMA-qLAMP) and PMA-qPCR. *Microb Pathog.* 132: 109-116.
16. Doğruer Y, Telli AE. (2020). Determination of *Vibrio parahaemolyticus* in Seafoods Using Direct Plate Counting, Quantitative Loop-Mediated Isothermal Amplification and Propidium Monoazide-qLAMP. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* 67(4): 349-355.
17. International Organization for Standardization (2007). ISO/TS 21872–1:2007. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs — Horizontal Method for the Detection of Potentially Enteropathogenic Vibrio spp.* —part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. <https://www.iso.org/standard/38278.html>.
18. International Organization for Standardization (2007). ISO/TS 21872–2:2007. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs — Horizontal Method for the Detection of Potentially Enteropathogenic Vibrio spp.* — Part 2: Detection of Species Other than *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. International Organization for Standardization (ISO). <https://www.iso.org/standard/38279.html>.
19. Teh CSJ, Chua KH, Thong KL (2010): Simultaneous Differential detection of Human Pathogenic and Nonpathogenic *Vibrio* Species Using a Multiplex PCR Based on *gyrB* and *pntA* genes. *J Appl Microbiol.* 108: 1940-1945.
20. Chen S, Ge B. (2010). Development of a *toxR*-based Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Detecting *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiol.* 10(41): 1-9.
21. Srisuk C, Chaivisuthangkura P, Rukpratanporn S, Longyant S, Sridulyakul P, Sithigorngul P. (2010). Rapid and Sensitive Detection of *Vibrio cholerae* by Loop-mediated Isothermal Amplification Targeted to the Gene of Outer Membrane Protein *ompW*. *Lett Appl Microbiol.* 50(1): 36-42.
22. Noorlis A, Ghazali FM, Cheah YK ve ark. (2011). Prevalence and Quantification of *Vibrio* Species and *Vibrio parahaemolyticus* in Freshwater Fish at Hypermarket Level. *Int Food Res J.* 18 (2): 689-695.
23. Raissy M, Moumeni M, Ansari M, Rahimi E. (2012). Occurrence of *Vibrio* spp. in Lobster and Crab From the Persian Gulf. *J Food Safety.* 32: 198-203.
24. Avşar C, Berber İ, Yıldırım AK. (2016). Sinop İlindeki Hamsi ve Zargana Balıklarından *Vibrio* spp. İzolasyonu ve Karakterizasyonu. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 73(2): 121-130.
25. Vu TTT, Alter T, Huehn S. (2018). Prevalence of *Vibrio* spp. in Retail Seafood in Berlin, Germany. *J Food Protection.* 81(4): 593-597.
26. Ripabelli G, Sammarco ML, Fanelli I, Grasso GM. (2004). Detection of *Salmonella*, *Listeria* spp., *Vibrio* spp., and *Yersinia enterocolitica* in Frozen Seafood and Comparison with Enumeration for Faecal Indicators: Implication for Public Health. *Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunità.* 16(4): 531-539.
27. Beyari EA, Aly MM, Jastaniah SD. (2021). Incidence of Food-borne Bacteria That Cause Serious Health Hazards in Fish: A Review. *Annals of Medical and Health Sciences Research| Volume, 11(S4).*
28. Wei Q, Wang X, Sun DW, Pu H. (2019). Rapid Detection and Control of Psychrotrophic Microorganisms in Cold Storage Foods: A Review. *Trends Food Sci Technol.* 86: 453-464.
29. Yang ZQ, Jiao XA, Zhou XH, Cao GX, Fang WM, Gu RX. (2008). Isolation and Molecular Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from Fresh, Low-temperature Preserved, Dried, and Salted Seafood Products in Two Coastal Areas of Eastern China. *Int J Food Microbiol.* 125(3): 279-285.
30. Rodriguez Castro A, Ansedo-Bermejo J, Blanco-Abad V, Varela-Pet J, Garcia-Martin O, Martinez-Urtaza J. (2010). Prevalence and Genetic Diversity of Pathogenic Populations of *Vibrio parahaemolyticus* in Coastal Waters of Galicia, Spain. *Environ Microbiol Rep.* 2 (1): 58-66.
31. Tang JYH, Wan-Rosli WF, Abdul-Razak NH, Yeo CC, Abu Bakar CA, Son R. (2014). Incidence and Antibigram of *Vibrio parahaemolyticus* in Processed and Frozen Bivalve Mollusks in Kuala Terengganu, Malaysia. *Int Food Res J.* 21(4): 1349-1353.
32. Elhadi N, Radu S, Chen CH, Nishibuchi M. (2004) Prevalence of potentially Pathogenic *Vibrio* Species in the Seafood Marketed in Malaysia. *J Food Protection.* 67(7): 1469-1475.
33. Topić Popović N, Benussi Skukan A, Džidara P. ve ark. (2010). Microbiological Quality of Marketed Fresh and Frozen Seafood Caught off the Adriatic Coast of Croatia. *Vet med.* 55(5): 233-244.
34. Fu S, Wang W, Wang Q, He F, Hao J, Pang B. (2021). Surveillance of Enteric Pathogens in Imported Seafood and Environmental Surfaces in Five Seafood Markets before the Outbreak of COVID-19. *Biosafety and Health.* 3(4): 183-186.
35. Sadeghi S, Thong KL, Chai LC. (2019). Pre-enrichment Step, Incubation Temperature and Type of Selective Media Affect the Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Detection Efficiency in Frozen Prawns. *JCF.* 14(4): 355-364.
36. Turner JW, Malayil L, Guadagnoli D, Cole D, Lipp EK. (2013). Detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* with Respect to Seasonal Fluctuations in Temperature and Plankton Abundance. *Environ Microbiol.* 16(4): 1019-1028.
37. İrkin R, Korukluoğlu M, Tavşanlı H. (2007). Microbial Properties of Some Sea Products Intended for Export. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 64 (1): 26-30.
38. Wong HC, Chen LL, Yu CM. (1995). Occurrence of vibrios in frozen Seafoods and Survival of Psychrotrophic *Vibrio cholerae* in Broth and Shrimp Homogenate at Low Temperatures. *J food protection.* 58(3): 263-267.
39. Ottaviani D, Leoni F, Rocchegiani E, et al. (2009) Prevalence and Virulence Properties of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* Strains from Seafood and Clinical Samples Collected in Italy. *Int J Food Microbiol.* 132(1): 47-53.
40. Yano Y, Hamano K, Satomi M, Tsutsui I, Ban M, Aue-Umneoy D. (2014). Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Vibrio* species Related to Food Safety Isolated from Shrimp Cultured at Inland Ponds in Thailand. *Food Cont.* 38: 30-36.

✉ Sorumlu Yazar:

A. Ezgi TELLİ

Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE

E-posta: ezgiyilmaz@selcuk.edu.tr



Farklı Kedi Irklarının Testislerinde Sitokeratin 8'in İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu

Uğur TOPALOĞLU^{1,a,✉}, Zela KARAKOÇ^{2,b}, Mehmet Erdem AKBALIK^{1,c}, Berna GÜNEY SARUHAN^{1,d}, Nurşin AYDIN^{1,e}

¹Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, TÜRKİYE

²Dicle Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı, Diyarbakır, TÜRKİYE

^aORCID: 0000-0002-8306-491X; ^bORCID: 0000-0002-0723-4059; ^cORCID: 0000-0001-9898-0593;

^dORCID: 0000-0002-5111-5424; ^eORCID: 0000-0003-0265-3163

Geliş Tarihi/Received
22.04.2022

Kabul Tarihi/Accepted
18.05.2022

Yayın Tarihi/Published
30.06.2022

Öz

İntermediyer filamanlar kökeni ve hücre tipi farklı proteinler tarafından oluşturulan hücre iskeleti bileşenlerine ait proteinlerdir. Bu proteinlerin testiste; Sertoli, peritübüler miyoid ve Leydig hücrelerinde bulunduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, testis fizyolojisi için önemli olan ve testisteki hücre iskeleti yapısına katılan sitokeratin 8 proteininin; İran, Ankara ve Van ırkı kedilerin testis dokusundaki lokalizasyonlarını immunohistokimya tekniğine göre ortaya koymaktır. Araştırmada sağlıklı yavru (dokuz çift) ve yetişkin (dokuz çift) kedilerden alınan doku örnekleri kullanıldı. Alınan doku örnekleri rutin histolojik işlemlerin ardından immunohistokimyasal streptavidin-biotin-peroksidaz kompleks boyama metoduna tabi tutuldu. Elde edilen boyama sonuçlarında, yavru ve yetişkin kedilerde incelenen alanlarda sitokeratin 8 immunoreaktivitesinin ırklara göre farklılık göstermediği saptandı. Bununla birlikte intersitisyel dokuda ve Leydig hücrelerinde immunoreaktivitenin negatif olduğu fakat Sertoli ve germ hücrelerinde ise çekirdek etrafında şekillendiği görüldü. Ayrıca epididimis ve deferens kanallarının epitellerinde de sitoplazma ve çekirdekte pozitif immunreaksiyonun olduğu belirlendi. Elde edilen bulgular sonucunda sitokeratin 8'in olgun kedilerde bir kısım farklılıkları türe özgü oluşturabildiği ve kedi testislerindeki bazı hücrelerin iskelet yapısına katılarak spermatogenezisin olgunlaşması, korunması ve spermilerin taşınması gibi önemli roller üstlenebileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Ductus deferens, epididimis, kedi, sitokeratin, testis.

Immunohistochemical Localization of Cytokeratin 8 in Testes of Different Cat Breeds

Abstract

Intermediate filaments are proteins belonging to cytoskeletal components formed by proteins of different origin and cell types. These proteins are known to exist in the testis; Sertoli, peritubular myoid and Leydig cells. The aim of this study is to determine cytokeratin 8 protein, which is important for testicular physiology and participates in the cytoskeletal structure of the testis; To reveal the localization of Iranian, Ankara and Van breed cats in testicular tissue using immunohistochemistry technique. Tissue samples from healthy kittens (nine pairs) and adult (nine pairs) cats were used in this study. Tissue samples were subjected to immunohistochemical streptavidin-biotin-peroxidase complex staining method after routine histological procedures. In the staining results obtained, it was seen that cytokeratin 8 immunoreactivity in the examined areas in kittens and adult cats did not differ according to breeds. However, it was observed that immunoreactivity was negative in interstitial tissue and Leydig cells, but formed around the nucleus in Sertoli and germ cells. In addition, it was determined that there was a positive immunoreaction in the cytoplasm and nucleus in the epithelium of the epididymis and deferens ducts. As a result of the findings obtained, it was thought that cytokeratin 8 may cause some differences in mature cats and may play important roles such as the maturation of spermatogenesis, protection and transport of sperm by participating in the skeletal structure of some cells in the cat testicles.

Key Words: Cat, cytokeratin, ductus deferens, epididymis, testes.

GİRİŞ

Hücre iskelet sistemi (sitoskeleton); mikofilamanlar, mikrotübüller ve intermediyer filamanlar olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. İntermediyer filamanlar da kendi içerisinde desmin, vimentin, sitokeratin, glial ve nörofilamentler olarak sınıflandırılır. Sitokeratinler intermediyer filamanların en büyük ve en çok alt guruba sahip olan proteinler olarak bilinirler

(1). Sitokeratinlerdeki bu gruplandırma; küçük molekül yapısına sahip ve asidik olan Tip1 ile büyük molekül yapısına sahip ve bazik olan Tip2 olarak kendi içerisinde sınıflandırılır. Tek sıralı epitel dokusunda, Tip1 ve Tip2 proteinlerinin heteropolimerizasyon yoluyla sitokeratin filamanları oluşur. Sitokeratin 8 (St8) de bu yolla oluşan intermediyer filamanlardır. İntermediyer filamanlar, hücrenin kökenine bağlı olarak farklı hücrelerde yerleşim gösteren yapılar olup sitokeratinler genel olarak epitel farklılaşmasında görev alırlar (2,3).

Testislerin esas yapısını seminifer tubüller, Leydig hücrelerinde bulunduğu gevşek intersitsiyel bağ dokusu oluşturur. Her seminifer tubül bir bazal membran, elastik lifler ve peritübüler miyoid hücrelerden oluşmaktadır. Seminifer tubül bazal membranı, içerisinde somatik Sertoli hücreleri ve germ hücrelerinden oluşan sütunlu bir epitel ile kaplanmıştır (4). Sütunlu epitelin bazal bölümü de Sertoli hücreleri ile birlikte spermatogonia ve preleptoten/leptoten spermatositleri içerir. Adluminal bölümünde ise farklılaşan primer spermatositler ve germ hücreleri yer alır (5). Spermlerin farklılaşması ve gelişmesinin ardından olgunlaşması, depolanması ve taşınması oldukça kıvrımlı bir tubüler yapı olan epididimis ve deferens kanallarında gerçekleşir (6).

İntermediyer filamanlar kökeni ve hücre tipi farklı proteinler tarafından oluşturulan ve testiste; Sertoli hücreleri, peritübüler-miyoid hücreler ve Leydig hücreleri dahil birçok hücre tipinde bulunan hücre iskeleti bileşenlerine ait proteinlerdir (7). Testiste seminifer tubülün yapısına katılan Sertoli hücreleri, bu fonksiyonunu gerçekleştirebilmek için iyi bir hücre iskeletine sahiptirler (8). Sertoli hücre sitoskeletonu seminifer epitelin karakteristik özelliklerinin birçoğunun üretiminden sorumludur. Hücre şeklinin belirlenmesi ve korunmasında, sitoplazma organellerinin taşınması ve konumlandırılmasında, plazma zarının oluşumunun belirlenmesinde, hücre-hücre içi, hücre-hücre dışı matris etkileşiminde yer alınmasında ve ayrıca seminifer epitelden spermlerin salınması ve germ hücrelerinin sabitlenme, taşınma ve konumlandırılmasında yer alır (9). Olgun hücrelerinde intermediyer filaman olarak yalnızca vimentin bulunurken, testislerin gelişimi ve Sertoli hücrelerinin olgunlaşması sırasında vimentin ile birlikte sitokeratinler ekspres edilir (1). Ancak Sertoli hücrelerinde sitokeratinlerin puberta ile birlikte ortadan kalktığı bildirilmiştir (8,10).

İntermediyer filamanlar ile ilgili insan, sıçan, köpek, tavşan, domuz, boğa ve koç testis ve epididimisinde pek çok çalışma yapılmıştır (7-9, 11-13). Ancak yapılan literatür taramalarında farklı irklarda yavru ve olgun kedilerin testis, epididimis ve deferens kanallarında St8'in karşılaştırmalı olarak varlığı ve lokalizasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu doğrultuda sunulan çalışma; İran, Ankara ve Van ırkı yavru ve olgun kedilerin normal testis dokusunda St8 proteininin olası varlığı ve dağılımının immunohistokimyasal yöntemle belirlenmesi amacıyla yapıldı.

MATERYAL VE METOT

Hayvan Materyali

Çalışma materyali Ankara, İran ve Van kedilerinden alınan 18 çift testis dokusu örneklerinden oluşmaktadır. Doku örnekleri, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Polikliniği ve çeşitli özel veteriner kliniklerine kısırlaştırma amacıyla başvuru kedilerden elde edildi. Ardından testisler, beyan edilen kedi yaşlarına göre iki gruba ayrıldı. Bir grupta 6 aylıktan küçük yavru kedilerden alınan dokuz çift olgunlaşmamış testis, diğer grupta 1 yaşından büyük yetişkin kedilerden alınan dokuz çift olgun testis yer aldı. Her iki gruptaki testis doku örneklerinin %10 nötr formalin içinde 24 saat süreyle tespiti yapıldı. Tespit işleminin sonrasında bir gece boyunca akan su altında durulandıktan sonra numuneler rutin doku

işlemine tabi tutuldu ve parafine gömülerek bloklar haline getirildi. Hazırlanan parafin bloklardan rotary mikrotom (Leica RM- 2125, Almanya) ile 5 µm kalınlığında seri kesitler alınarak adezivli lamlara yerleştirildi.

İmmunohistokimyasal Prosedür

İmmunohistokimyasal boyama, streptavidin-biyotin-peroksidaz kompleks yöntemi kullanılarak yapıldı. Adezivli lamlara alınan seri kesitler, deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden sonra distile suda çalkalandı. Arkasında kesitler endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için distile suda hazırlanmış %3'lük H₂O₂ ile 20 dakika muamele edildi. Bunu takiben kesitler yıkamaya alındı. Her bir uygulamadan sonrasındaki yıkama işlemleri 0.01 M fosfat tamponlu tuz çözeltisinde [Phosphate buffer saline (PBS)] 3x5 dk. olacak şekilde yapıldı. Yıkamayı takiben, örnekler antijen retrieval işlemi için hazırlanan sitrat tamponunda (0.01 M, pH 6) 95 0C'de 15 dakika süresince kaynatıldıktan sonra soğumaya alındı. Ardından yıkama işlemi yapıldı ve kesitler, dokularda spesifik olmayan bağlanmaları bloke etmek için protein blocking çözeltisinde (Ultra V Blok, Thermo Fisher Scientific, Lab Vision Corporation) oda ısısında 15 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kesitler, 1/100 oranında antikor (Mouse Monoclonal Antibody, sitokeratin 8, catalogue no: ab2530 Abcam) ile +4°C'de 1 gece süresince inkübe edildi. İmmunohistokimyasal prosedürün spesifitesi için bazı kesitler antikor yerine PBS ile inkübasyona bırakılarak negatif kontrol olarak değerlendirildi. Bu sürenin sonunda kesitler 3x5 0.01M PBS ile yıkandı. Sonrasında kesitler sırası ile 24 0C'de 20 dakika süresince biotinlenmiş sekonder antikorda (Histostain Plus Bulk Kit, Zymed) ve streptavidin-peroksidase (HRP) ile inkübe edildi. Bu işlemlerin de arasında ve sonrasında yine aynı şekilde kesitler 0.01M PBS 3x5 dk yıkandı. Bu işlemlerin takibinde kesitlerde ortaya çıkacak antijen-antikor reaksiyonlarını göstermek için diaminobenzidine (DAP) kromojende reaksiyon oluşturma süresine göre 5-10 dk bekletildi ve kesitler yıkamaya alındı. Ardından Mayer's hematoksileninde 2-3 dk süreyle zıt boyamaya tabi tutulan kesitler akar su altında mavileşinceye kadar yıkandı. Bu yıkama işleminin ardından kesitler alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek entellan (Merck, Darmstadt, Germany, Cat. No:107960) ile kapatıldı. Boyamalar sonrası preparatlar Nikon-Eclipse 400 DSRi Nikon dijital fotoğraf makinesi (NIS Elements Imaging Software (version 3.10) ataçmanlı araştırma mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

İmmunohistokimyasal Değerlendirme

İmmunohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesi, yoğunluk skoru (intensity score) ile semikantitatif olarak yapıldı. Boyanan hücrelerin boyanma şiddeti; (-) boyanma yok, (+) zayıf, (++) orta derecede, (+++) kuvvetli boyanma şeklinde belirlendi (14). Hücrelerdeki immunboyanma reaksiyonlarının boyanma yoğunluğu iki bağımsız araştırmacı (UT ve ZK) tarafından değerlendirildi ve iki gözlemcinin ortalama puanı hesaplandı. Testis, epididimis ve ductus deferente St8 lokalizasyonu X20, X40, X100 büyütmelemlerde ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

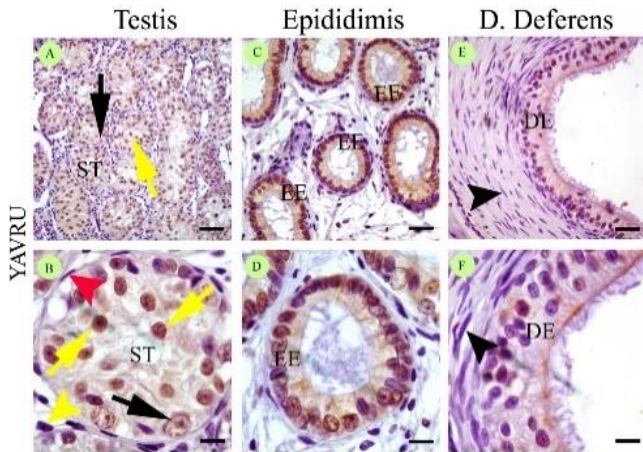
BULGULAR

Yavru ve olgun kedilerde testiste St8'in semikantitatif olarak değerlendirilen immunohistokimyasal bulguları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Yavru ve yetişkin kedi testislerinde sitokeratin 8'in immunohistokimyasal ekspresyon yoğunlukları

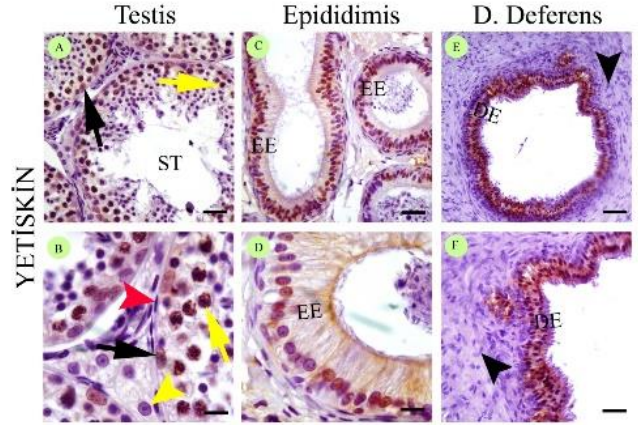
Gruplar	Organ/Bölmeler	Hücreler	Sitokeratin Lokalizasyonu
Yavru (6 aylıktan küçük)	Testis	Germ hücreleri	+++
		Sertoli hücreleri	++
		Leydig	-
		Miyoid hücreleri	-
	Epididimis	Epitel	++/+++
	D. deferens	Epitel	+
Yetişkin (1 yaşından büyük)	Testis	Germ hücreleri	+++
		Sertoli hücreleri	+++
		Leydig	-
		Miyoid hücreleri	-
	Epididimis	Epitel	++
	D. deferens	Epitel	++
		Düz kas hücreleri	-

Elde edilen bulgularda St8'in İran, Ankara ve Van ırkı kedi testislerinde benzer sonuçlar gösterdiği tespit edildi. St8 immunreaktivitesinin yavru kedilerde intersitisyel dokuda ve Leydig hücrelerinde şekillenmediği ancak Sertoli ve germ hücrelerinde ise çekirdek etrafında meydana geldiği belirlendi. Belirlenen bu immunreaksiyonun Sertoli hücrelerinde orta, germ hücrelerinde güçlü yoğunlukta olduğu görüldü. Ductus epididimis epitellerinde görülen orta ve güçlü düzeye yakın şekilde görülen immunreaktivitenin apikal ve bazal sitoplazmanın yanında çekirdekte de olduğu tespit edildi. St8 immunreaksiyonunun ductus deferens epitelinin apikal sitoplazmasında ve çekirdek etrafında zayıf yoğunlukta meydana geldiği, kaslarda ve bağ dokuda ise negatif olduğu görüldü (Şekil 1).



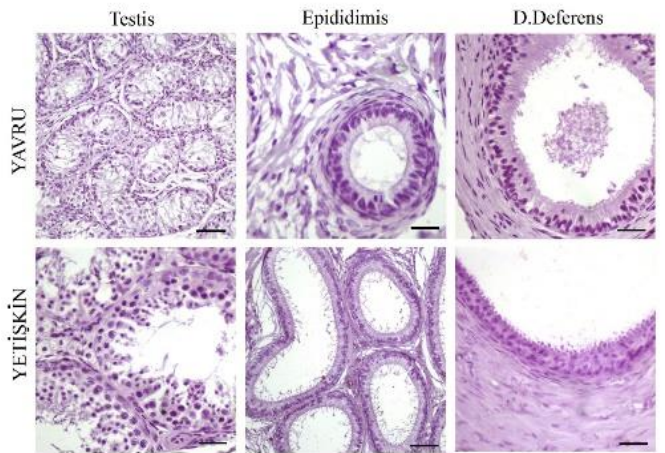
Şekil 1. Sitokeratin 8'in; Yavru kedilerin testis, ductus epididimis ve ductus deferensindeki immunoreaksiyonu. ST: Seminifer tubül, Siyah Ok: Sertoli hücresi, Sarı Ok: Germ hücresi, Sarı ok başı: Leydig hücresi, Kırmızı ok başı: Miyoid hücresi, EE: Epididimis Epiteli, DE: Deferens Epiteli, Siyah ok başı: Düz kas hücresi. Bar: 50 µm (A, C), 25 µm (E), 10 µm (B, D, F).

Olgun kedi testislerindeki St8 immunreaktivitesinin yavru kedilerde olduğu gibi intersitisyel dokuda, Leydig ve miyoid hücrelerinde şekillenmediği belirlendi. Fakat Sertoli ve germ hücrelerinde çekirdekte lokalize kuvvetli seviyede bir immunoreaktivite gözlemlendi. St8'in ductus epididimis epitelinin sitoplazma ve çekirdeğinde immunreaksiyon şekillendiği saptandı. Bu immunreaksiyonun apikal sitoplazmada yoğun, bazal sitoplazma ile çekirdekte ise orta düzeyde olduğu belirlendi. Ayrıca reaksiyonun sitoplazmaya kıyasla çekirdek etrafında daha yoğun olduğu görüldü. Bunlarla birlikte St8'in ductus deferens epitellerinde yavru kediler ile benzer immunreaksiyon oluşturduğu fakat reaksiyon şiddetinin ise daha yoğun olduğu belirlendi (Şekil 2).



Şekil 2. Sitokeratin 8'in; Yetişkin kedilerin testis, ductus epididimis ve ductus deferensindeki immunoreaksiyonu. ST: Seminifer tubül, Siyah Ok: Sertoli hücresi, Sarı Ok: Germ hücresi, Sarı ok başı: Leydig hücresi, Kırmızı ok başı: Miyoid hücresi, EE: Epididimis Epiteli, DE: Deferens Epiteli, Siyah ok başı: Düz kas hücresi. Bar: 50 µm (A, C, E), 10 µm (B, D), 25 µm (F).

Boyanmanın doğruluğunu kanıtlama bakımından primer antikor yerine PBS ile inkübasyona bırakılan negatif kontrollerde immunreaksiyon şekillenmediği görüldü (Şekil 3).



Şekil 3. Sitokeratin 8'in; yavru ve yetişkin kedilerin testis, ductus epididimis ve ductus deferenslerindeki negatif kontrol immunoreaksiyonu.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yetişkin Sertoli hücrelerinde intermediyer filamanlar, bazale yerleşmiş çekirdek etrafında ve plazma membranının belirli bölgelerine doğru yayılan yaygın sitoplazmik bir ağ oluşturur

(15). Epitel hücrelerinde baskın olan sitokeratinlerin aksine Sertoli hücrelerinde baskın olan intermediyer filaman vimentindir. Amlani and Vogl (11), fareler ile yaptıkları çalışmada Sertoli hücrelerindeki intermediyer filamanların spermatogenez sırasında değişiklik gösterdiğini bildirmişlerdir. Burada intermediyer filamanların, spermatogenezin erken evresindeki spermatitlerin apikal bölgelerinde iken spermatogenezin sonraki aşamalarında perinükleere yerleştiği ve zamanla her iki bölgede de varlıkları azalarak ortadan kaybolduklarını ifade etmişlerdir. Yapılan başka çalışmada sitokeratinlerin, Sertoli hücrelerinde fetal ve puberta öncesi dönemlerde vimentinle birlikte bulunduğu fakat puberta dönemi ile birlikte ortadan kalktığı belirtilmiştir (8). Stosiek ve ark (1990), fetal testislerdeki Sertoli hücre öncülerinin hem sitokeratin hem de vimentin içerdiğini ve fetal dönemin sonuna doğru sitokeratin pozitifliğinde bir azalmanın olduğunu ve doğum sonrası Sertoli hücrelerinde sitokeratin pozitifliği azalmaya devam ederek 14 günlük yaşa gelindiğinde ortadan kaybolduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da bildirilen çalışmalara paralel şekilde yavru kedilerin Sertoli ve germ hücrelerinde St8'in pozitif bir immunreaksiyon oluşturduğu gözlemlendi. Ancak bazı araştırma bulgularının aksine, pubertaya girmiş olgun kedilerde de Sertoli ve germ hücre çekirdeklerinde St8 immunoreaktivitesi belirlenmiştir. Bu durumun çalışmada kullanılan St8 proteinin spesifik özelliklerine bağlı olabileceğinin yanı sıra türe özgü farklılıklardan kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca kedilerdeki Sertoli hücrelerinin St8 intermediyer filamanlarını içermesi bu hücrelerin epitelyal kökenli olabileceği kanısına varırmıştır.

İnsan ve bazı hayvanların rete testis, duktuli eferentis ve duktus epididimis epitel hücrelerinin sitokeratin intermediyer filamanlarını içerdikleri bildirilmiştir (11, 17-20). İnsanlarda embriyonal dönemden erişkin döneme kadar yapılan çalışmada intermediyer filamanların erişkin testis ve epididimis dokularında pozitif reaksiyon verdiği, yetişkinlerde reaksiyonun apikal bölgede yoğunlaştığı bildirilmiştir (21). Kasper and Stosiek (22), yetişkin insanlarda epididimiste sitokeratinlerin epitel boyunca pozitif reaksiyon verdiğini bildirmişlerdir. Tavşan testis ve epididimisinde yapılan çalışmada rete testis epitellerinde sitokeratin (sit. 8/18 ve sit. 5/6/18) immunoreaktivitesine rastlanılmadığı, duktuli eferentis ve duktus epididimis epitellerinde ise pozitif immunreaksiyon belirlendiği bildirilmiştir (8). Wakui ve ark (13), köpeklerde rete testis ve epididimiste yaptıkları çalışmada epididimiste zayıf sitokeratinler ile vimentinin birlikte eksprese olduğunu, sitokeratinlerin hücrenin luminal kısmına yakın yoğunlaştığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada yavru ve olgun kedilerde ductus epididimis epitellerinde bazal ve apikal sitoplazmada St8 immunoreaktivitesi belirlenmiştir. Böylece diğer çalışmalara paralel şekilde kedilerin epididimisinde St8 proteinin gözlenmesi, bu proteinin epididimiste hücre iskeleti yapısına katılarak spermlerin olgunlaşması, depolanması ve taşınması gibi fizyolojik süreçlerde önemli görevler üstlenebileceğini göstermektedir.

Sitokeratinlerin duktus deferensteki varlığı ile ilgili literatür taramasında çalışmaların çok kısıtlı olduğu görülmüştür. Regadera ve ark (23), insanlarda fetal, çocukluk ve yetişkin dönemlerdeki ductus deferensin gelişiminde sitokeratinlerin immunboyama yoğunluğunun fetal dönemden yenidoğan

dönemine kadar arttığı, prepubertal dönemde dağılımda herhangi bir değişiklik olmadığı ancak pubertede önemli ölçüde arttığı ve yetişkin yaşamı boyunca da yüksek kaldığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da görülen St8 immunreaktivitesinin yavru kedilere oranla olgun kedilerde daha yoğun gözlenmesi Regadera ve ark (23)'nin pubertede sitokeratinlerin önemli ölçüde arttığı bulgusunu desteklemektedir. Böylece St8'in kedi duktus deferens epitel hücrelerinin farklılaşmasına etki edebileceği ve buradaki fizyolojik sürece de katkı sağlayabildiği düşünüldü.

Sonuç olarak; intermediyer filamanlar arasında en çok çeşidi olan sitokeratinlerin, yapılan çalışmalarda fetal ve puberta öncesi dönemlerde testiste bulunduğu, pubertadan sonra ise özellikle Sertoli hücrelerinde ortadan kaybolduğu bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada ise yetişkin kedi testislerinde St8 immunoreaktivitesinin bulunması, bu sitokeratinin kedilere özgü olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca kedilerin testis, epididimis ve ductus deferensinde St8'in bulunması diğer intermediyer filamanlar ile birlikte hücre iskeletinin yapısına katıldığını, spermlerin olgunlaşması, taşınması ve depolanmasında önemli görevler üstlendiğini akla getirmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Araştırmamızın herhangi bir kurum, kuruluş, kişi ile mali çıkar çatışması yoktur ve yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Chevillon JC, Rao S, Iczkowski KA, Lohse CM, V. Pankratz VS. (2000). Cytokeratin Expression in Seminoma of The Human Testis. *Am J Clin Pathol.* 113:583-588.
2. Tamai Y, Ishikawa T, Bösl MR et al. (2000). Cytokeratins 8 and 19 In The Mouse Placental Development. *The Journal of Cell Biology.* 151(3): 563-572
3. Yılmaz S. (2021). A Novel Epithelial and Fibroblastic Cell Isolation and Purification Method Using Primary Culture of Bovine Tongue Tissue. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 27(6): 675-680.
4. Wagner MS, Wajner SM, Maia AL. (2008). The Role of Thyroid Hormone In Testicular Development and Function. *J Endocrinol.* 199(3): 351-365.
5. Mruk DD, Cheng CY. (2002). Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis. *Endocrine Reviews.* 25(5):747-806.
6. Topaloğlu U, Akbalık ME, Sağsöz H. (2021). Immunolocalization of Some HOX Proteins In Immature and Mature Feline Testes. *Anatomia, Histologia, Embryologia.* 50: 726-735.
7. Çelenk F, Saruhan BG, Akbalık ME, Topaloğlu, Aydın N, Bayram B. (2021). Yetişkin Boğa ve Koçların Testis ve Epididimal Kanal Ünitesindeki Vimentinin İmmunohistokimyasal Dağılımı. *Dicle Üniv Vet Fak Derg.* 14(2):83-88.
8. Beyaz F, Bayram GK, Alan E. (2009). Vimentin, Sitokeratin, α -SMA ve Desmin'in Yeni Zellanda Tavşanı Testis ve Epididimisindeki İmmunohistokimyasal Ekspresyonu. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 6(2): 111-119.
9. Miguel MP, Bethencourt FR, Arenas MI, Fraile B, Paniagua R. (1997). Intermediate Filaments In The Sertoli Cells of The Ageing Human Testis. *Virchows Arch.* 431:131-138.
10. Santiago J, Silva JV, Alves MG, Oliveira PF, Fardilha M. (2019). Testicular Aging: An Overview of Ultrastructural, Cellular, and

- Molecular Alterations. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 74 (6): 860-871.
11. Amlani S, Vogl AW. (1988). Changes in the Distribution of Microtubules and Intermediate Filaments in Mammalian Sertoli Cells During Spermatogenesis. *The Anatomical Record.* 220:143-160.
 12. Steger K, Schimmel M, Wrobel KH. (1994). Immunohistochemical Demonstration of Cytoskeletal Proteins In Seminiferous Tubules of Adult Rams and Bulls. *Arch Histol Cytol.* 57(1): 17-28.
 13. Wakui S, Furusato M, Shinichiro U, Kano Y. (1994). Coexpression of Different Cytokeratins, Vimentin and Desmin In The Rete Testis and Epididymis nn the Dog. *J Anat.* 184: 147-151.
 14. Akbalik ME, Sagsoz H, Erdogan S. (2015). Osteopontin Epression in the Intestine of Chukar Partridge (*Alectoris chukar*, Gray, 1830). *Animal Biology.* 65(3-4): 287-298.
 15. Dunleavy JEM, O'Bryan MK, Stanton PG, O'Donnell L. (2019). The Cytoskeleton in Spermatogenesis. *Reproduction.* 157 (2): R53-R72.
 16. Stosiek P, Kasper M, Karsten U. (1990). Expression of Cytokeratins 8 and 18 in Human Sertoli Cells of Immature and Atrophic Seminiferous Tubules. *Differentiation.* 43(1): 66-70.
 17. Lehtonen E. (1985). A Monoclonal Antibody Against Mouse Oocyte Cytoskeleton Recognizing Cytokeratin-Type Filaments. *J Embryo1 Exp Morpho.* 190:197-209.
 18. Park YJ, Kim JH, Kim HY et al. (2020). The Expression and Localization of V-ATPase and Cytokeratin 5 during Postnatal Development of The Pig Epididymis. *Asian-Australas J Anim Sci Vol.* 33(7) :1077-1086.
 19. Pecile A, Groppetti D, Pizzi G et al. (2021). Immunohistochemical Insights into a Hidden Pathology: Canine cryptorchidism. *Theriogenology.* 176: 43-53.
 20. Rogatsch H, Jezek D, Mikuz AHG, Feichtinger H. (1996). Expression of Vimentin, Cytokeratin, and Desmin in Sertoli Cells of Human Fetal, Cryptorchid, and Tumour-Adjacent Testicular Tissue. *Virchows Arch.* 427:497-502.
 21. Dinges HP, Zatloukal K, Schmid C, Mair S, Wirnsberger G. (1991). Co-Expression of Cytokeratin and Vimentin Filaments In Rete Testis and Epididymis. *Virchows Archiv A Pathol Anat.* 418:119-127.
 22. Kasper M, Stosiek P. (1989). Immunohistochemical Investigation of Different Cytokeratins and Vimentin In The Human Epididymis from The Fetal Period up to Adulthood. *Cell Tissue Res.* 257:661-664.
 23. Regadera J, España G, Roias MA, Recio JA, Nistal M, Suárez-Quian CA. (1997). Morphometric and Immunocytochemical Study of the Fetal, Infant, and Adult Human Vas Deferens. *Journal of Andrology.* 18(6): 623-636.

✉ **Sorumlu Yazar:**

Uğur TOPALOĞLU

Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, TÜRKİYE

E-posta: ugur.topaloglu@dicle.edu.tr



Ovaryohistektomi Sırasında Monitörizasyon Parametrelerinin Köpeklerin Ağırlıklarına Göre Değerlendirilmesi

Gülşah SARAL^{1,a}, Firdevs BİNLİ^{2,b}, Serhan Serhat AY^{1,c,✉}

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Samsun, TÜRKİYE

^aORCID: 0000-0002-5584-3991; ^bORCID: 0000-0001-9547-8776; ^cORCID: 0000-0003-2116-5149

Geliş Tarihi/Received
14.04.2022

Kabul Tarihi/Accepted
19.05.2022

Yayın Tarihi/Published
30.06.2022

Öz

Bu çalışmada, köpeklerde ovarıyohistektomi (OHE) sırasında monitörizasyon parametrelerindeki değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Kısırlaştırma isteğiyle getirilen farklı ırk ve yaşlardaki 30 köpek, vücut ağırlıklarına göre gruplandırıldı. Grup 1'e (G1; n=10) vücut ağırlığı <15 kg olanlar, grup 2'ye (G2; n=10) vücut ağırlığı 15-29 kg olanlar ve grup 3'e (G3; n=10) vücut ağırlığı ≥ 30 kg olanlar alındı. OHE öncesi nabız sayısı (HFr), solunum sayısı (RFr), kapiller dolum zamanı (CRT) ve vücut ısısı (T) kayıt edildi. Operasyon sırasında HFr, ortalama kan basıncı (MAP), RFr, oksijen saturasyonu (SPO₂) ile T kaydedildi. Anılan parametreler belirli kritik noktalara (ensizyon, sol ovarıyuma ulaşma, sol ovarıyumu uzaklaştırma, sağ ovarıyuma ulaşma, sağ ovarıyumu uzaklaştırma, servikse ulaşma, transfikse dikiş uygulaması, uterusun uzaklaştırılması ve kasların/derinin kapatılması) ulaşıldığında ve ayrıca 10 dakika aralıklarla kayıt edildi. Grupların operasyon öncesi değerlendirilen HFr, RFr, CRT ve T değerleri arasında fark önemli bulunmadı. Kritik noktalara en hızlı G1'de ulaşıldığı belirlendi. HFr kritik noktalar arasındaki ovarıyumlara ulaşma/uzaklaştırma aşamalarında G1'de diğer gruplara göre önemli düzeyde yüksek belirlendi. RFr, SPO₂ ve T parametrelerinin gruplar arasında fark göstermediği belirlendi. On dakika aralıklarla alınan ölçümlerde sadece MAP arasındaki fark önemli (P= 0.007) bulundu. Sonuç olarak; OHE sırasında zayıf köpeklerde HFr, kilolu köpeklerde MAP değerlerinin yüksek seyrettiği belirlendi. Bu verinin diğer parametrelerinin göz ardı edilmesi anlamına gelmediği, tüm parametrelerin dikkatlice ve birbiri ile bağlantılı şekilde yorumlanması gerektiği kanaatine verildi.

Anahtar Kelimeler: Köpek, monitörizasyon, ovarıyohistektomi, vücut ağırlığı.

Evaluation of Monitoring Parameters According to the Body Weight of Dogs During Ovariohysterectomy

Abstract

The presented study was designed to determine changes in monitorization parameters during ovariohysterectomy (OHE). In the study, dogs were divided into three groups according to their body weight: group 1 (G1; n=10) included dogs weighing less than 15 kg, group 2 (G2; n=10) between 15 to 29 kg and group 3 (G3; n=10) included dogs weighing 30 kg and more. Each patient's heart rate (HFr), respiratory rate (RFr), capillary refill time (CRT) and body temperature (T) were recorded prior to and after anesthetic induction. During surgery, HFr, blood pressure (S/D and mean), RFr, peripheral oxygen saturation (SPO₂) and T were recorded every 10 minutes and at certain critical points during the operation (incision, reaching the left ovary, removing the left ovary, reaching the right ovary, removing the right ovary, reaching the cervix, placing the transfixation ligature, removal of the uterus and muscle/skin closure). There were no differences between the pre-operative HFr, RFr, CRT and T values of the groups. The shortest time to reach critical points was at G1. HFr was found significantly higher in G1 than the other groups when reaching/removing ovaries critical point. RFr, SPO₂ and T parameters did not show any significant difference. There was significances MAP parameter in the 10 minutes interval recordings (P= 0.007). As a result, it was determined that HFr values in smaller dog breeds and MAP values in large and giant dog breeds were higher during OHE. It was concluded that all parameters should be interpreted carefully and in conjunction with each other and no vital parameter should be examined by itself.

Key Words: Body weight, dog, monitorization, ovariohysterectomy.

GİRİŞ

Dişi köpeklerde üremenin denetlenmesi amacıyla yapılan hormonal uygulamaların çoğunlukla tekrarlanma zorunluluğu ve kemik iliğini baskılayabilmeleri (östrojen), kistik endometriyal hiperplazi, piyometra, meme tümörü ve diyabetes mellitus insidensinde artış (progesteron) gibi yan etkileri

bulunmaktadır (1,2). Bundan dolayı yavru elde etmek istemeyen hayvan sahipleri için en yaygın yöntem köpeklerinin cerrahi yöntemle kısırlaştırılmasıdır (3).

Kısırlaştırma operasyonları özel kliniklerde yapılan elektif cerrahi girişimlerin belki de en büyük kısmını oluşturmaktadır (4,5). Günümüzde bu işlem sadece köpek nüfus artışının engellenmesi için değil aynı zamanda istenmeyen gebeliklerin sonlandırılması, reproduktif patolojilerin engellen-

mesi/tedavi edilmesi yanında proöstrus ve östrus döneminde görülen kanama ve davranış değişikliklerinin engellenmesi için ve son olarak bilimsel araştırmalarda ağrı çalışmalarında rutin olarak gerçekleştirilmektedir (6). Özellikle son yıllarda köpeklerde ağrı yönetimi oldukça önem kazanmaya başlamıştır. Kısırlaştırma işleminin birçok cerrahi operasyona göre daha standart olması, açık abdominal cerrahi girişimleri içinde yer alması ve ağrı parametrelerinin takibinin daha kolay olması gibi nedenlerle ağrı çalışmaları genellikle dişi köpeklerin kısırlaştırılması -ovaryohistektomi (OHE) ve overiektomi (OVE)- üzerinde yapılmaktadır (7).

Tüm kısırlaştırma işlemleri genel anestezi altında yapılmakta ve bir risk taşımaktadır. Dolayısıyla anestezideki hastaların izlenmesi hayati öneme sahiptir. Takip süreci oldukça karışık ve çok yönlü yetenek gerektirmesi yanında çok fazla bilgi ve uygulama gerektirir. Aslında monitör kelimesi latince uyarı anlamına gelen "monere" kelimesinden türemiştir. Monitörizasyon ise hastanın önemli değişkenlerini belli aralıklarla ölçme işlemine denir. Bu işlem duyularımız veya elektronik aygıtlar aracılığı ile yapılabilir. Monitör sadece ikaz edebilir. Önemli olan hekimin sahip olduğu iyi klinik bilgileriyle monitörün ikazını yorumlayabilmesidir (8). Zira nabız, solunum sayıları ve kan basınç oranları aslında anestezinin derinliği hakkında bilgi vermez. Bu parametreler birçok faktörden etkilenebilir. Örneğin anestezi madde miktarının artırılması kalp ve solunumu baskılayarak bu parametrelerin değişmesine neden olur (8). Anılan parametrelerin takibiyle operasyon sırasında bir şeylerin ters gidip gitmediği hakkında fikir sahibi olunup önlem alınarak riskler en aza indirilir (9). Hayvanın genel sağlık durumu yanında, yaşı, ırkı, operasyon süresi, kullanılan ilaçlar ve dahası, hastaların artan vücut ağırlığı, risk faktörlerini ve komplikasyon insidensini artırmaktadır (10). Sunulan çalışma, bu bağlamda hayvanların vücut ağırlıklarına göre gerek rutin kısırlaştırma işlemleri sırasında gerekse ağrı çalışmaları sırasında kullanılmak üzere optimal OHE süresinin belirlenmesi, komplikasyon oranlarının ortaya koyulması, operasyon sırasında monitörizasyon parametrelerindeki değişimlerin belirlenmesi amacıyla planlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Sunulan çalışmanın hayvan materyalini Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Kliniği'ne kısırlaştırma isteği ile getirilen, değişik ırk ve yaşlarda olan toplam 30 adet köpek oluşturdu (Tablo 1). Köpekler vücut ağırlıklarına göre üç gruba ayrıldı. Grup 1'e (G1; n=10) vücut ağırlığı <15 kg olan köpekler, grup 2'ye (G2; n=10) vücut ağırlığı 15-29 kg arasında olan köpekler ve grup 3'e (G3; n=10) vücut ağırlığı ≥30 kg olan köpekler alındı. Sunulan çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2015/59 numaralı izniyle gerçekleştirildi.

Kısırlaştırma isteği ile getirilen köpekler genel sağlık kontrolleri yapıldıktan sonra, reproduktif sistem; gebelik ve patolojiler yönünden ultrasonografi ile değerlendirilerek kaydedildi ve uygun bulunanlar elektronik tartı vasıtasıyla belirlenen vücut ağırlıklarına göre gruplara alındı. Tüm anesteziye alma işlemleri ve operasyonlar aynı kişilerce gerçekleştirildi.

Anestezi induksiyonu propofol (Propofol®, 6-8 mg/kg, i.v.; Fresenius Kabi) ile sağlandı, isofluran (Forane® Likid, Abbott) %2 oksijen ile anesteziye alındı. Anesteziye alınan hayvan hemen monitörize (Bionet BM5 VET, Türkiye) edildi. Hasta başı monitörü kullanım kılavuzunda belirtildiği gibi köpeklerin sağ articulatio genu, sol articulatio genu, sağ articulatio cubiti, sol articulatio cubiti ve umbilikal skar hizasından hayvanlara bağlandı ve anestezi stabil hale geldikten sonra nabız sayısı (HFr, atım/dk), ortalama arteriyel basınç (MAP), solunum sayısı (RFR, nefes/dk), oksijen saturasyonu (SPO₂) vücut ısısı (T, °C) parametreleri not edildi. Çalışmada hayvanın hipo- ya da hiper- tansiyonda olduğunun belirlenmesinde sistolik (SAP) ve diastolik arteriyel basıncın (DAP) ortalaması olan ortalama arteriyel basınç (MAP) düzeyi, MAP = SAP + 2(DAP)/3 formülü ile hesaplanarak (8) değerlendirildi.

Takip/not alma süreci ensizyona başlanıldığı andan son dikişin koyulduğu ana kadar gerçekleştirildi. Değerler operasyon sırasında kritik noktalara ulaşıldığında ve bu noktalardan bağımsız olarak 10 dakika aralıklarla iki farklı forma kaydedildi. Belirlenen kritik noktalar OHE sırasında yapılan işlemlere göre belirlendi. Buna göre; ensizyon yapılması (E), sol ovaryuma ulaşma (LOvU), Sol ovaryumu uzaklaştırma (LOvUz), sağ ovaryuma ulaşma (ROvU), sağ ovaryumu uzaklaştırma (ROvUz), serviks ulaşma (Cx), serviksin ligasyonu (CxL), uterusu uzaklaştırma (UtUz), kas ve deri kapanması (K) olarak belirlendi.

Ovaryohistektomiler rutin yöntemle *linea alba* hizasından gerçekleştirildi. Ligasyon işlemleri tüm hayvanlarda sol taraftan başlanarak yapıldı. Ardından abdominal boşluk kanamalar yönünden kontrol edildi ve hayvan kapatıldı. Periton ve kaslar bir arada olacak şekilde horizontal-U dikişle kapatıldı. Deri altı basit ayrı dikişlerle toplandıktan sonra deri subkutiküler dikiş ile kapatıldı. Dikiş materyali olarak Vicryl® (Ethicon) kullanıldı. Ovaryum pedikülleri, pasif kanamalar, ligamentum latum uteri, serviks uteri, periton ve kaslar ile deri altı ve subkutiküler dikiş için hayvan büyüklüğüne göre USP: 2/0 ve 0 ile ligatüre edildi. Operasyon sırasında tüm köpeklere %0.9 NaCl (10 mg/kg/saat, damar içi), sonunda meloksikam (Maxicam®, 0.4 ml/kg, deri altı, Sanovel) ve antibiyotik olarak enroflaksasin (Baytril K %5®, 1 ml/10 kg, deri altı, Bayer) uygulandı.

Bu işlemler dışında operasyon sırasında anestezi süresi, ensizyon hattının uzunluğu ve şekillenen kanama, organ rupturu, solunum durması, kalp durması gibi komplikasyonlar not edildi.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin normal dağılıma uygun olup olmadıkları Posthoc testi ile değerlendirildi ve aykırı değerler belirlenerek verilerin normal dağılıma uygun olmaları sağlandı. Tüm veriler grup ve zamana göre ayrı ayrı düzenlenerek tanıtıcı istatistikleri, ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerler şeklinde özetlendi. Gruplar ve zamanlar göre farklılıklar Grup*Zaman interaksiyonlarında değerlendirilmesini amacıyla tesadüf parselleri deneme deseni uygun olarak faktöriyel de normal düzeninde değerlendirildi. Basit ve ana etkilerin karşılaştırılmaları Tukey ve Duncan testine göre yapıldı. Tüm analiz ve hesaplamalarda SAS (2013) istatistik analiz programı kullanıldı.

BULGULAR

Gruplara ait ırk, ortalama yaş ve vücut ağırlıkları Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. Gruplardaki köpeklerin ırk, ortalama yaş ve vücut ağırlıkları

Grup	İrklar	Yaş (ay) (X±SD; min-mak)	Vücut ağırlığı (kg) (X±SD; min-mak)
G1 (n=10)	Melez (n=7) Terrier (n=2) Husky (n=1)	16.2 ± 12.5 (6 - 36)	8.7 ± 0.8 ^a (6.0 - 15.0)
G2 (n=10)	Melez (n=8) Alman çoban (n=1) Pointer (n=1) Anadolu kangal (n=4)	26.5 ± 18.9 (6 - 54)	21.3 ± 1.1 ^b (17.7 - 28.1)
G3 (n=10)	Golden retriever (n=4) Alman çoban (n=1) Labrador retriever (n=1)	37.2 ± 13.2 (12 - 60)	34.0 ± 0.9 ^c (31.0 - 41.0)
P değeri	-	-	P= 0.0001

Grupların operasyon süreleri arasında önemli bir fark bulunamazken anestezi süresi (P= 0.03) ve ensizyon hattı uzunlukları (P= 0.02) arasında istatistiksel fark bulunmuştur (Tablo 2).

Tablo 2. Ortalama operasyon ve anestezi süreleri ile ortalama ensizyon hattı uzunluğu

Grup	Operasyon süresi (dakika) (X±SD; min-mak)	Anestezi süresi (dakika) (X±SD; min-mak)	Ensizyon hattı uzunluğu (cm) (X±SD; min-mak)
G1 (n=10)	27.9 ± 1.7 (19 - 35)	37.3 ± 1.8 ^a (29 - 45)	5.9 ± 0.2 ^a (4.5 - 7.4)
G2 (n=10)	36.3 ± 4.6 (24 - 64)	47.0 ± 4.4 ^b (31 - 78)	7.3 ± 0.6 ^b (5.1 - 12.4)
G3 (n=10)	30.30 ± 2.3 (21 - 43)	40.9 ± 1.4 (35 - 50)	7.48 ± 0.3 ^{b, c} (5.0 - 8.7)
P değeri	n.s	0.03	a,b: 0.03 a,c: 0.02

n.s.=istatistiksel önem yok

Çalışmada sadece G2'de %20 oranında (2/10) komplikasyon ile karşılaşıldı. Bu grupta bir hayvanda sağ ovaryum bir hayvanda ise serviks uzaklaştırıldıktan sonra kanama görüldü. Çalışma süresince başka hiçbir hayvanda komplikasyon görülmedi. Dolayısıyla toplam komplikasyon oranı %6.6 (2/30) olarak belirlendi.

Operasyon öncesi alınan HFr, RFr, CRT ve T parametrelerine ait veriler Tablo 3'te gösterilmektedir.

Tablo 3. Operasyon öncesi yapılan klinik değerlendirmede elde edilen veriler

Gruplar	HFr (atım/dk)	RFr (solumum/dk)	CRT (dolum/sn)	T (°C)
G1 (n=10)	114.8 ± 7.6 (80 - 148)	39.6 ± 6.0 (20.0 - 88.0)	1.3 ± 0.1 (1.0 - 2.0)	38.9 ± 0.2 (38.1 - 39.9)
G2 (n=10)	106.0 ± 10.7 (72 - 180)	43.6 ± 11.7 (20.0 - 144.0)	1.4 ± 0.1 (1.0 - 2.0)	38.9 ± 0.1 (38.4 - 39.5)
G3 (n=10)	112.8 ± 4.1 (96 - 136)	62.2 ± 11.9 (24.0 - 120.0)	1.5 ± 0.1 (1.0 - 2.0)	38.8 ± 0.2 (37.8 - 39.9)
P değeri	n.s	n.s	n.s	n.s

n.s.= İstatistiksel önem yok

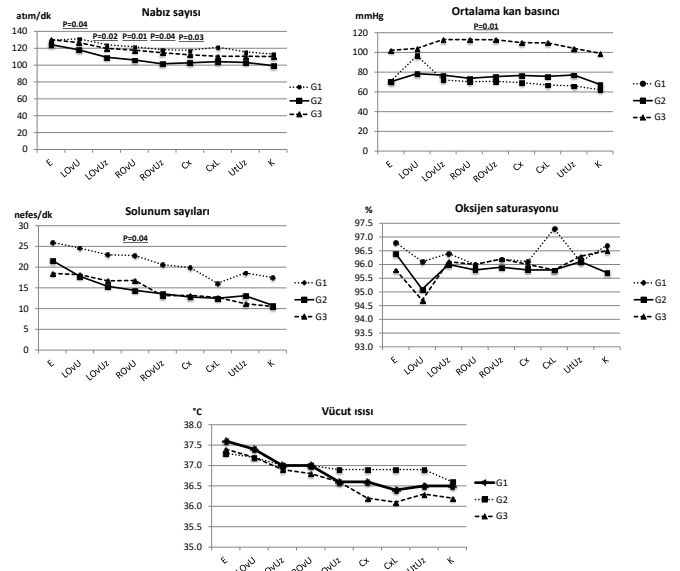
Belirlenen kritik noktalara ulaşıldığında elde edilen veriler Şekil 1'de gösterilmektedir. Nabzın sol ovaryuma ulaşıldığında (LOvU), sol ovaryum uzaklaştırıldığında (LOvUz) ve sağ ovaryuma ulaşıldığında (ROvU) G1'de diğer gruplara göre önemli oranda yükseldiği belirlendi (P= 0.04 ile P= 0.01 arasında; Şekil 1). Operasyon süresi boyunca elde edilen ortalama HFr'nin 124.1 atım/dk ile G1'de G2 (107.7 atım/dk) ve G3 (117.0 atım/dk)'den önemli oranda yüksek seyrettiği bulundu (P= 0.05).

Ortalama kan basıncı tüm kritik noktalarda G3'te G1 ve G2'den önemli düzeyde yüksek bulundu (P= 0.001; Şekil 1). Grupların operasyonlar süresince elde edilen MAP değerleri karşılaştırıldığında G3'e ait (107.6 mmHg) düzeyin G2 (74.6 mmHg) ve G1 (68.8 mmHg)'den önemli oranda daha yüksek seyrettiği belirlendi (P= 0.05).

Grupların RFr değerlerine bakıldığında sadece sağ ovaryuma ulaşıldığında (ROvU) G1'de G2'ye göre önemli bir artış belirlendi (P= 0.04; Şekil 1). Operasyon süresince G1'in RFr'si (21.4 nefes/dk), G2 (14.7 nefes /dk) ve G3 (14.6 nefes /dk)'e göre önemli oranda yüksekti (P= 0.05).

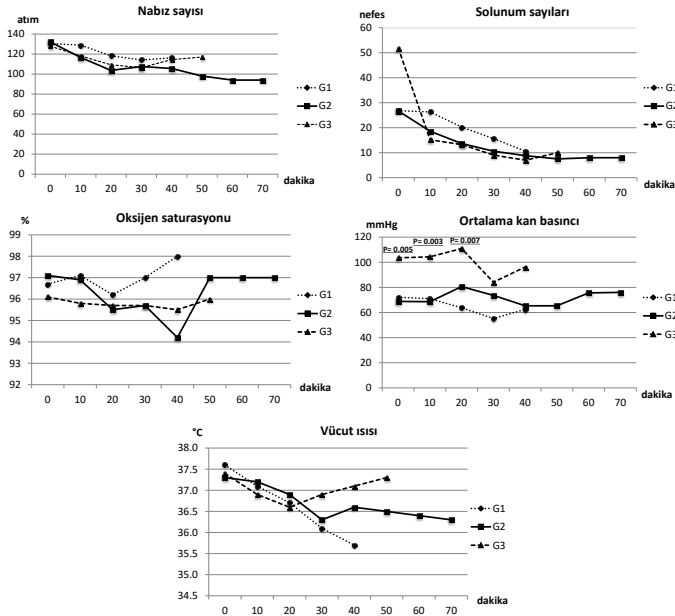
Operasyonlar sırasında grupların SPO₂ arasında gerek kritik noktalara ulaşıldığında gerekse operasyon süreci boyunca fark olmadığı görüldü (P> 0.05; Şekil 1). Operasyonlar sırasında SPO₂ G1'de %96.3; G2'de %95.7 ve G3'te %95.8 ile devam etti.

Benzer şekilde kritik noktalara ulaşıldığında grupların vücut ısıları arasında bir fark olmadığı görüldü (P> 0.05; Şekil 1). Operasyon sırasında ortalama vücut ısısının G1'de 36.9 °C; G2'de 37.0 °C ve G3'te 36.6 °C ile seyrettiği belirlendi. G2 ile G3 arasında önemli fark olduğu belirlendi (P= 0.05).

**Şekil 1.** Belirlenen kritik hedeflere ulaşıldığında elde edilen veriler E: Ensizyon, LOvU: Sol ovaryuma ulaşma, LOvUz: Sol ovaryumu uzaklaştırma, ROvU: Sağ ovaryuma ulaşma, ROvUz: Sağ ovaryumu uzaklaştırma, Cx: Serviks ulaşma, CxL: Serviks ligatür koyulması, UtUz: Uterus uzaklaştırılması, K: Ensizyon hattının kapatılması.

Çalışmada on dakika aralıklarla yapılan değerlendirilme sonucunda grupların HFr, RFr, SPO₂ ve vücut ısıları arasında fark bulunamazken MAP değerleri arasında ilk 20 dakika

önemli düzeyde fark belirlenmiştir (P= 0.003 ile P= 0.007 arasında; Şekil 2).



Şekil 2. On dakika aralıklarla alınan kayıtlardan elde edilen veriler

TARTIŞMA VE SONUÇ

Sağlıklı köpeklerde OHE ve OVE kardiovasküler ve endokrin parametreler ölçülerek perioperatif cerrahi stres değerlendirilebilmektedir (7,11-13). Monitörizasyonun cerrahi girişimler sırasında rutin olarak yapılması hayati önem taşımaktadır ve monitörizasyon parametreleri 5 ile 20 dakika arasında kontrol edilmelidir (8). Ovaryohistektomide gerçekleştirilen ovaryum pedikülünü sıkıştırma, döndürme ve bağlama gibi zararlı uyarılar operasyon sırasında en yüksek travmaya neden olan uygulamalardır (14,15). Bu yüzden cerrahi girişim sırasında iç organlarda oluşan ağrının değerlendirilebilmesi için ovaryum pedikülünün ligatür edilmesi bir model olarak çalışılmış ve ağırlı çalışmalarında kullanılmasının yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır (16). Diğer yandan OHE için yapılan çalışmalarda ovaryumlara dokunulduğunda köpeklerin monitörizasyon parametrelerinde değişiklik olduğu belirtilmektedir (17). Bundan dolayı, bu çalışmada monitörizasyon parametrelerindeki değişiklikler 10 dakika aralıklarla ve belirlediğimiz kritik noktalara ulaşıldığında yapılan ölçümler ile belirlenmiştir.

Anesteziye almadan önce tüm hastalar genel sağlık kontrolünden geçirilmeli ve veriler kaydedilerek anestezi risk sınıfı belirlenmeli, operasyon planı bu risk sınıfına göre yeniden planlanmalı, ertelenmeli veya iptal edilmelidir (8). Köpeklerin operasyon öncesi yapılan genel klinik muayeneleri arasında HFr, RFr, CRT ve T'leri arasında fark olmaması çalışma başında tüm hayvanların sağlıklı olduğu göstermektedir. Klinik olarak bu muayeneler hastanın sağlıklı olduğu düşündürmesi açısından yeterlidir ve Amerikan Anesteziyoloji Topluluğu'nun belirlediği risk sınıfında göre 1. sınıf yani belirlenebilir bir hastalığı olmayan, sağlıklı hastalar sınıfına girmektedir (8). Çalışma sırasında köpeklerin herhangi birinde operasyon öncesi ve takip eden 24 saat içinde ölüm şekillen-

memiştir. Bu bulgular ovaryohistektomi sırasındaki parametrelerin hayvanların hayati tehlike yaratacak düzeyde değişiklik göstermediği şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca grupların vücut ağırlıkları arasında belirlenen P= 0.0001 düzeyindeki önem, grupların vücut ağırlıklarına göre birbirlerinden çok farklı şekilde oluşturulduklarını ve bu yönden etkili bir gruplandırma yapıldığını göstermektedir.

Sunulan çalışmada köpeklerin operasyon süreleri, anestezi kalma toplam süreleri ve ensizyon hattı uzunlukları ölçülmüştür. Operasyon süresi en kısa G1'de, en uzun süre G2'de bulunmasına rağmen gruplar arasında fark bulunamamıştır. Anestezi kalma süresi ise G2'de ortalama 47 dakika ile diğer gruplardan uzun olduğu ve bu sürenin yaklaşık 10 dakika ile G1'den önemli derecede uzun olduğu belirlenmiştir. Ensizyon hattı uzunluğu ise en kısa olarak G1'de belirlenmiş diğer iki grup arasında fark belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar Demir ve Erdoğan (3)'ün belirlediği 48.25 dk (30-70) ortalama operasyon süresiyle uyumludur. Ensizyon hattının küçük ırk hayvanlarda daha kısa büyük ırk hayvanlarda daha uzun olması normal karşılanabilir. Ensizyon hattının iyileşme süresi ise büyüklüğünden bağımsızdır ve ister küçük ister büyük bir ensizyon hattı olsun kaynama süresi 6-12 gündür (18). Ancak ensizyon hattının büyüklüğü ile OHE sonrası oluşabilecek yara enfeksiyonu arasında bir bağlantı olabilir. Zira büyük bir yara hattını enfeksiyöz etkenlerden korumak daha zor olabilir. Burrow ve ark. (4) ile Adin (19)'e göre OHE sonrası yara enfeksiyonu oranı sırasıyla %2.2 ve %5.7'dir. Bu oranlar anestezi ve ameliyat sürelerinin uzamasından etkilenmektedir. Bu çalışmada yara ensizyon hattında enfeksiyon ile karşılaşmamıştır. Bunda anestezi kalma sürelerinin uzun olmaması yanında postoperatif bakımında iyi olmasının rol oynadığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Cerrahi girişimler sırasında kanama, doku rupturu, kardiyak arrest, solunum durması, düzelmeyen hipotermi, anestezi şok ve iatrojenik gibi birçok risk faktörü bulunmaktadır (20,21). Komplikasyonlarla küçük ırklarda orta ve büyük ırklara göre daha sık karşılaşılmaktadır (22). Pearson (23)'a göre kanama kaynaklı ölümler OHE'de karşılaşılan en yaygın ölüm nedenidir. Bu oran tecrübesiz veteriner hekimler ve öğrencilerin katıldığı operasyonlarda daha da artmakta ve %20'leri bulmaktadır (20,24). Burrow ve ark. (4), yaptıkları çalışmada %6.4 oranında operasyon sırasında kanama belirlenmiştir. Bu çalışmada, karşılaşılan %6.6 (2/30) kanama komplikasyonu yukarıdaki çalışmalar ile benzer bulunmuştur. Komplikasyon şekillenen hayvanlarda kanama odağının belirlenmesi için ensizyon hattı genişletilmiş ve kanama durdurulduktan sonra operasyona devam edilmiştir. Bu faktör G2'de ortalama anestezi süresinin G1'den daha uzun bulunmasını ve ensizyon hattının G3 ile yaklaşık aynı boyutlarda olmasını açıklayabilir.

Nabız sayısını etkileyen çok sayıda çevresel ve bireysel faktör bulunmaktadır. Örneğin, anestezi kalma süresinin büyük ırk bir köpekte HFr'nin 55 atım/dk'nın altına düşmemesi gereklidir. Ancak bu değer küçük ırk bir köpek için yüksek, prepubertal hayvanlarda ise çok daha yüksek olabilir. Sağlıklı ve anestezi madde almayan bir köpekte SAP 140-160 mmHg, DAP 85-95 mmHg ve MAP 100-110 mmHg'dır (8). MAP değeri hipo- ya da hiper- tansiyonun belirlenmesinde tercih edilmeli, 65

mmHg altı değerler hipotansiyon göstergesi olarak değerlendirilerek önlem alınmalıdır. Bu düzeyin altında hayvan yeterli doku dolaşımını sağlayamaz (8). Elde ettiğimiz veriler MAP değerlerinin vücut ağırlıklarına göre farklı seyrettiğini göstermektedir. Her ne kadar G1'de MAP değeri 68.8 mmHg ile alt sınıra yaklaşmış olsa da aşağıda tartışıldığı üzere G1'deki yüksek HFr ve RFr düzeyleri düşük MAP değerini kompanze ederek yeterli doku dolaşımını sağlamıştır.

Höglund ve ark. (17) yaptıkları çalışmada ovarium pedikülüne yapılan akut zararlı uyarıların HFr ve SAP değerinde artışa neden olduğunu göstermiştir. Benzer bulgu piyometral ve normal köpekler arasındaki karşılaştırmada da belirlenmiştir (25). Bu artış sempatik otonom sinir sisteminin aktivasyonu sonucunda şekillenmektedir. Zararlı uyarılar noradrenalin ile vasopressin salgılanmasını tetiklemekte ve bunun yansıması HFr ile kan basıncında artış olarak belirlenmektedir. Höglund ve ark. (17) çalışmalarında birinci ve ikinci ovariumu vücuttan uzaklaştırırken ölçümlerini yapmış ve her iki ovarium arasında parametrelerin düzelmesi için 15 dakika beklemişlerdir. Bu çalışmada ise operasyon sırasında komplikasyon şekillenmedikçe beklenilmemiştir ve HFr tüm gruplarda operasyon başlangıcından sonuna kadar azalan bir eğri izlemiştir. Ancak ovariumlara dokunulduğunda G1'de özellikle G2'ye göre HFr'de önemli bir artış olmuştur. Gruplardaki bu yükselmenin yukarıda belirtildiği şekilde sempatik otonom sinir sisteminin aktivasyonundan kaynaklandığı düşünülebilir (17,25).

Solunum sayısı ve derinliğinin görsel takibiyle solunum sistemi değerlendirilebilir (8). Ancak görsel olarak belirlenen siyanosiz ile solunum sayısı ve derinliğinin değerlendirmesi özellikle hafif ve orta düzeydeki- hipoksi olgularının belirlenmesinde yetersiz kalabilir (26). Normal solunum sayısı 10-20 nefes/dk olmalı ve bu değer 8-10 nefes/dk altına düştüğünde müdahale edilmelidir (27). Grupların RFr'leri incelendiğinde ortalama en yüksek sonuçların G1'de olduğu görülmektedir. Bu bulgu HFr sonuçlarına benzerdir. Buna rağmen gruplar arasında fark sadece sağ ovariuma ulaşma noktasında G1 ve G2 arasında bulunmuştur. Diğer noktalar arasında fark olmaması belirlenen bu yüksekliğin rastlantısal olduğunu düşündürmektedir.

Solunum sayısı solunumun nasıl olduğu hakkında tek başına fikir vermeyebilir. Burada SPO₂ devreye girmektedir. Oksijen saturasyonu kan dolaşımındaki hemoglobinin oksijen taşıma kapasitesini ifade eder ve akciğerlerin dokulara yeterli oksijeni dağıtıp dağıtmadığının göstergesidir (8). Normal bir hastada SPO₂ oranı %95-100 arasında seyretmelidir. Bu oranın %90-95 arasında olması solunum veya dolaşım sorunu başlayabileceğine işaret eder, tetikte olmayı gerektirir. Oran %90'ın altına inmedikçe hasta hipoksik sayılmaz, %85'in altına inmedikçe siyanosis şekillenmez (27). Bizim çalışmamızda SPO₂ düzeyleri %95.7 ile %96.3 arasında seyretmiş ve %95'in altına inmemiştir, bu da istenilen bir düzeydir. Bu veriler ortalama RFr düzeyleri gruplar arasında değişse bile SPO₂'nin bu değişimden etkilenmediğini ve operasyon sırasında dolaşımdaki hemoglobin konsantrasyonunun yeterli düzeyde sağlandığını göstermektedir.

Azalan vücut ısısı birçok sistemi etkiler. Örneğin hipotermi sonucunda sempatik sinir sistemi uyarılır ve bradikardi,

kardiyak aritmiler ve baroreseptör refleksinde depresyon şekillenebilir (15,28). Köpeklerde 37.7-39.2 °C arasında olan normal vücut ısısının (29) 37 °C'nin altına düşmesi hipotermi göstergesidir (30). Hipotermi Armstrong ve ark. (31)'na göre üç farklı derecede değerlendirilir; hafif hipotermi (32-35 °C), orta dereceli hipotermi (32-28 °C) ve ciddi dereceli hipotermi (<28 °C). Operasyon sırasında canlılar anestezi ajanları, ilaçlar, aşırı derecede sıvı kaybı, kan kaybı, operasyon bölgesinden şekillenen evaporasyon gibi nedenlere bağlı olarak termoregülasyonlarını idame edemezler (30). Ayrıca, genel anestezi vazokonstriksiyonu uyarır ve buna bağlı olarak vücut ısısı yeniden dağıtılır. Dolayısıyla cerrahi girişimler sırasında vücut ısısının takibi ve diğer sistemlerle ilişkisinin değerlendirilmesi hayati önem taşır (8). Cerrahi girişimler esnasında hastaların vücut ısısı sıklıkla düşmekte ve hatta bazıları hipotermiye girmektedir. Vücut ısıları kedilerin %97.5'inde 36.5 °C'nin altında, insanların %28.3-57.8'inde <35 °C'nin altında (30) ve köpeklerin %83.6'sında <36.5 °C altında seyretmektedir (32). Bu bilgiler ışığında (30-32) vücut ısılarının operasyon süresince derece derece azaldığı yönündeki bulgumuz beklenen bir sonuçtur. On dakikada bir yapılan ölçümlerde grupların ortalama vücut ısıları G1, G2 ve G3 için sırasıyla de 0.5 - 1.9 °C; 0.1 - 1.0 °C ve 0.1 - 0.8 °C arasında düşmüştür. Bu sonuç vücut ısısının zaman içinde 0.3 °C ile 2.0 °C arasında azalabileceğini bildiren yayınlarla benzerdir (3,32). Ancak bizim çalışmada vücut ağırlığı arttıkça vücut ısısının daha az oranda düştüğü dikkati çekmektedir. Bunun nedeni vücut yağ oranının termoregülasyonda, ısı kaybında ve ilaç metabolizmasında önemli rol oynaması olabilir (33).

Özet olarak, bu çalışmada ovariohistektomi operasyonları sırasında köpeklerin vücut ağırlıklarının değerlendirilen parametrelerden nabız sayısı ve kan basınç düzeyleri arasında farklılıklara, özellikle kritik noktalara dokunulduğunda, yol açtığı belirlenmiştir. Kritik noktalara ulaşıldığındaki ortalama HFr'nin G1'de diğer gruplardan daha yüksek, MAP ise G3'te daha yüksek bulunmuştur. Çalışmadaki hayvan sayısı, elde edilen verilerin rutin operasyonlar sırasında ve bilimsel çalışmalarda kullanılabilir nitelikte olması için yeterlidir. Ancak daha geniş bir hayvan popülasyonu ile çalışıldığı takdirde bireysel farklılıkların saptanması ve bunların çalışma verilerini etkileme derecesi belirlenebilir. Bunun yanında gelecekte bu tip çalışmaların planlanmasında vücut ağırlıkları yerine ırk büyüklüklerine göre (küçük, orta ve büyük ırklar) planlanmasının daha uygun sonuçlar vereceği öngörülmektedir.

TEŞEKKÜR

Gülşah SARAL'ın "Köpek büyüklüklerine göre ovariohistektominin optimal süresi ve monitörizasyon parametrelerinin araştırılması" başlıklı yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar, araştırmanın potansiyel bir çıkar çatışması olarak yorumlanabilecek herhangi bir ticari veya finansal ilişki olmaksızın yürütüldüğünü beyan etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Küçükaslan İ, Kaya D. (2015). Östrojen ve Zayıf Östrojenler. Türkiye Klinikleri J Vet Sci Obstet Gynecol-Special Topics. 1: 87-92.
2. Öcal H, Doğan H, Saat N, Aydın M. (2015). Progesteron, Progesterinler ve Antiprogesterinler. Türkiye Klinikleri J Vet Sci Obstet Gynecol-Special Topics. 1: 60-86.
3. Demir O, Erdoğan G. (2019). Early Ultrasonographic Findings after Ovariohysterectomy Operation in Bitches. Animal Health Prod and Hyg. 8: 621 – 626.
4. Burrow R, Batchelor D, Cripps P. (2005). Complications Observed During and after Ovariohysterectomy of 142 Bitches at A Veterinary Teaching Hospital. Vet Record. 157: 829-833.
5. Tavares IT, Barreno RR, Sales-Luís JP, Vaudano CG, Jaber JR. (2021) Laparoscopic Castration Using Bipolar Forceps vs. Orchiectomy in Dogs: A Comparison of Two Techniques. Animals. 11: 3041.
6. Mwangi WE, Mogoia EM, Mwangi JN, Mbutia PG, Mbugua SW. (2018). A Systematic Review of Analgesia Practices in Dogs Undergoing Ovariohysterectomy. Vet World. 11(12): 1725-1735.
7. Kürüm B, Pekcan Z, Kalender H, Kumandaş A, Can Mutan O, Elma E. (2013). Comparison of Propofol-Remifentanyl and Propofol-Fentanyl Anesthesia During Ovariohysterectomy in Dogs. Kafkas Üniversitesi Vet Fak Derg. 19 (Suppl A): A33-A40.
8. Hall LW, Clarke KW, Trim CM. (2001). Patient Monitoring and Clinical Measurement. In: Veterinary Anaesthesia. Hall LW, Clarke KW, Trim CM (eds). 10th ed. pp. 29-57. Saunders, London, England.
9. Grubb T, Sager J, Gaynor JS, Montgomery E, Parker JA, Shafford H, Tearney C. (2020). 2020 AAHA Anesthesia and Monitoring Guidelines for Dogs and Cats. J Am Anim Hosp Assoc. 56(2): 1-24.
10. Muraro L, White RS. (2014). Complications of Ovariohysterectomy Procedures Performed in 1880 Dogs. Tierärztliche Praxis Ausgabe Kleintiere. 42: 297-302.
11. Benson GJ, Grubb TL, Neff-Davis C et al. (2000). Perioperative Stress Response in the Dog: Effect of Pre-emptive Administration of Medetomidine. Vet Surg. 29: 85-91.
12. Vaisanen M, Raekallio M, Kuusela E et al. (2002). Evaluation of The Perioperative Stress Response in Dogs Administered Medetomidine or Acepromazine as Part of The Preanesthetic Medication. Am J Vet Res. 63: 969-975.
13. Van Goethem B, van Nimwegen SA, Akkerdaas, Murrell JC, Jolle K. (2012). The Effect of Neuromuscular Blockade on Canine Laparoscopic Ovariectomy: A Double-Blinded, Prospective Clinical Trial. Vet Surg. 41: 374-380.
14. Bubalo V, Moens YP, Holzmann A, Coppens P. (2008). Anaesthetic Sparing Effect of Local Anaesthesia of Ovarian Pedicle During Ovariohysterectomy in Dogs. Vet Anaesth Analg. 35: 537-542.
15. Höglund OV, Olson K, Hagman R, Öhlund M, Olsson U, Lagerstedt AS. (2011). Comparison of Haemodynamic Changes During Two Surgical Methods for Neutering Female Dog. Res Vet Sc. 91: 159-163.
16. Boscan P, Monnet E, Mama K et al. (2011). A Dog Model to Study Ovary, Ovarian Ligament and Visceral Pain. Vet Anaesth Analg. 38: 260-266.
17. Höglund V, Hagman R, Olsson K, Olsson U, Lagerstedt AS. (2014). Intraoperative Changes in Blood Pressure, Heart Rate, Plasma Vasopressin and Urinary Noradrenalin During Elective Ovariohysterectomy in Dogs: Repeatability at Removal of The 1st and 2nd Ovary. Vet Surg. 43: 852-859.
18. Roberts C. (2017). Choice of Suture Pattern for Linea Alba Closure. Veterinary Evidence. 2(3): 1-11.
19. Adin CA. (2011). Complications of Ovariohysterectomy and Orchiectomy in Companion Animals. Veterinary Clinics: Small Anim Pract. 41: 1023-1039.
20. Berzon JL. (1979). Complications of Elective Ovariohysterectomies in the Dog and Cat at A Teaching Institution: Clinical Review of 853 Cases. Vet Surg. 8: 9-91.
21. Davidson E, Moll HD, Payton ME. (2004). Comparison of Laparoscopic Ovariohysterectomy and Ovariohysterectomy in Dog. Vet Surg. 33: 62-69.
22. Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS. (2001). Canine and Feline Theriogenology. WB Saunders Company, London, pp. 168–224
23. Pearson H. (1973). The Complications of Ovariectomy in Bitch. Small Anim Pract. 14(5): 257-266.
24. Dorn AS, Swist RA. (1977). Complications of Canine Ovariohysterectomy. Journal of the American Anim Hos Assoc. 13: 720-724.
25. Höglund V, Lövebrant J, Olsson U, Höglund K. (2016). Blood Pressure and Heart Rate During Ovariohysterectomy in Pyometra and Control Dogs: A Preliminary Investigation. Acta Vet Scand. 58: 80.
26. Campbell V, Drobatz K, Perkowski S. (2003). Postoperative Hypoxemia and Hypercarbia in Healthy Dogs Undergoing Routine Ovariohysterectomy or Castration and Receiving Butorphanol or Hydromorphone for Analgesia. J Am Vet Med Assoc. 222: 330-336.
27. Anonim. Monitoring the anesthetized patient. Erişim: http://www.ruralareavet.org/PDF/Anesthesia-Patient_Monitoring.pdf. Erişim tarihi: 26.06.2017.
28. Höglund K, Hanas S, Carnabuci C et al. (2012). Blood Pressure, Heart rate, and Urinary Catecholamines in Healthy Dogs Subjected to Different Clinical Settings. Vet Intern Med. 26: 1300-1308.
29. Carlson DG, Griffin JM. (2007). Normal Physiological Data. In: Dog Owner's Home Veterinary Handbook. Debra ME, Liisa DC, Carlson DG, Giffin JM, Adelman B, (eds). 4th ed.p.573. Howel Book House, New Jersey, USA
30. Pottie RG, Dart CM, Perkins NR, Hodgson DR. (2007). Effect Hypothermia on Recovery from General Anaesthesia in Dog. Aust Vet J. 85:158-162.
31. Armstrong SR, Roberts BK, Aronsohn, M. (2005). Perioperative Hypothermia. J Vet Emerg Crit Care. 15: 32–37.
32. Redondo JI, Suesta P, Serra I et al. (2012). Retrospective Study of the Prevalence of Postanaesthetic Hypothermia in Dogs. Vet Rec. 171: 374.
33. Piccione G, Giudice E, Fazio F, Refinetti R. (2011). Association Between Obesity and Reduced Body Temperature in Dogs. Int J Obesity. 35: 1011–1018.

✉ Sorumlu Yazar:

Serhan Serhat AY
 Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji AD, Samsun, TÜRKİYE
 E-posta: serhan.ay@omu.edu.tr



Yetiştirici Koşullarında Halep Keçisi Oğlaklarında Doğrusal ve Doğrusal Olmayan Yöntemlerle Büyümenin Tahmin Edilmesi

Halit Deniz ŞİRELİ^{1,a,✉}, Mehmet ÇOLAK^{1,a}

¹Dicle Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Diyarbakır, TÜRKİYE

²Kurtalan İlçe Tarım Müdürlüğü, Siirt, TÜRKİYE

^aORCID: 0000-0002-0711-0750; ^aORCID: 0000-0001-7538-9194

Geliş Tarihi/Received
17.02.2022

Kabul Tarihi/Accepted
30.05.2022

Yayın Tarihi/Published
30.06.2022

Öz

Bu çalışmanın amacı, entansif koşullarda yetiştiriciliği yapılan Halep keçilerinde Linear, Gompertz ve Richards büyüme eğrisi modellerini kullanarak, büyümeye ait değişimlerin matematiksel modellerle ortaya konulması ve en iyi uyumu gösteren modelin tespiti hedeflenmiştir. Çalışmada, 30 baş erkek ve 30 baş dişi toplam 60 baş Halep keçisi oğlağına ait doğum ve 7. ay canlı ağırlık verileri kullanılmıştır. Kullanılan modeller arasından en iyi modeli belirlemek için, belirleme katsayısı (R^2) ve ortalama hata kareleri (HKO) istatistiksel değerleri kullanılmıştır. Tek doğan (0.98 ± 2.66), ikiz doğan (0.97 ± 1.33) ve dişi Halep keçisi oğlaklarında (0.98 ± 1.31), Richards büyüme eğrisi modeli büyümeyi en iyi açıklayan model olduğu belirlenmiştir. Erkek Halep keçisi oğlaklarında ise denenen modellerin tümü sırasıyla 0.975 ± 1.76 , 0.976 ± 2.01 ve 0.976 ± 2.49 bulunmuş olup, Gompertz ve Richards modelleri aynı ölçüde tanımlamasına rağmen, HKO değeri en küçük olan Gompertz modelin büyümeyi tanımlayan en iyi model olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak, tespit edilen belirtme katsayıları (R^2) son derece yüksek olmasına karşın, bunlara ait HKO değeri küçük olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle kullanılan büyüme modellerinin araştırma materyalimiz olan Halep keçisi oğlakları ile iyi bir uyum sağladığını, yapılması düşünülen erken seleksiyon ile oldukça isabetli sonuçların elde edilebileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Büyüme modeli, canlı ağırlık, cinsiyet, doğum tipi, Halep keçisi

Estimating Growth in Damascus Goat Kids with Linear and Nonlinear Methods in Breeding Conditions

Abstract

The aim of this study is to reveal the changes in growth with mathematical models by using Linear, Gompertz and Richards growth curve models in Damascus goats reared under intensive conditions and to determine the model that shows the best fit. In the study, birth and 7th month live weight data of 30 male and 30 female total 60 Damascus goat kids were used. In order to determine the best model among the models used, statistical values of coefficient of determination (R^2) and mean squares of error (MSE) were used. In single born (0.98 ± 2.66), twin (0.97 ± 1.33) and female Damascus goat kids (0.98 ± 1.31), the Richards growth curve model was determined to be the model that best explains growth. In male Damascus goat kids, all of the tested models were 0.975 ± 1.76 , respectively; 0.976 ± 2.01 ; It was found to be 0.976 ± 2.49 , and although Gompertz and Richards models were described to the same extent, the smallest MSE model was found to be the best model for describing growth. As a result; Although the coefficients of determination (R^2) determined were extremely high, MSE were also found to be so small. For this reason, it was concluded that the growth models used were in good agreement with our research material, Damascus Goat kids, and that very accurate results could be obtained with the early selection that is thought to be made.

Key Words: Birth type, Damascus goat, growth model, live weight, sex.

GİRİŞ

Büyüme, canlıların ortak özelliklerinden birisidir ve hem ekonomik hem de fizyolojik anlamda önem arz etmektedir. Büyüme farklı şekillerde tanımlanmış olup, canlıların sahip oldukları hücrelerin hem sayısal hem de büyüklüklerinin artışı veya canlıların ağırlık ve boyutlarının, belirli bir zaman dilimi içerisinde artışı olarak tanımlanmasıdır (1-4). Hayvanlarda büyümeyi tanımlayabilmek için farklı modeller kullanılmak-

tadır. Her canlının büyümesi farklı olup o canlıyı en iyi tanımlayan modeller geliştirilmiştir (5). Büyüme eğrisi, zamanın yaşı'nın bir fonksiyonu olarak ağırlık grafiğidir. Eğri, zamanla hayvanın vücudunda meydana gelen kademeli bir artış şeklinde olup sigmoidal şeklindedir. Sigmoid eğrisinin üç farklı aşaması vardır. Büyümenin başladığı hazırlık aşaması yani doğum öncesi dönemdir. Eğrinin hızlı bir artış gösterdiği dönem yani doğum sonrası, son kısım ise büyüme ve gelişmenin azaldığı hatta durduğu dönem yani ergin yaş dönemidir (6,7).

Büyüme doğumdan önce başlayıp ergin döneme kadar devam etmektedir. Doğumdan önce oransal olarak az bir büyüme meydana gelmekte ve başlangıçta yavaş olan büyüme, doğumu takiben artmaya başlamaktadır. Çünkü doğumdan sonraki dönemde büyüme birimlerindeki artış zamana göre daha fazla olmaktadır. Bu dönem hayvanların büyüme yönünden en fazla kazançlı oldukları dönemdir. Bu dönemde kısa zamanda oransal olarak hızlı bir gelişme olmaktadır. Eğrinin üst kısmındaki bükülme, bütün dokuların büyüme ve gelişmesini durdurduğunu ya da yavaşladığını göstermektedir(7-9).

Bu çalışmada, Halep keçisi oğlaklarının doğum ve 7. aya kadar canlı ağırlıkları alınmış ve farklı büyüme eğrisi modelleri kullanılarak büyümenin tanımlanmasına çalışılmıştır.

Çalışmada, regresyon analizi ile doğrusal, Gompertz ve Riharrds modellerinin kullanımı ile de doğrusal olmayan (non-linear) modeller ile büyümeleri tanımlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Çalışmanın hayvan materyalini, Diyarbakır ilinde özel bir entansif süt keçisi işletmesinde 30 baş erkek ve 30 baş dişiden oluşan toplam 60 baş Halep keçisi (Damascus veya Şami) oğlağı oluşturmuştur.

Metot

Çalışmada, entansif süt keçisi yetiştiriciliği yapan özel bir işletmede, cinsiyet ile doğum tipi dikkate alınarak tespit edilen 60 baş Halep keçisi oğlaklarından alınan, doğum ve 7 aylık canlı ağırlıklar oluşturmuştur.

Halep keçisi oğlakları, doğumdan sonra ilk 24 saat süre aşmadan 10 gr hassas (Dikomsan CVT 20, Ankara) kantarla doğum ağırlıkları alındıktan sonra, küpeleme işlemi yapılarak kayıt altına alınmıştır. Ayrıca doğumdan hemen sonra selenyum ve E-vitamini enjeksiyonu yapılmıştır. Oğlaklar ilk bir hafta anaları ile beraber daha sonra ise gündüz saatlerinde analarından ayrı olarak, gece saatlerinde ise anaları ile birlikte tutulmuşlardır. Oğlaklarda sütten kesim zamanı ortalama 3 aylık yaşta (90 gün) olmuştur. Sütten kesim sonrası ise oğlaklar, kuru yonca otu ve büyütme yemi ile beslenmiştir. Ayrıca sütten kesim sonrasında tüm oğlaklara iç-dış parazit mücadelesi yapılmıştır. Daha sonra oğlaklar 5. aylık yaşta sonra işletmede uygulanan yemleme koşullarına göre, kuru fiğ otu ve işletmede hazırlanan keçi yemi ile beslemeleri yapılmıştır.

Çalışmada, oğlakların büyümelerini tanımlayabilmek için doğum dahil 7 aylık yaşa kadar her ay 10 grama duyarlı kantarla canlı ağırlıkları alınmıştır. Tespit edilen canlı ağırlık üzerine doğum tipi ve cinsiyet faktörlerinin etki miktarını belirleyebilmek için En Küçük Kareler Metodu kullanılarak her özellik için ayrı ayrı matematiksel modeller oluşturulmuştur. Çalışmada, canlı ağırlık ortalamaları arasındaki farklar Duncan testi kullanılarak istatistiksel önem kontrolleri yapılmıştır. Oğlaklara ait doğum ağırlıkları ile

farklı dönemlere ait büyüme performanslarının tespiti için;

$$Y_{ijkl} = \mu + a_i + b_j + e_{ijk}$$

Yukarıda belirtilen, toplamalı genel doğrusal model uygulanmıştır. Faktörler arasındaki interaksiyon ise sıfır olarak değerlendirilmiştir.

Y_{ijkl} = i. doğum tipi, j. cinsiyet ve k. oğlağın canlı ağırlığı

μ = Populasyon ortalaması

a_i = i. doğum tipinin etkisi, i=1,2 (tek, ikiz)

b_j = j. cinsiyetinin etkisi, j= 1, 2 (erkek, dişi)

e_{ijk} = Hata

Büyüme Eğrilerinin Oluşturulması

Çalışmada, büyüme eğrisinin tahmin edilmesinde doğrusal yöntem (Linear) olarak regresyon analizi yöntemi kullanılırken, doğrusal olmayan yöntemlerde (Non-linear) ise Gompertz ve Richards modelleri kullanılmıştır (4,10,11).

Model Denklemleri;

Linear: $y(t) = a + b \cdot t + \epsilon$

Gompertz: $y(t) = \alpha \exp(-\beta \exp(-kt)) + \epsilon$

Richards: $y(t) = \alpha / (1 + \beta \exp(-kt))^{1/m} + \epsilon$

Bu modellerde;

y: t zamanındaki büyüklük,

t: Zaman,

a: Asimptotik büyüklük

c, b: Büyüme ile ilgili parametreler

ϵ : 2,7182 sabitidir.

Çalışmada, SPSS 12 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır (12).

BULGULAR

Çalışmada, 60 baş Halep keçisi erkek ve dişi oğlaklarında, doğum ağırlıkları ve 7 aylık canlı ağırlıklar alınmış ve bu ağırlıklara ait tanımlayıcı istatistiksel değerler Tablo 1'de verilmiştir. Buna göre cinsiyet ile doğum tipi faktörleri göz önüne alındığında doğum ağırlıkları ve 7 aylık periyotta tespit edilen canlı ağırlıklara, cinsiyet faktörü göz önüne alındığında erkek oğlakların, dişi oğlaklara göre, doğum tipi faktörü göz önüne alındığında ise, tek doğan oğlakların, ikiz doğan oğlaklara göre daha ağır oldukları tespit edilmiştir. Cinsiyet bakımından ağırlık ortalamaları arasındaki fark, doğum ağırlığı hariç tüm dönemlerde erkek oğlaklar lehine önemli ($P < 0.05$) olduğu, doğum tipi bakımından ağırlık ortalamaları arasındaki fark tek doğan oğlakların lehine doğum ağırlığı dahil tüm dönemlerde önemli ($P < 0.05$) bulunmuştur. Tablo 1'de Halep keçisi oğlaklarına ait tanımlayıcı istatistikler verilmiştir.

Tablo 1. Halep keçisi oğlaklarına ait tanımlayıcı istatistikler

Dönemler (kg)	Cinsiyet					Doğum tipi				
	n	C	$\bar{X} \pm S_x$	Min	Max	n	DT	$\bar{X} \pm S_x$	Min	Max
Doğum	30	E	3.97±0.16	2.0	5.40	30	T	4.13±0.124 ^a	2.80	5.40
Ağırlığı	30	D	3.43±0.11	2.0	5.20	30	İ	3.20±0.117 ^b	2.00	4.60
1. Ay CA	30	E	7.24±0.43 ^a	2.80	11.20	30	T	7.59±0.30 ^a	4.60	11.20
	30	D	5.73±0.24 ^b	3.60	8.60	30	İ	5.19±0.25 ^b	2.80	9.20
2. Ay CA	30	E	10.36±0.71 ^a	5.20	19.30	30	T	11.12±0.55 ^a	5.00	19.30
	30	D	8.15±0.39 ^b	5.00	11.80	30	İ	7.08±0.28 ^b	5.20	11.10
3. Ay CA	30	E	12.78±0.96 ^a	6.70	25.00	30	T	13.99±0.70 ^a	7.20	25.00
	30	D	10.26±0.43 ^b	7.10	15.40	30	İ	8.68±0.29 ^b	6.70	13.90
4. Ay CA	30	E	14.79±1.10 ^a	6.90	29.30	30	T	16.74±0.70 ^a	11.80	29.30
	30	D	11.95±0.57 ^b	7.00	18.20	30	İ	9.54±0.30 ^b	6.90	15.90
5. Ay CA	30	E	22.04±1.66 ^a	7.10	41.20	30	T	24.96±1.06 ^a	16.10	41.20
	30	D	18.66±0.80 ^b	10.30	28.10	30	İ	15.14±0.59 ^b	7.10	19.20
6. Ay CA	30	E	22.25±1.68 ^a	7.10	41.60	30	T	25.21±1.08 ^a	16.20	41.60
	30	D	18.86±0.81 ^b	10.40	28.40	30	İ	15.30±0.60 ^b	7.10	19.50
7. Ay CA	30	E	25.40±1.89 ^a	6.80	41.20	30	T	28.34±1.22 ^a	17.60	41.20
	30	D	20.66±0.89 ^b	11.80	31.00	30	İ	16.97±0.68 ^b	6.80	21.80

a,b,: Farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0.05)

CA: Canlı ağırlık, E: Erkek, D: Dişi, DT:Doğum Tipi, T:Tek doğan, İ: İkiz Doğan

Tek Doğan Halep Keçisi Oğlaklarına Ait Büyüme Eğrisi Modelleri

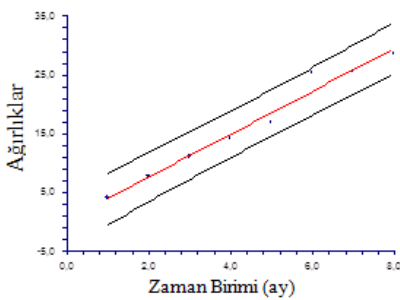
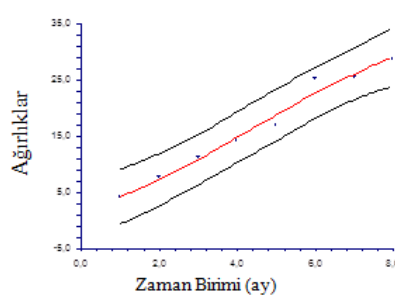
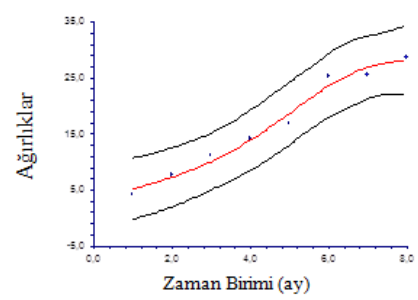
Tek doğan Halep keçisi oğlaklarının dönemsel ağırlıklarına ait büyüme eğrisi modelleri Tablo 2 ile Grafik 1, 2 ve 3 in-

celendiğinde, büyümeyi en iyi tanımlayan modelin, belirtme katsayısı (R^2) %98 olan Richards modeli olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 2. Tek Doğan Halep keçisi oğlaklarında ağırlığa ilişkin Büyüme Eğri Modelleri sonucunda elde edilen Belirtme Katsayısı (R^2) ve Hata Kareler Ortalamaları (HKO)

Model	Parametreler				R^2	HKO	A.K.
	a	b	c	d			
Linear	0.281±1.183	3.648±0.234			0.976	2.30	-0.891
Gompertz	41.93±10.40	0.262±8.14	4.16±1.095		0.979	2.42	
Richards	28.75±2.94	5.16±5.27	1.36±1.42	5.14±0.826	0.981	2.66	

y: t zamanındaki büyüklük, t: Zaman, a: Asimptotik büyüklük, c, b : Büyüme ile ilgili parametreler, e: 2,7182 sabitidir.

Grafik 1. Tek Doğan Halep keçisi Oğlaklarına ilişkin büyüme eğrisi modeli (Linear)**Grafik 2.** Tek Doğan Halep keçisi oğlaklarına ilişkin büyüme eğrisi modeli (Gompertz)**Grafik 3.** Tek Doğan Halep keçisi oğlaklarına ilişkin büyüme eğrisi modeli (Richards)

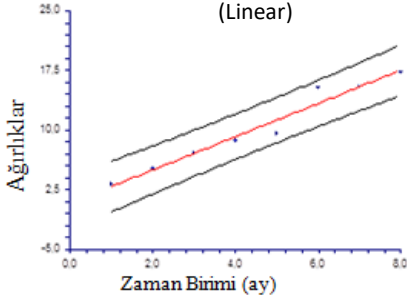
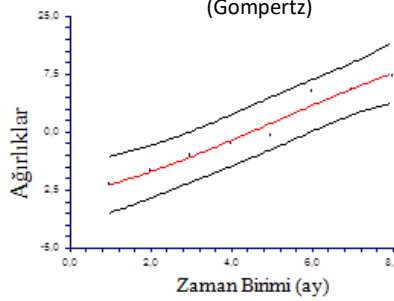
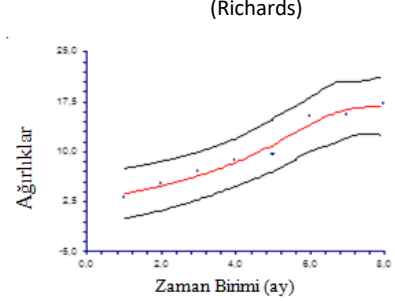
İkiz Doğan Halep Keçisi Oğlaklarında Ağırlığa İlişkin Büyüme Eğrileri İkiz doğan Halep keçisi oğlaklarının dönemsel ağırlıklara bakımından Tablo 3 ve Grafik 4, 5 ve 6 incelendiğinde,

büyümeyi en iyi tanımlayan modelin, belirtme katsayısı (R^2) %97 ile Richards modeli olduğu görülmektedir.

Tablo 3. İkiz doğan Halep keçisi oğlaklarında ağırlığa ilişkin büyüme eğri modelleri sonucunda elde edilen belirtme katsayısı (R^2) ve hata kareler ortalamaları (HKO)

Model	Parametreler				R^2	HKO	A.K.
	a	b	c	d			
Linear	0.782±0.855	2.093±0.169			0.962	1.20	-0.891
Gompertz	30.79±15.30	0.199±9.86	5.074±2.71		0.966	1.32	
Richards	16.92±1.47	9.52±16.38	2.32±4.13	5.65±1.16	0.972	1.33	

y: t zamanındaki büyüklük, t: Zaman, a: Asimptotik büyüklük, c, b : Büyüme ile ilgili parametreler, ϵ : 2,7182 sabitidir.

Grafik 4. İkiz Doğan Halep keçisi oğlaklarına ilişkin büyüme eğrisi modeli (Linear)**Grafik 5.** İkiz Doğan Halep keçisi oğlaklarına ilişkin büyüme eğrisi modeli (Gompertz)**Grafik 6.** Tek Doğan Halep keçisi oğlaklarına ilişkin büyüme eğrisi modeli (Richards)

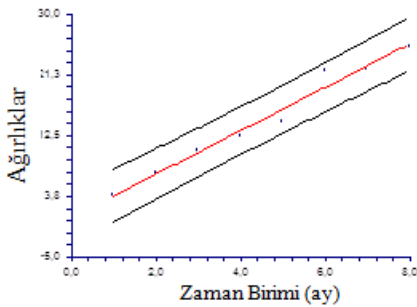
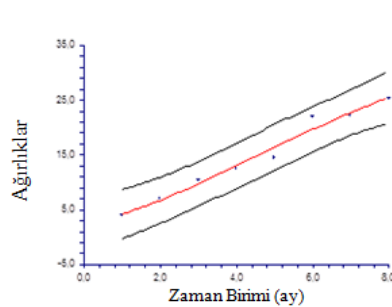
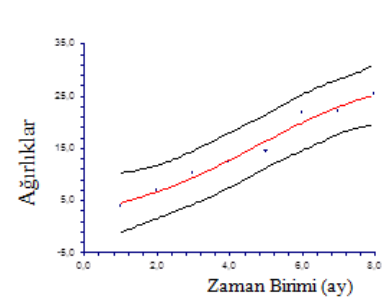
Erkek Halep Keçisi Oğlaklarında Ağırlığa İlişkin Büyüme Eğrileri
Erkek Halep keçisi oğlaklarının farklı dönem ağırlıklarına ait büyüme eğrisi modelleri Tablo 4 ve Grafik 7, 8 ve 9 incelenildiğinde, farklı dönem ağırlıklarına ilişkin belirtme katsayıları (R^2) sırasıyla; %97.5, %97.6, %97.6 olarak tespit edilmiş olup,

değerler birbirlerine çok yakın olarak tespit edilmiştir. Richards ve Gompertz modelleri erkek cinsiyet için büyümeyi en iyi tanımlayan modeller olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4. Erkek halep keçisi oğlaklarında ağırlığa ilişkin büyüme eğri modelleri sonucunda elde edilen belirtme katsayısı (R^2) ve hata kareler ortalamaları (HKO)

Model	Parametreler				R^2	HKO	A.K.
	a	b	c	d			
Linear	0.683±1.033	3.119±0.204			0.975	1.76	-0.891
Gompertz	39.40±12.45	0.233±0.084	4.45±1.52		0.976	2.01	
Richards	29.59±12.30	2.27±3.36	0.538±0.824	4.77±1.12	0.976	2.49	

y: t zamanındaki büyüklük, t: Zaman, a: Asimptotik büyüklük, c, b : Büyüme ile ilgili parametreler, ϵ : 2,7182 sabitidir.

Grafik 7. Erkek Halep keçisi oğlaklarına ilişkin büyüme eğrisi modeli (Linear)**Grafik 8.** Erkek Halep keçisi oğlaklarına ilişkin büyüme eğrisi modeli (Gompertz)**Grafik 9.** Erkek Halep keçisi oğlaklarına ilişkin büyüme eğrisi modeli (Richards)

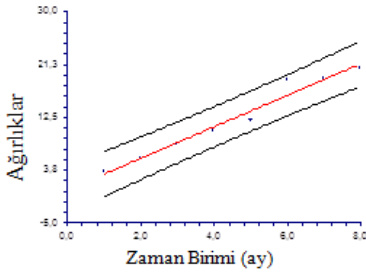
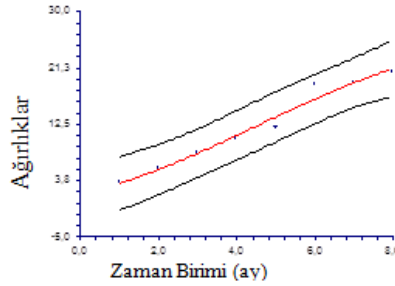
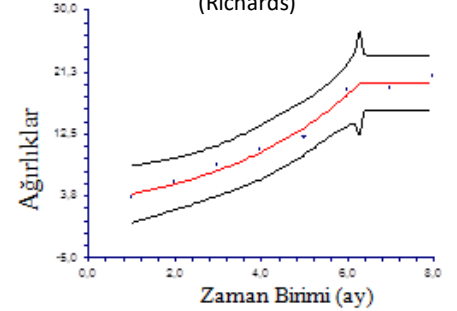
Dişi Halep Keçisi Oğlaklarında Ağırlığa İlişkin Büyüme Eğrileri
Halep keçisi dişi oğlaklarında dönemsel ağırlıklara ilişkin büyüme eğrisi modelleri Tablo 5 ile Grafik 10, 11 ve 12 in-

celendiğinde, belirtme katsayısı (R^2) en yüksek olan Richards modeli %98 ile büyümeyi en iyi tanımlayan model olmuştur.

Tablo 5. Dişi Halep keçisi oğlaklarında ağırlığa ilişkin büyüme eğri modelleri sonucunda elde edilen belirtme katsayısı (R^2) ve hata kareler ortalamaları (HKO)

Model	Parametreler				R^2	HKO	A.K.
	a	b	c	d			
Linear	0.464±1.003	2.611±0.199			0.966	1.66	-0.891
Gompertz	32.03±10.53	0.243±0.094	4.36±1.54		0.971	1.74	
Richards	19.76±0.809	156.30±11370.09	46.61±3415.46	6.19±6.22	0.982	1.31	

y: t zamanındaki büyüklük, t: Zaman, a: Asimptotik büyüklük, c, b : Büyüme ile ilgili parametreler, ε: 2,7182 sabitidir.

Grafik 10. Dişi Halep keçisi oğlaklarına ilişkin büyüme eğrisi modeli (Linear)**Grafik 11.** Dişi Halep keçisi oğlaklarına ilişkin büyüme eğrisi modeli (Gompertz)**Grafik 12.** Dişi Halep keçisi oğlaklarına ilişkin büyüme eğrisi modeli (Richards)

Çalışmada elde edilen büyüme modellerine ait belirtme katsayısı (R^2) ve hata kareler ortalaması (HKO) Tablo 6' da verilmiştir.

Tablo 6. Büyüme eğrisi modellerine ait belirtme katsayısı (R^2) ve hata kareler ortalaması (HKO)

Modeller	Özellikler	R^2	HKO
Linear	Tek	0.976	2.30
	İkiz	0.962	1.20
	Erkek	0.975	1.76
	Dişi	0.966	1.66
	Tek	0.979	2.42
Gompertz	İkiz	0.966	1.32
	Erkek	0.976	2.01
	Dişi	0.971	1.74
Richards	Tek	0.981	2.66
	İkiz	0.972	1.33
	Erkek	0.976	2.49
	Dişi	0.982	1.31

Veriler incelendiğinde, Halep keçisi doğum tipi bakımından tek ve ikiz doğum, cinsiyet bakımından ise dişi cinsiyet için en uygun modelin Richards, erkek cinsiyet için ise Richards ve Gompertz modelin birlikte uyum gösterdiği tespit edilmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmada, Halep keçisi oğlaklarının farklı dönem ağırlıklarına ait büyüme modellerinin parametre tahminleri yapılarak, bu parametrelere ait tanımlayıcı istatistikler doğum tipi (tek, ikiz) ve cinsiyet (dişi, erkek) olarak Tablo 2, 3, 4, 5 ve 6'da sunulmuştur. Tablo 2 ve 3 incelendiğinde Richards modelinde belirleme katsayısı (R^2) Tek doğan oğlaklar için %98, ikiz doğan oğlaklar için ise %97 olarak tespit edilmiş ve doğum

tipi bakımından en iyi modelin Richards olduğu tespit edilmiştir. Cinsiyet bakımından ise erkek oğlaklar için belirtme katsayısı her iki modelde de (R^2) %97 olarak bulunmuş ve büyümeyi en iyi tanımlayan modelin Richards ve Gompertz' in birlikte en uygun model olduğunu, dişi oğlaklar için ise belirtme katsayısı (R^2) %98 olarak bulunmuş ve büyümeyi en iyi tanımlayan modelin Richards olduğu tespit edilmiştir. Üç farklı modelin canlı ağırlık ve zaman arasındaki korelasyon katsayıları cinsiyetlerde ve doğum tiplerinde $R:0,89$ olarak tespit edilmiştir. Beetal keçisi oğlaklarından 12 aylık ağırlıkları olarak yapmış oldukları çalışmalarında, belirtme katsayısı (R^2) %99 olarak tespit etmişler ve büyümeyi en iyi tanımlayan modelin Brody olduğunu bildirmişlerdir (13). Benzer bir çalışmada, Sirahi keçilerinin 12 aylık ağırlıkları kullanarak 5 farklı model uygulamışlar ve Brody modelinin en iyi model olduğu, (R^2 : %99.1) bildirmişlerdir (14). Akkeçilerde yapılan çalışmada ise, belirtme katsayısını (R^2) %99.3 ile Weibull modelinin en iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir (15). Yukarıda bildirilen araştırmacıların dışında, farklı araştırmacıların da çalışmaları bu çalışmanın sonuçları ile benzer bulunmuştur (3,4,7).

Alpin, Damascus ve Yerli Tunus keçileriyle yapılan çalışmalarda Gompertz modelinin belirtme katsayısını (R^2) %71 en uygun olarak belirlemişlerken (16), çalışmalarında 5 farklı büyüme eğrisi modeli kullanmışlar ve en uygun metodun Monomoleküler ve Gompertz Modeli (R^2 : %95) ile açıklanmışlardır (17). Ayrıca Ankara keçilerinde yapılan çalışmada araştırmacılar, Logistic ($R^2:0.957$), Gompertz ($R^2: 0.956$) büyüme modellerinin de kullanılmasının uygun olduğunun kanısına varmışlardır (18). Büyümeyi tanımlamada en uygun modelin Logistic (R^2 :% 91) olduğunu bildirilmiştir (19). Ankara keçisi oğlaklarıyla yapmış oldukları çalışmalarında Logistic ve Gompertz modellerini kullanmışlar ve her iki modelin de büyümeyi aynı derecede tanımladığını (R^2 :%95) bildirmişlerdir

(20). Yukarıdaki çalışmalarda elde edilen sonuçlar, bu çalışmada elde edilen değerlerden daha düşük bulunmuştur. Yukarıda belirtilen çalışmalar ile bu çalışma sonuçları karşılaştırıldığında farklılıkların sebebi, çalışmaların farklı ırk, bakım ve besleme uygulamalarından kaynaklanabilir. Bu ve diğer çalışmaların sonuçlarına bakıldığında, hesaplaması yapılan parametre tahminlerinde, büyüme modeline göre farklılıklar olabilmektedir. Bu sebeple büyümeyi en iyi tanımlayan modelin seçiminde, model uyumuna ait farklı istatistikî ölçütler kullanılması önerilebilir. Buna bağlı olarak çalışma sonuçları karşılaştırıldığında oluşan farklılıkların sebebinin çalışmalarda farklı ırk ve bakım-besleme koşullarından kaynaklanmış olabilir.

Sonuç olarak, Halep keçisi doğum tipi bakımından tek, ikiz ve cinsiyet bakımından ise dişi cinsiyet için en uygun modelin Richards, erkek cinsiyet için ise Richards ve Gompertz modelin birlikte uyum gösterdiği tespit edilmiştir. Yaşa bağlı olarak ağırlık süreci incelendiğinde, doğum tipi bakımından tek, ikiz ve cinsiyet bakımından ise dişi cinsiyet için doğrusal olmayan Richards, modelinin, erkek cinsiyet için ise Richards ve Gompertz modellerinin, doğrusal modellerinden daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Büyüme süreci incelendiğinde büyümenin "S" şeklinde sigmoidal bir yapı gösterdiği ve bu sürecin doğrusal olmayan modeller ile tanımlanmasının daha faydalı olabileceği kanısına varılmıştır. Ayrıca bu süreçte uygulanan büyüme modellerinin seçiminde, modele ait parametrelerin, doğrusal olmayan büyüme model parametreleri gibi biyolojik olarak yorumlanabilir olması tercih edilmelidir. Halep keçisi oğlaklarında büyüme ve büyüme ile ilişkili farklı özellikler için geliştirilecek olan çevresel ve genetik ıslah programlarına fayda sağlanması hedeflenmiştir. Ayrıca kullanılan farklı büyüme eğrisi modellerinden yararlanılarak, oğlakların 7. ay canlı ağırlıklarının tahmini ile yapılacak bir erken seleksiyonun, oldukça isabetli sonuçlar verebileceği kanısına varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Mehmet Çolak'ın Yüksek Lisans Tezinden üretilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Cengiz F. (1995). Hayvanlarda Büyüme ve Gelişme. Basılmamış. S: 27-63. Ankara.
2. Tekel N. (1998). İvesi Kuzularının Süt Emme ve Meralanma Dönemlerinde Büyüme Eğrilerinin Çizilmesi Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi (Basılmamış), Ankara Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
3. Kuzu E, Eliçin A. (2002). Kilis Keçisi Oğlaklarında Değişik Vücut Ölçüleri Bakımından Büyüme Eğrileri. Tarım Bitkileri Dergisi. 8(3): 242-247.
4. Şireli HD, Ertuğrul M. (2004). Akkaraman ve Dorset Down x Akkaraman GD1 Dorset Down x Akkaraman GD1 Akkaraman ve Akkaraman x GD1 Genotipli Kuzularda Büyüme Eğrilerinin Logistic Model ile Tahmini. Ankara Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi. 10(4): 375-380.
5. Tatar AM, Tekel N, Ozkan M, Baritci I, Dellal G. (2009) The Determination of Growth Function in Young Hair Goat. J Anim Vet Adv. 8: 213-216

6. Boggs DL, Merkel RA. (1993). Live Animal Carcass Evaluation and Selection Manual. Kendall/HuntPublishing. Section 2, Page:3-10. Company Dubuque, Iowa.
7. Waheed A, Khan MS, Ali S, Sarwar M. (2011). Estimation of Growth Curve Parameters in Beetal Goats. Archiv Tierzucht. 54(3): 287-296.
8. Tariq MM, Iqbal F, Eydurani E, Bajwa MA, Huma ZE, Waheed A. (2013). Comparison of Non-Linear Functions to Describe The Growth in Mengali Sheep Breed of Balochistan. Pakistan J Zool. 45(3): 661-665.
9. Tekel N, Koncagül S, Baritci I, Şireli HD, Tutkun M, Eydurani E, Tariq MM. (2021). Comparison of Nonlinear Functions Using Partial Growth Data at Different Lengths of Growth Period in Awassi Lambs. Pakistan J Zool. 53(1): 153-158.
10. Oda V, Korkmaz M, Özkurt E. (2016). Büyüme Eğrilerinin Tahmininde Kullanılan Bazı Sigmoidal Modeller ve Elde Edilen Biyolojik Parametreler: Bertalanffy Modeli Örneği. Ordu Univ J Sci Tech. 6(1): 54-66.
11. Yıldız G, Soysal Mİ, Gürçan EK. (2009). Tekirdağ İlinde Yetiştirilen Karacabey Merinosu x Kıvrıkcık Melezi Kuzularda Büyüme Eğrisinin Farklı Modellerle Belirlenmesi. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi. 6(1).
12. SPSS 12 (2022). <https://www.scribd.com/document/39793106/Spss-v12-Data-Analysis>.
13. Magotra A, Bangar YC, Yadav AS. (2021). Growth Curve Modeling and Genetic Analysis of Growth Curve Traits in Beetal Goat. Small Ruminant Research. 195 (2021) 106300. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2020.106300
14. Waiz HA, Gautam L, Waiz SA. (2019). Appraisal of Growth Curve in Sirohi Goat Using Non-Linear Growth Curve Models. Tropical Animal Health and Production. 51: 1135-1140.
15. Kor A, Baspınar E, Karaca S, Keskin S. (2006). The Determination of Growth in Akkeci (White goat) Female Kids by Various Growth Models. Czech J Anim Sci. 51(3): 110-116.
16. Gaddour A, Najari S. (2008). Adjustment of The Kid's Growth Curve in Pure Goat Breeds and Crosses Under Southern Tunisian Conditions. J Appl Anim Res. 34: 117-120.
17. Raji AO, Sheikh LG, Mohammed ID. (2015). Comparison of Growth of Male and Female Kids of Non- Descript Goats in A Semiarid Region of Nigeria. Iranian Journal of Applied Animal Science. 5: 115-120.
18. Özdemir H, Dellal G. (2009). Determination of Growth Curves in Young Angora Goats. Tarım Bilimleri Dergisi. 15(4): 358-362.
19. Pires LC, Machado TMM, Carneiro PLS, da Silva JBL, Barbosa ADH, Torres RA. (2017). Growth Curve of Repartida Goats Reared in The Caatinga Region, Brazil. Semina: Ciências Agrárias. Doi: 10.5433/1679-0359.2017v38n2p1041.
20. Özdemir H, Dellal G. (2009). Genç Ankara Keçilerinde Büyüme Eğrilerinin Belirlenmesi. Tarım Bilimleri Dergisi. 15(4): 358-362.

✉ Sorumlu Yazar:

Halit Deniz ŞİRELİ

Dicle Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü,

Diyarbakır, TÜRKİYE

E-posta: hdsireli@gmail.com



Some Slaughter and Carcass Traits of Simmental Cattle Slaughtered in Kırıkkale Province

Cansu ATEŞ^{1,a}, Aykut Asım AKBAŞ^{2,b,✉}

¹Kars Directorate of Provincial Agriculture and Forestry, Burdur, TÜRKİYE

²Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Science, TÜRKİYE

^aORCID: 0000-0002-1993-7229; ^bORCID: 0000-0003-2235-9439

Geliş Tarihi/Received
24.03.2022

Kabul Tarihi/Accepted
17.06.2022

Yayın Tarihi/Published
30.06.2022

Abstract

This study was conducted to determine some slaughter and carcass characteristics of Simmental bulls in a private slaughterhouse in Kırıkkale province. The pre-slaughter age and pre-slaughter weights of Simmental bulls were detected as 16.91 months of age and 628.92 kg. Hot and cold dressing percentages were determined as 58.81% and 57.66%, respectively in the study. While the area of M. Longissimus dorsi (MLD) was detected as 98.19 cm²; the back fat thickness value was 0.64 cm. In the study, it was seen that carcass length, chest depth, leg length and leg width values were 205.77 cm, 73.55 cm, 63.42 cm and 65.48, respectively. This study was important in terms of Simmental cattle production in Kırıkkale province. Thereby, it can be predicted that the results of the present study will provide a data archive for further studies.

Key Words: Kırıkkale, Simmental, slaughtering and carcass traits.

Kırıkkale İlinde Kesilen Simental İrki Sığırların Bazı Kesim ve Karkas Özellikleri

Öz

Bu çalışma Kırıkkale ilinde sığır kesimlerinin yapıldığı özel bir et kombinasyonunda kesilen Simental ırkı tosunların bazı kesim ve karkas özelliklerinin ortaya konulması amacıyla yapılmıştır. Çalışmada Simental ırkı tosunların ortalama 16.91 aylık yaşta kesime sevk edildikleri ve kesim öncesi canlı ağırlık ortalamalarının ise 628.92 kg olduğu belirlenmiştir. Simental ırkı tosunlar için sıcak ve soğuk karkas randımanı değerleri sırasıyla %58.81 ve %57.66 olarak belirlenmiştir. M. Longissimus dorsi (MLD) kesit alanı ise 98.19 cm² olurken; kabuk yağı kalınlığı ise 0.64 cm olarak tespit edilmiştir. Çalışmada karkas uzunluğu, göğüs derinliği, but uzunluğu ve but genişliği değerlerinin sırasıyla 205.77 cm, 73.55 cm, 63.42 cm ve 65.48 cm olduğu görülmüştür. Çalışmanın, Kırıkkale ilinde Simental ırkının verim performansının değerlendirilmesi açısından önemli olacağı ve dolayısıyla sonraki araştırmalar için de önemli bir veri niteliğinde olacağı öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kesim ve karkas özellikleri, Kırıkkale, Simental.

INTRODUCTION

A major percentage of daily consumed protein is obtained from animal origin foods in the developed countries, and more than half of the total agricultural incomes are supplied from animals and animal origin products in these countries (1). As well as production of animal origin products, consumption amount also draws attention as a critical criterion in comparison of the developmental levels of the countries (2). At this point, cattle are one of the most important sources of meat consumption in Türkiye.

Carcass and carcass quality in cattle are the most substantial factors that determine the meat yield and also important for the breeders and consumers. In this respect, the factors that affect carcass and meat quality also are the primary issues in terms of acquiring the expected quality level. Of those factors, also sex and breed of the slaughtered animals are the privileged factors to take into consideration (3). Bulls are commonly preferred by the breeder facilities for

their superiority regarding edible meat percentage in carcasses as well as carcass tissue (4).

In Türkiye, slaughtering for cattle are performed in four different systems such as meat and milk board, municipal slaughterhouses, meat combines of private sector and uncontrolled slaughtering. Of those, slaughterhouse of public and private sectors are the institutes that apply the technological innovations and utilize from almost whole of the animals. The slaughters are performed more simply in the municipal slaughterhouses and less yield is obtained from the by-products of the animals (5).

A significant increase has been observed in the amount of the crossbred animals in the recent years in Kırıkkale province that has 0.43% of the total number of cattle in Türkiye (6). Also with the effect of increased cattle breeding in the province Simmental and Simmental crossbred cattle constitute a great portion of the overall existence of cattle (7).

The aim of the present study is to determine some slaughter and carcass characteristics of the bullocks from

pure Simmental breed slaughtered between 16-18 months of age as an indicator of the cattle slaughters in Kırıkkale Province.

MATERIAL AND METHODS

Animals and Data Collection

The present study was carried out in a slaughterhouse managed by a private sector company that shows activity with regular workflow and reliable records in Kırıkkale province. In the study, some slaughter and carcass characteristics of 50 male cattle from Simmental breed slaughtered between 16-18 months of age on the certain control days were identified as well as monitoring of records related with routine slaughters.

In the study, some zoometric body measurements (8) such as chest circumference, chest depth, body length and cannon-bone circumference were taken using a measuring tape before the slaughter of 50 Simmental bullocks between 16-18 months of age.

As in many slaughterhouses in Türkiye, live weights of the animals cannot be measured before the slaughter also in this private meat combine in which the slaughters were performed within the scope of the present study. Therefore, live weights of the bullocks were calculated using the formula, which was developed by Willeke and Dürsch (2002) for Simmental and applied with a very high coefficient of determination (0.94) between chest circumference and live weight, before the slaughter performed on the control days. Then, hot carcass values were obtained based on the pre-slaughter estimated live weight calculated by the specified formula; Estimated live weight = $137.6 - 2.647 \times \text{chest circumference} + 0.024 \times (\text{chest circumference})^2$

On the day of slaughtering, after noncarcass components such as head, feet, skin were recorded, hot carcass weights were determined. After, the carcasses were stored at +4°C for 24 hours in the cold storage room. The weights were measured and hot and cold dressing percentages were determined based on the estimated pre-slaughter live weight.

In the study, some carcass measurements including the carcass length, chest depth, leg length and leg width were detected. Also, the region between the 12th and 13th ribs was used to determine the *M. Longissimus dorsi* (MLD) cross-sectional area. The MLD cross-sectional area was drawn on a tracing paper, as stated by Akbaş et al., (2018), and transferred into a computer by scanning. Then, the MLD cross-sectional area was determined using AutoCAD (2019) drawing software. The backfat thickness was measured and calculated by using a digital caliper in the same crosssection.

The study was approved by the Burdur Mehmet Akif Ersoy University Local Ethics Committee on Animal Experiments (18.09.2019, resolution number: 538).

Statistical Analyses

The data were statistically compared by using 19.1.1 version of Minitab (2019) statistical packaged software. An intense descriptive statistical analysis was applied on the data with the means and standart errors of means.

RESULTS

Table 1 shows the values of some zoometric measurements such as chest circumference, chest depth, body length and cannon-bone circumference for 50 Simmental bulls aged between 16-18 months taken on certain days before the slaughter. According to the table, mean values of chest circumference, chest depth, body length and cannon-bone circumference were detected to be 206.35 cm, 77.70 cm, 133.69 cm and 22.15 cm, respectively.

Table 1. Some zoometric body measurements of simmental bulls taken before the slaughter ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Traits	Values	CV
Chest circumference (cm)	206.35±0.91	5.12
Chest depth (cm)	77.70±0.77	6.48
Body length (cm)	133.69±0.88	6.94
Cannon-bone circumference (cm)	22.15±0.45	7.11

CV: Coefficient of Variation (%)

Slaughter and carcass characteristics of the Simmental bulls were presented in Tables 2-4. As seen in tables, While the estimated pre-slaughter live weight was 628.92 kg, hot carcass weight was detected as 58.81%. Hot and cold dressing percentages were determined as 58.81% and 57.66%, respectively in the study. While the area of *M. Longissimus dorsi* (MLD) was detected as 98.19 cm², the back fat thickness value was 0.64 cm. According to findings related to carcass measurements, it was seen that carcass length, chest depth, leg length and leg width values were 205.77 cm, 73.55 cm, 63.42 cm and 65.48, respectively.

Table 2. Certain slaughter and carcass characteristics of simmental bulls ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Traits	Values	CV
EPLW (kg)	628.92±0.55	7.18
Hot carcass weight (kg)	370.44±4.88	9.32
Dressing percentage (%)	58.81±0.22	2.65
Cold carcass weight (kg)	363.18±4.02	10.48
Chilling loss (%)	1.95±0.12	9.67
Cold dressing percentage (%)	57.66±0.31	8.45
Head weight (kg)	28.40±0.34	8.61
4 feet weight (kg)	14.35±0.22	10.67
Skin weight (kg)	58.32±0.85	10.34
Lungs and trachea weight (kg)	14.04±0.17	8.74
Heart weight (kg)	2.27±0.03	8.80
Liver weight (kg)	7.10±0.08	7.75
Spleen weight (kg)	1.19±0.02	10.20
Kidney weight (kg)	1.43±0.02	9.55
Full stomach weight (kg)	54.88±0.69	8.95
Full intestine weight (kg)	13.80±0.16	8.23
Internal and KPH weight (kg)	21.82±0.35	10.51
Testicles weight (kg)	0.81±0.01	7.95

EPLW: Estimated pre-slaughter live weight KPH: Kidney, pelvic, and heart fat

CV: Coefficient of Variation (%)

Table 3. Percentages of some noncarcass components of simmental bulls (%) ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Traits	Values	CV
Head ratio	4.52±0.04	6.67
4 feet ratio	2.28±0.02	6.31
Skin ratio	9.27±0.07	7.09
Lungs and trachea ratio	2.23±0.01	3.76
Heart ratio	0.36±0.01	7.03
Liver ratio	1.13±0.01	9.35
Spleen ratio	0.19±0.01	11.07
Kidney ratio	0.22±0.01	4.36
Full stomach ratio	8.72±0.05	5.14
Full intestine ratio	2.20±0.02	5.07
Internal and KPH ratio	3.46±0.03	5.33
Testicles ratio	0.13±0.01	3.09

KPH: Kidney, pelvic, and heart fat CV: Coefficient of Variation (%)

Table 4. Some cold carcass characteristics of Simmental male cattle ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Traits	Values	CV
M. Longissimus dorsi area (cm ²)	98.19±2.43	6.49
Back fat thickness (cm)	0.64±0.02	10.13
Carcass length (cm)	205.77±1.76	9.24
Chest depth (cm)	73.55±0.71	7.45
Leg length (cm)	63.42±0.60	6.87
Leg width (cm)	65.48±0.77	7.11

CV: Coefficient of Variation (%)

DISCUSSION AND CONCLUSION

In the present, slaughter age and an estimated mean pre-slaughter live weights of cattle were approximately 17 months and 628.92. The hot carcass weight was found to be 370.44 kg on average and similar values reported in the studies of Uluşan et al. (13), Dannenberger et al. (14) and Konaç et al. (15). Likewise, several researchers have obtained lower hot carcass weight compared to the present study (16-25) whereas Karaçuhallılar (26) found a higher hot carcass weight (415 kg) compared to the present study.

According to the studies conducted on Simmental in Türkiye, average values of daily live weight gain, slaughter weight and dressing percentage of Simmental were reported as to be 1253.7 grams, 556.05 kg and 60.24%, respectively (27). The average dressing percentage value as one of the most important factors that determine the carcass quality was 58.81% in the present study, while Schwark and Kunert (28), Dannenberger et al. (14) and Duru and Sak (24) have reported similar values with the present study (57-58.8%). On the other hand, lower dressing percentage values (52.4-56.7%) have been reported by various researchers (15-17,19,23) compared to the present study; whereas, there are also different studies that have reported dressing percentage values between 60.2% and 67% (13,21,22,29).

Cold carcass weight was determined to be 363.18 kg in the present study and some researchers (13,14) have re-

ported similar values (343-350 kg). On the other hand, Altuntaş and Arpacık (21) and Çatıkkaş (23) have reported lower values such as 310 kg and 305 kg compared with the present study, respectively. In addition, chilling loss value (1.95%) was found to be higher than those reported by Akbulut and Tüzemen (17) (1.84%), and Duru and Sak (24) (1.36%).

In the study, cold dressing percentage was found to be 57.66%. Dannenberger et al. (14) have reported a similar value (57%); whereas Akbulut and Tüzemen (17) and Çatıkkaş (23) have reported relatively lower values (55.1% and 53.4%, respectively) while higher cold dressing percentage values (59%-65%) were also reported by different researchers (13,20,21). Also cross-sectional area of Musculus longissimus dorsi (MLD) as one of the important data related with cold carcass was determined to be 98.16 cm² in the present study; whereas, various researchers (23,28) have reported different MLD values (61 cm²-80 cm²).

In the study, some carcass measurements such as carcass length, chest depth, leg length and leg width were found to be 205.77 cm, 73.55 cm, 63.42 cm and 65.48 cm, respectively. Uluşan et al. (13) obtained higher values of carcass length (123 cm), chest depth (47 cm) and leg width (52 cm) and a similar value of leg length (63 cm).

It has been thought that various factors such as live weight at the end of fattening, pre-slaughter weight, slaughter age, body condition, management procedure may cause the differences between data obtained in the present and other studies.

It was concluded that the differences between the zoometric measurements such as chest circumference, chest depth, body length and cannon-bone circumference obtained before slaughter in the present study and those determined by other researchers resulted from the younger ages and low pre-slaughter live weight values of the animals used in the study.

As a result; knowing the slaughtering rate in a country, even in the limited regions of the country, is important in terms of meeting the need to meat and orientating consumption of animal origin protein of that country. In this respect, determination of number of the slaughtered cattle in the year is also important as well as the number of the recorded cattle. Therefore, regular documentation of the records in the slaughterhouses and sharing them with the required institutions should be taken into consideration.

It has been observed that breeding of culture animal and its crossbreedings has progressively increased in the recent years in Türkiye and the world. It has been seen that Simmental, one of the culture cattle breed mostly reared in Türkiye, is also evaluated intensively for meat production in Kırıkkale province where the present study was carried out. Hence, it has been concluded that the results of the present study are important specific to Kırıkkale province with respect to determination of the yield potentials of Simmental breed, breeding performances and slaughter characteristics of which have been studied by various researchers under different circumstances.

It has been concluded in this study that Simmental raised in Kırıkkale province have shown similar and furthermore superior some of meat production traits compared to world averages, therefore its breeding can be continued and integration of this breed to the red meat sector should be maintained by supplementation of breeding material.

ACKNOWLEDGMENT

This study was prepared from the first author's Master thesis

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Grandin T. (2000). *Livestock Handling and Transport*. CABI Publishing, UK.
- Sarıözkan S, Akçay A, Bayram D. (2013). Carcass Traits and Economic Assessment on Carcass Cutting of Zavot Cattle. *Ankara Univ Vet Fak Derg*. 60: 257-262.
- Akçapınar H, Özbeyaz C. (1999). *Hayvan Yetiştiriciliği Temel Bilgileri*. 1. Baskı, Kariyer Printing House, Ankara.
- Arpacık R. (1995). *Entansif Sığır Besiciliği*. 1.baskı, Şahin Printing House, Ankara.
- Alpan O, Aksoy AR. (2009). *Sığır Yetiştiriciliği ve Besiciliği*. 5. Baskı, Zafer Ofset Printing House, Erzurum.
- Turkish Standards Institution (TSI) *Livestock Statistics*. Erişim: http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002. Erişim tarihi: 25.04.2020.
- Anonymous. *TARBİL, Number of Simmental Breed Cattle by Districts in Kırıkkale Province*.<http://hbsapp.tarbil.gov.tr/Modules/TURKVET/Pages/TurkvDefault.aspx>. Erişim Tarihi: 01.08.2020.
- Kayar T. (2018). *The Comparison of Fattening Performances and Carcass Features of Limousin, Charolais, Angus and Hereford Male Cattle*. PhD Thesis, Selcuk University Health Sciences Institute, Konya.
- Willeke H, Dursch T. (2002). Prediction of The Body Weight of Simmental Heifers Using Heart Girth Measurements. *Arch Tierz*. 45(1): 23-28.
- Akbaş AA, Sarı M, Elmaz Ö, Saatçı M. (2018). Comparison of Two Methods Using Measurement of the Surface Area of M. Longissimus Dorsi (MLD). *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg*. 58(2): 77-80.
- AutoCAD. (2019) *AutoCAD Software*. Mill Valley, CA, USA: Autodesk Inc.
- Minitab (2019). *Windows User's Guide*. Version 19.1.1. Minitab Inc, State College, PA, USA.
- Ulusan HOK, Solmaz R, Ekici Z. (1996). Body and Carcass Characteristics and Their Relationships in Beef Cattle. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 7-12.
- Dannenberger D, Nuernberg K, Nuernberg G, Ender K. (2006). Carcass and Meat Quality of Pasture vs Concentrate Fed German Simmental and German Holstein Bulls. *Arch Anim Breed*. 49(4): 315-328.
- Konaç V, Akbaş AA, Saatçı M. (2019). The Effects of Drinking Water Treated with Energized Oxygen on Fattening Performance in Beef Cattle. *Harran Üniv Vet Fak Derg*. 8(2): 236-242.
- Tüzemen N, Yanar M, Telliöglü S, Emsen H. (1990). A Comparative Study on The Fattening Performance and Carcass Characteristics of Holstein Friesian, Holstein, Brown and Norwegian Red x Brown Hybrid Taurus. *Doğa Tr J of Vet and Anim Sci*. 14(1): 47-54.
- Akbulut Ö, Tüzemen N. (1994). Fattening Performance and Carcass Characteristics of Brown Swiss, Holstein and Simmental Young Bulls Subjected to Fattening at 8 and 12 Month Age. *Atatürk Univ J of Agricultural Faculty*. 25(2): 134-144.
- Alpan O. (1994). Fattening and Carcass Characteristics of Brown, Holstein and Simmental Male Calves. *Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Science, Ankara*.
- Özbeyaz C, Bağcı C, Yağcı T, Alpan O. (1997). Commercial Crossbreeding of Jersey Cows for Beef Production Using Brangus, Limousin and Simmental Sires II. Fattening, Slaughtering and Carcass Characteristics. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*. 37(2): 1-22.
- Ertuğrul O, Alpan O, Umay M, Bilki A, Bulmus S. (1999). Improvement of Beef Production Traits of Southern Anatolian Red Cattle Through Crossing with Simmental Sires. *Veterinarski Arhiv*. 69(1): 17-28.
- Altuntaş M, Arpacık R. (2004). Fattening Performance and Optimum Slaughter Weights of Simmental Bulls in Different Starting Ages. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*. 44(1): 7-17.
- Aslan E. (2009). *Comparison of The Fattening Performances of Holstein, Brown and Simmental Breed Cattles Cattle Fattened in Central Anatolian Conditions*. Master Thesis. Selcuk University Institute of Science, Konya.
- Çatıkkaş E. (2015). *A Study on Carcass and Meat Quality Characteristics of Holstein, Brown and Simmental Cattle Raised in Aydın*. Master Thesis. Aydın Adnan Menderes University Institute of Science, Aydın.
- Duru S, Sak H. (2017). Fattening Performance and Carcass Characteristics of Simmental, Aberdeen Angus, Hereford, Limousin and Charolais Cattle Breeds in Turkey. *Turkish JAF Sci Tech (TURJAF)*. 5(11): 1383-1388.
- Sezgin A. (2019). *The Slaughter and Carcass Characteristics of Different Breed Cattle at Meat and Milk Board Ağrı Meat Processing Plant*. Master Thesis. Kafkas University Institute of Health Sciences, Kars.
- Karaçalıhalılar A. (2009). *The Determination of Carcass Quality of Finishing Cattle Slaughtered in Erzurum by Seurop System*. Master Thesis. Atatürk University Institute of Science, Erzurum.
- Koç A. (2016). *A Review on Simmental Raising: II. Studies in Turkey*. Adnan Menderes University Journal of the Faculty of Agriculture. 13(2): 103-112.
- Schwark HK, Kunert G. (1994). Possibilities for Increasing Meat Production by Optimum Usage of Resources. *Tierzucht*. 28(1): 5-8.
- Medic D, Veselinovic S, Petkovic D, Badulic S. (1991). Fattening Performance and Carcass Quality of Crossbreds of Dual-purpose of Dairy Type Cows with Beef Bulls. *Biotehnologija U Sto-carstvu*. 7(1-2): 15- 24.

✉ Corresponding Author:

Aykut Asım AKBAŞ
Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of
Veterinary Medicine, Department of Animal Science,
Burdur, TÜRKİYE
E-mail: icould_akbas@hotmail.com



The Role of Inhabited Animals With People in Human Transmission of *Blastocystis sp.*

Fatih ÇAKIR^{1,a,✉}, Muttalip ÇİÇEK^{2,b}, Hasan İÇEN^c, İbrahim Halil YILDIRIM^{4,d}, Akın KOÇHAN^{3,e}

¹Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Dicle University, Diyarbakır, TÜRKİYE.

²Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Ahi Evran University, Kırşehir, TÜRKİYE.

³Department of Internal Disease, Faculty of Veterinary, Dicle University, Diyarbakır, TÜRKİYE.

⁴Dicle University, Faculty of Veterinary, Department of Genetics, TÜRKİYE.

^aORCID: 0000-0002-9808-4366; ^bORCID: 0000-0003-4807-4482; ^cORCID: 0000-0002-6034-3203

^dORCID: 0000-0001-5518-5004; ^eORCID: 0000-0003-0199-4539

Geliş Tarihi/Received
09.04.2022

Kabul Tarihi/Accepted
21.06.2022

Yayın Tarihi/Published
30.06.2022

Abstract

Blastocystis sp. is a common intestinal parasite worldwide that can cause infection in humans and animals. *Blastocystis sp.* has a high genetic diversity with 17 different subtypes (ST) identified to date. Since nine of these subtypes are common in both humans and animals, it has been proposed that animals may have a role in the transmission of *Blastocystis sp.* to humans. The aim of this study is to investigate the epidemiological effect of animals on the human transmission of *Blastocystis* species by molecular methods in our country. A total of 420 faecal samples were collected from cattle, sheep, dogs, horses and chickens. Samples were stained with trichrome staining and cultivated by Jones's medium culture method. *Blastocystis* was detected in 53 (12.6%) of 420 samples. The samples were examined by Polymerase Chain Reaction (PCR) to identify nine common human subtypes. Subtypes were not detected in 33 (62.3%) of the 53 *Blastocystis* positive samples. Subtypes were detected in 20 (37.7%) samples. The detected subtypes were as follows: ST5 in four (7.5%) sheep, ST6 in six (11.3%) chickens, ST7 in 11 (20.7%) chickens, both ST6-ST7 were detected in one chicken. ST1, ST2, ST3 and ST4 - common subtypes in our country- were not detected in any animal. Sheep and chickens may be the source of human transmission of ST5, ST6 and ST7, the rare subtypes in Turkey. As a result, humans rather than animals, seem to be the source of the human transmission of *Blastocystis sp.* in Turkey.

Key Words: *Blastocystis sp.*, molecular epidemiology, polymerase chain reaction.

Blastocystis sp.'nin İnsanlara Bulaşında İnsanlarla Yakın İlişkili Hayvanların Rolü

Öz

Blastocystis sp. Dünyada yaygın görülen, insanlarda ve hayvanlarda hastalıklara sebep olabilen enterik bir parazittir. *Blastocystis sp.*'nin genetik çeşitliliği çok fazladır ve günümüzde 17 farklı subtipi (ST) tespit edilmiştir. Bu subtiplerden dokuz tanesi insanlarda ve hayvanlarda ortak olduğu için *Blastocystis sp.*'nin insana bulaşında hayvanların etken olabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmanın amacı, ülkemizde *Blastocystis sp.*'nin insanlara bulaşında hayvanların etkisini moleküler yöntemlerle epidemiyolojik olarak araştırmaktır. Çalışmamızda insanlarla yakın ilişkili çeşitli hayvanlardan 420 dışkı örneği toplandı. Bu örnekler trikrom boyama, Jones' medium kültür yöntemi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile çalışıldı. 420 örnekten 53 (%12.6)'ünde *Blastocystis* tespit edildi. *Blastocystis sp.* pozitif örneklerde insana ait subtiplerin tespiti için PZR yöntemi ile çalışıldı. *Blastocystis* pozitif 53 örnekten 33 (%62.3)'ünde (15 Sığır, 14 koyun, 2 tavuk ve 2 at dışkı örneği) dokuz *Blastocystis* subtipinden hiçbiri tespit edilmedi. 20 (%37.7) örnekte ise insana ait subtipler tespit edildi. Bu subtiplerin dağılımı şu şekildedir: 4 (%7.5) koyunda ST5, 6 (%11.3) tavukta ST6, 11 (%20.7) tavukta ST7, 1 tavukta ST6-ST7 beraber tespit edildi. Çalışma sonucunda, ülkemizde sık görülen subtiplerden ST1, ST2, ST3 ve ST4 hiçbir hayvanda tespit edilemedi. Ülkemizde nadir görülen subtiplerden ST5, ST6 ve ST7'nin insana bulaşında koyun ve tavukların kaynak olabileceği değerlendirildi. Sonuç olarak, ülkemizde *Blastocystis sp.*'nin insana bulaşında zoonotik kaynaklardan çok insanlar sorumlu gözükmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Blastocystis sp.*, moleküler epidemiyoloji, polimeraz zincir reaksiyonu.

INTRODUCTION

Blastocystis sp. is a common parasite that can infect humans and many different animal species. *Blastocystis sp.* has been taxonomically classified in recent years and has been placed into the *Stramenopile* line as a result of molecular studies investigating the 18s rRNA region (1). *Blastocystis sp.* can

cause a variety of diseases such as gastrointestinal symptoms (GIS), urticaria, and irritable bowel syndrome besides existing in humans without any symptoms (2-6).

To date, a total of 17 *Blastocystis sp.* - 10 of which infect humans- were found (7, 8). ST1-ST9 were reported as the most widespread subtypes common in humans and animals; ST1, ST3, and ST5 in cattle and even-toed ungulate, ST4 in

rodents, and ST6 and ST7 in poultry (2, 9-17). *Blastocystis sp.* ST10-17, except ST12, is not seen in humans and is present in primates, odd-toed ungulate, even-toed ungulate, carnivorous animals, birds, and rodents (18, 19).

One of the most discussed aspects of *Blastocystis sp.* is transmission sources. Transmission to humans is thought to be caused by oral-faecal ingestion of the cyst form of the parasite (20). *Blastocystis sp.* can infect many different mammalian and poultry species as well as humans. In recent years, it was stated that animals associated with humans can play a role in infection (21). Therefore, it is important to know the *Blastocystis* transmission routes in the prevention of *Blastocystis* related diseases (2).

The aim of this study is to investigate whether animals or humans are the main origins of *Blastocystis* transmission to humans in Turkey.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted under the responsibility of veterinarians from an animal shelter, hippodrome and pasture areas. In this study, animal faecal samples collected after spontaneous defecation were analyzed. Therefore, this study did not require Animal Ethics Committee approval in accordance with Turkish Law.

In this study, stool samples were collected from cattle, sheep, and chickens grazing in pasture areas. Dog stool samples were obtained from animal shelters and horse samples from farm and hippodrome, as no outdoor dog and horses were found.

All stool samples were screened with the trichrome staining method. In addition, the samples were cultivated to the modified jones medium. Trichrome and culture-positive samples were preserved at -20°C until the genomic investigation.

DNA Extraction

Total genomic DNA was extracted from 250 mg faeces using a DNA isolation kit (Gene MATRIX Stool DNA Purification Kit, Poland). The isolation process was according to the manufacturer's recommended procedures.

Detection of Molecular Subtypes by PCR Method

Trichrome and jones medium culture-positive samples were studied with the general primer for *Blastocystis sp.*. General primer for *Blastocystis sp.* utilized previously published by Bohm-Gloning et al. (22) primers. F: 5'-GGA GGT AGT GAC AAT AAA TC-3' R: 5'-ACT AGG AAT TCC TCG TTC ATG-3'

The samples detected positive with *Blastocystis* general primers were included in the study to determine subtypes. For the detection nine subtypes of *Blastocystis sp.*, which cause human infection, ST-specific primers were used, which were developed by Yoshikawa et al. (23)

All PCR amplifications with ST-specific primers were accomplished in a 10- μ l volume including 2 μ l of the template DNA (5 μ g/ml), 1 \times Ex Taq buffer, 0.2 U of TaKaRa Ex Taq[®] (Takara Bio Inc., Japan), 0.5 pM primers, and 0.2 mM dNTP mixture. The cycles for PCR used were firstly 94 °C for 5 min, followed by 38 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 45 s, 72 °C for 1 min and the final step at 72 °C for 10 min.

PCR products were visualised in 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide with a 98 50-bp ladder marker (50-bp to 1.5-kbp; GeneDirex Taiwan). DNAs processed according to agarose gel weights were transferred to a UV gel imaging system (Quantum ST4). The bands visualised according to the weights of the DNAs were analyzed under UV light. The detected bands are shown in (Figure 1).

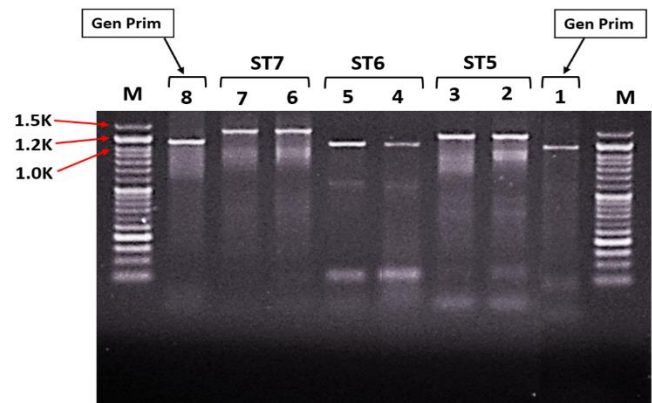


Figure 1. Agarose gel images of DNA fragments. Lane M DNA Ladder (50 bp): DNA fragments in Lanes 1 and 8 generated by general primers (1100 bp). PCR products were monitored in other Lanes generated by subtype-specific primer pairs: Lane 2 and 3, subtype 5 (1200 bp). Lane 4 and 5, subtype 6 (1050 bp). Lane 6 and 7, subtype 7 (1340 bp).

Statistical evaluation was not performed because the numerical values of the subtypes obtained were insufficient for statistical evaluation. The results were considered fold values when compared to each other.

RESULTS

In the present study, a total of 420 animal samples were collected from cattle, sheep, chickens, horses and dogs.

Blastocystis was detected in 53 (12.6%) of 420 stool samples by trichrome staining and culture method. The distribution of *Blastocystis* positive stool samples was as follows: 15 (28.3%) cattle, 18 (33.9%) sheep, 18 (33.9%) chickens, 2 (3.7%) horses. None of the 89 dogs stool samples tested positive for *Blastocystis*.

A total of 53 samples were studied by the polymerase chain reaction (PCR) method to identify *Blastocystis* subtypes. First of all, using *Blastocystis sp.* general primers, 53 isolates were confirmed to be *Blastocystis*.

In the PCR performed with nine subtype-specific primers of *Blastocystis sp.*, 33 (62.2%) of 53 samples were not found to have human subtypes. The distribution of human subtype negative 33 samples was as follows: 15 (28.3%) cattle samples, 14 (26.4%) sheep samples, 2 (3.7%) chicken and horse samples (Table 1).

20 (37.7%) of 53 samples were determined to have human subtypes, ST5 was detected in four sheep stool samples, ST6 in six chicken samples, ST7 in 11 chicken samples. ST6 and ST7 were seen together in one of the chicken stool samples (Table 1).

Table 1. Distribution of *Blastocystis sp.* subtypes in animals

	ST5	ST6	ST7	Nonsubtype	Total
Cattle	0	0	0	15	15
Sheep	4	0	0	14	18
Chicken	0	6	11	2	18
Horse	0	0	0	2	2
Dog	0	0	0	0	0
Total	4	6	11	33	53

^aST6 and ST7 were seen together in one of the chicken stool samples.

DISCUSSION AND CONCLUSION

In the present study, samples identified as positive with the trichrome staining and culture methods were detected as positive by PCR as well. Studies on this subject show that molecular tests are as reliable as the culture method (24-26). In a study by Santos et al. (25), comparing the detection methods of *B. hominis*, the culture method was found to be the most reliable one, followed by PCR performed with culture samples, and PCR from the direct stool. Roberts et al. (24) in a study comparing PCR and culture methods in the detection of *B. hominis*, claimed that the PCR method was more sensitive than the culture method. Furthermore, in another study conducted by Parkar et al. (26), molecular methods were found to be superior to the culture method. When the results of the current study are evaluated in terms of other studies, it can be said that the trichrome staining method, culture method, and the PCR method are reliable methods for identification of *Blastocystis sp.*. These results show that although there are many steps in the isolation process of the stool and it is labor-consuming, the PCR method is as reliable as trichrome and culture methods in the detection of *Blastocystis sp.*

On the other hand, only 2 out of 98 horse stool samples collected from the hippodrome were positive, while none of the 73 dog stool samples collected from the dog shelters were positive. The reason for this situation might be the antiprotozoal drugs which were given to these animals parenterally and added to their feed in hippodrome or in dog shelters.

Furthermore, ST5 was detected in 4 (7.5%) sheep samples (Table 1). Studies conducted around the world indicate that ST5 is an animal-sourced subtype and that poor hygiene plays a very important role in the transmission of the agent to humans (11, 12).

Studies in the world have identified ST5 in cattle and pigs (11, 12). Interestingly in this study, ST5 was detected in sheep. Alfellani et al. (27) in a study investigating the prevalence of *Blastocystis sp.* in livestock and zoo animals, reported that ST5 was generally present in even-toed ungulates. In this respect, it is possible to find ST5 in sheep. However, this data should be supported by molecular sequence analyzes and different studies using more samples to be made on this subject.

In addition, ST6 was detected in six (11.3%) chicken stool samples in this study (Table 1). There is no study investigating the prevalence of ST6 among chickens in Turkey. In this respect, this data is the first relevant data obtained in Turkey. In 2008, a review of the prevalence of *Blastocystis*

sp. species prepared by Tan stated that ST6 was seen especially in poultry and that they are responsible for human infections (2). In this study, ST6 *Blastocystis sp.* was detected positive at a high rate of six (35.3%) in chickens. This suggests that chickens are a potential source of *Blastocystis* infections of the ST6 subtype in humans.

ST7 was detected in 11 (20.7%) of the stool samples collected from the chickens (Table 1). Tan et al. (10) reported in their review that ST7 was seen in chickens and the host distribution was very limited as well as this subtype showed protease activity and contained serious virulence factors. In a study investigating the prevalence of *Blastocystis sp.* in humans and animals, researchers detected the ST7 in eight chickens and in eight pigs while none in humans (11). In the present study, ST7, *Blastocystis sp.* positive found with a high rate of 64.7% of the chicken group.

Subtype distribution in animal samples was observed as follows. In the samples positive with general primer, nine subtypes of *Blastocystis sp.* causing disease in humans were not detected in 15 cattle stool samples, in 14 of the 18 sheep samples, 2 of the 18 chicken samples and 2 horse stool samples.

Studies conducted in this field presented that ST1, ST3, and ST5 were common subtypes in even-toed ungulate (13-15, 28). The findings in this study are not compatible with these studies. In some studies, investigating subtypes in cattle and sheep, it was reported that ST10 and ST14 were the highest in even-toed ungulates (16, 17). Regarding these studies, since only 9 subtypes of *Blastocystis sp.* were investigated in this study, there might be subtypes like ST10 or ST14 existing in these animal samples. Cian et al., in a study about the relationship between subtypes in even-toed ungulates and humans, indicated that ST10, ST14, and ST1 were the most common in even-toed ungulates and ST10 and ST14 were not seen in humans. In a study about the subtype relationships in even-toed ungulates and humans, Cian et al. indicated that ST10, ST14, and ST1 were the most common subtypes in even-toed ungulates while ST10 and ST14 were not present in humans. The study, also stated that the studies claiming ST1 transmission to humans via animals were very limited (17). The findings of the current study as well as Cian and colleagues' work show that cattle and sheep are not very effective in human infection of *Blastocystis sp.*. The fact that the most common subtypes in humans are ST3, ST1, ST2 and ST4 in Turkey, are not seen in sheep and that none of the human subtypes detected in cattle support this claim.

Among the *Blastocystis sp.* subtypes, ST3, ST1, ST2, and ST4 are the most commonly observed subtypes in humans. ST5, ST6, ST7, ST8 and ST9 are very rare in our country. In this study, the most common subtypes in humans, i.e., ST1, ST2, ST3, and ST4, were not detected in any of the animals. Among the subtypes that infect humans, sheep in the transmission of ST5 and chickens in the transmission of ST6-ST7 may be sources.

According to this study, it was observed that ST5 could cause infection in sheep. On the other side, cattle have not been identified as a serious source of infection for humans.

In conclusion, animals do not seem to be an important source of infection of *Blastocystis* subtypes, which are common in humans in our country.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declared that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, et al. (2002). Phylogenetic Position of *Blastocystis Hominis* and of Stramenopiles Inferred from Multiple Molecular Sequence Data. *J Eukaryot Microbiol.* 49: 42-53.
2. Tan KS. (2008). New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews.* 21: 639-65.
3. Yakoob J, Jafri W, Beg MA, et al. (2010). Irritable Bowel Syndrome: Is it Associated with Genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res.* 106: 1033-8.
4. Balint A, Doczi I, Bereczki L, et al. (2014). Do not Forget the Stool Examination-Cutaneous and Gastrointestinal Manifestations of *Blastocystis* sp Infection. *Parasitol Res.* 113: 1585-90.
5. Lepczynska M, Chen WC, Dzika E. (2016). Mysterious Chronic Urticaria Caused by *Blastocystis* spp. *Int J Dermatol.* 55: 259-66.
6. AL FD, Hökelek M. (2007). *Blastocystis hominis* Fırsatçı Bir Patojen mi. *Türkiye Parazitol Derg.* 31: 28-36.
7. Ramirez JD, Sanchez A, Hernandez C, et al. (2016). Geographic Distribution of Human *Blastocystis* Subtypes in South America. *Infect Genet Evol.* 41: 32-5.
8. Navarro C, Domínguez-Márquez M, Garijo-Toledo M, et al. (2008). High Prevalence of *Blastocystis* sp. in Pigs Reared under Intensive Growing Systems: Frequency of Ribotypes and Associated Risk Factors. *Veterinary Parasitology.* 153: 347-58.
9. Greige S, El Safadi D, Becu N, et al. (2018). Prevalence and Subtype Distribution of *Blastocystis* sp. Isolates from Poultry in Lebanon and Evidence of Zoonotic Potential. *Parasites and Vectors.* 11: 389.
10. Tan KS, Mirza H, Teo JD, et al. (2010). Current Views on the Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Current Infectious Disease Reports.* 12: 28-35.
11. Yoshikawa H, Tokoro M, Nagamoto T, et al. (2016). Molecular Survey of *Blastocystis* sp. from Humans and Associated Animals in an Indonesian Community with Poor Hygiene. *Parasitology International.* 65: 780-4.
12. Yan Y, Su SL, Ye JH, et al. (2007). *Blastocystis* sp Subtype 5: A possibly Zoonotic Genotype. *Parasitol Res.* 101: 1527-32.
13. Stensvold CR, Alfellani MA, Norskov-Lauritsen S, et al. (2009). Subtype Distribution of *Blastocystis* Isolates from Synanthropic and Zoo Animals and Identification of A New Subtype. *Int J Parasitol.* 39: 473-9.
14. Noel C, Dufernez F, Gerbod D, et al. (2005). Molecular Phylogenies of *Blastocystis* Isolates from Different Hosts: Implications for Genetic Diversity, Identification of Species, and Zoonosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 43: 348-55.
15. Ramirez JD, Sanchez LV, Bautista DC, et al. (2016). *Blastocystis* Subtypes Detected in Humans and Animals from Colombia. *Infect Genet Evol.* 22: 223-8.
16. Fayer R, Santin M, Macarasin D. (2012). Detection of Concurrent Infection of Dairy Cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by Molecular and Microscopic Methods. *Parasitol Res.* 111: 1349-55.
17. Cian A, El Safadi D, Osman M, Moriniere R, et al. (2017). Molecular Epidemiology of *Blastocystis* sp. in Various Animal Groups from Two French Zoos and Evaluation of Potential Zoonotic Risk. *PLoS one.* 12: e0169659.
18. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, et al. (2007). Terminology for *Blastocystis* Subtypes—A Consensus. *Trends in Parasitology.* 23: 93-6.
19. Clark CG (1997): Extensive Genetic Diversity in *Blastocystis hominis*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 87: 79-83.
20. Lee H, Lee S-H, Seo MG, et al. (2018). Occurrence and Genetic Diversity of *Blastocystis* in Korean Cattle. *Veterinary Parasitology.* 258: 70-3.
21. Zhu W, Tao W, Gong B, et al. (2017). First Report of *Blastocystis* Infections in Cattle in China. *Veterinary Parasitology.* 246: 38-42.
22. Bohm-Gloning B, Knobloch J, Walderich B. (1997). Five subgroups of *Blastocystis hominis* from Symptomatic and Asymptomatic Patients Revealed by Restriction Site Analysis of PCR-Amplified 16S-like rDNA. *Trop Med Int Health.* 2(8): 771-778.
23. Yoshikawa H, Iwamasa A. (2016). Human *Blastocystis* Subtyping with Subtype-Specific Primers Developed from Unique Sequences of The SSU rRNA Gene. *Parasitology International.* 65: 785-791.
24. Roberts T, Barratt J, Harkness J, et al. (2011). Comparison of Microscopy, Culture, and Conventional Polymerase Chain Reaction for Detection of *Blastocystis* sp in Clinical Stool Samples. *Am J Trop Med Hyg.* 84: 308-12.
25. Santos HJ, Rivera WL. (2011). Comparison of Direct Fecal Smear Microscopy, Culture, and Polymerase Chain Reaction for The Detection of *Blastocystis* sp in Human Stool samples. *Asian Pac J Trop Med.* 6: 780-4.
26. Parkar U, Traub RJ, Kumar S, et al. (2007). Direct characterization of *Blastocystis* from Faeces by PCR and Evidence of Zoonotic Potential. *Parasitology.* 134: 359-67.
27. Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, et al. (2013). Genetic Diversity of *Blastocystis* in Livestock and Zoo Animals. *Protist.* 164: 497-509.
28. Thathaisong U, Worapong J, Mungthin M, et al. (2003). *Blastocystis* Isolates from A Pig and A Horse Are Closely Related to *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology.* 41: 967-75.

✉ Corresponding Author:

Fatih ÇAKIR
Dicle University, Faculty of Medicine, Department of Microbiology, Turkey Burdur, TÜRKİYE
E-mail: sfcakir@gmail.com



Hematological Status in Septic or Non Septic Dogs due to Parvoviral Enteritis

Erdem GÜLERSOY^{1,a,✉}, Amir NASERİ^{2,b}

¹Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Harran University, Şanlıurfa, TÜRKİYE

²Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Selcuk University, Konya, TÜRKİYE

^aORCID: 0000-0001-8511-0150; ^bORCID: 0000-0001-9140-5879

Geliş Tarihi/Received
09.04.2022

Kabul Tarihi/Accepted
21.06.2022

Yayın Tarihi/Published
30.06.2022

Abstract

Canine parvovirus (CPV) is an important cause of morbidity and mortality for dogs younger than 1 year-old. Canine parvoviral enteritis (CPE) is a predisposing factor for the development of sepsis. The inflammatory response to the disease may have predictive value for the alterations in the presence of sepsis. Therefore, the diagnostic approach to a septic dog with CPE should include clinical examinations followed by routine laboratory examinations such as hemogram. In this study, a total of 61 dogs, aged 4-6 months, 7 healthy (Control Group) and 54 diseased dogs with clinical signs of CPE such as anorexia, vomiting and hemorrhagic enteritis (CPE Group) were used. CPE group was divided into Septic CPE (n: 25) and Non Septic CPE (n: 29) subgroups in accordance with 2001 systemic inflammatory response syndrome (SIRS) criterias. Clinical examinations and hemogram analysis from venous blood samples were performed. When compared to the Control group, the respiratory rate (RR), heart rate (HR) and body temperature of the dogs in the CPE group were higher ($p<0.000$) and the capillary refill time (CRT) was shorter ($p<0.014$). In the comparison of Septic CPE and Non Septic CPE groups, the RR was higher in the Septic CPE group ($p<0.001$). When compared to the Control group, the leukocytes (WBC), granulocyte, mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and hemoglobin (Hb) values of the CPE group were lower ($p<0.031$) and the reticulocyte distribution width (RDW) value was higher ($p<0.001$). In the comparison of Septic CPE and Non Septic CPE groups, WBC, lymphocyte, monocytes and granulocyte values of the Septic CPE group were lower ($p<0.006$) and MCH values were higher ($p<0.004$). As a result, it was concluded that in accordance with the receiver operating characteristic (ROC) based diagnostic performance analysis, RR, WBC, lymphocyte, MCH, monocytes and granulocyte values can provide useful diagnostic information in differentiating dogs with septic and non septic CPE and may help identifying the disease severity earlier in triage and increase survival rate with early intervention.

Key Words: Dog, hemogram, parvoviral enteritis, sepsis.

Parvoviral Enteritise Bağlı Septik veya Septik Olmayan Köpeklerde Hematolojik Durum

Öz

1 yaşından küçük köpeklerde kanin parvovirus (CPV) önemli bir morbidite ve mortalite sebebidir. Kanin parvoviral enteritis (CPE), sepsis gelişimi için predispoze edici bir faktördür. Hastalığa verilen yangısal cevap, sepsis varlığında gözlenen değişimler için prediktif bir değere sahip olabilir. Bu sebeple, CPE'li septik bir köpeğe diagnostik yaklaşım klinik muayeneleri takiben hemogram gibi rutin laboravatur muayenelerini içermelidir. Bu çalışmada 4-6 aylık, sağlıklı 7 adet (Kontrol Grubu), anoreksi, kusma ve hemorajik enteritis gibi CPE'nin klinik bulgularına sahip 54 adet hasta (CPE Grubu), toplam 61 adet köpek kullanıldı. 2001 sistemik yangısal cevap sendromu (SIRS) kriterleri doğrultusunda CPE grubu köpekleri Septik CPE (n: 25) ve Non Septik CPE (n: 29) alt gruplarına ayrıldı. Tüm köpeklerin klinik muayeneleri ve venöz kan örneklerinden hemogram analizleri yapıldı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CPE grubu köpeklerinin solunum sayısı (RR), kalp ritmi (HR) ve vücut sıcaklığı değerleri daha yüksek ($p<0.000$), CRT değeri ise daha kısaydı ($p<0.014$). Septik CPE ve Non Septik CPE gruplarının karşılaştırılmasında ise RR değeri Septik CPE grubunda daha yüksekti ($p<0.001$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CPE grubunun lökosit (WBC), granülosit, ortalama hemoglobin miktarı (MCH), ortalama hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) ve hemoglobin (Hb) değerleri daha düşük ($p<0.031$), retikülosit dağılım genişliği (RDW) değeri ise daha yüksekti ($p<0.001$). Septik CPE ve Non Septik CPE gruplarının karşılaştırılmasında ise Septik CPE grubunun WBC, lenfosit, monosit, granülosit değerleri daha düşük ($p<0.006$), MCH değeri ise daha yüksekti ($p<0.004$). Sonuç olarak, alıcı işletim karakteristiği (ROC) temelli diagnostik performans analizi doğrultusunda RR, WBC, lenfosit, MCH, monosit ve granülosit değerlerinin ise septik ve non septik CPE'li köpeklerin ayırt edilmesinde faydalı diagnostik bilgi sağlayıp, triajda hastalık şiddetini daha erken tanımlayıp erken müdahale ile hayatta kalma oranını arttırabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Köpek, hemogram, parvoviral enteritis, sepsis.

INTRODUCTION

Canine parvoviral enteritis (CPE) is an acute, highly contagious and fatal viral disease. Although the disease affects

dogs younger than 6 months-old, adult dogs with immunosuppression are also at risk. The most common form of CPE is acute hemorrhagic enteritis, characterized by severe villous damage (1). CPE is a predisposing factor for sepsis, as it

promotes intestinal bacterial translocation and severe immunosuppression (2). In addition, there are many factors contributing to the development of sepsis in canine parvovirus (CPV) infection such as cellular destruction, intestinal hypomotility, dysbiosis and tissue necrosis, and bacteremia resulting from translocation (3,4). Although the clinical manifestations of dogs with CPE are non specific, they correlate with enteritis. While symptoms such as anorexia, lethargy, and pyrexia are dominant in the initial phase, gastroenteritis findings such as vomiting and diarrhea become more evident later on. Feces may vary from mucoid to hemorrhagic (4,5). Impaired immunity with mucosal barrier damage increases susceptibility to secondary infections and significant changes are observed in hemogram parameters. Significant leukopenia (usually due to neutropenia and lymphopenia) in dogs with CPE is frequently observed as the virus targets mitotically active leukocytes, bone marrow, and lymphoid tissue. Neutropenia and bacterial overload reduce and/or prevent the elimination of luminal bacteria from the bloodstream (3,6,7), and the release of inflammatory mediators together with the progression of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) contribute to bacterial translocation cycle and causes development of sepsis (4).

According to the most recent scientific consensus, the definition of sepsis is used to describe organ dysfunction triggered by the body's noxious inflammatory response to an infection (2,8). A conference was held in 1991 to establish a correlation between sepsis and SIRS (9). After the adaptation of the criteria determined as a result of this conference to animals, a series of modifications were proposed and it was observed that the cut-off values differed among researchers (10). Moreover, most clinicians report that the old consensus definition is not clear enough for sepsis definition and 71% of those surveyed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) did not cite a general sepsis definition despite the criteria which was set at the 1991 consensus conference (11). This gap in clinical practice and data from clinical studies had shown that SIRS and sepsis-related conditions require a revision. For this reason, the International Sepsis Definitions Conference was held in 2001 and in addition to 1991 SIRS criterias, it was emphasized that the evaluation of capillary refill time (CRT) or mucous membrane color changes can increase its specificity (2,11).

Since its transferral to veterinary practice, the definition of SIRS has been used frequently by clinicians and researchers for the diagnosis of sepsis (2). The definition of sepsis in veterinary practice is similar to the one used in human medicine and is characterized by SIRS. The clinical diagnosis of SIRS is made on the basis of abnormal findings in the heart and respiratory rate, body temperature and leukocyte counts (12). In cases of CPE, intestinal mucosal damage and villous atrophy may lead to malabsorption, diarrhea and vomiting which cause rapid shock and dehydration, and severe bacteremia may result in sepsis and death (2,13). Clinical findings vary not only depending on the damage to the originating organ, but also depending on the extent of damage to the secondary affected organs. For this reason, clinical examination and evaluation of hemogram findings are useful

both in the decision of further diagnostic tests and in the prediction of the course of the disease (2).

The diagnostic approach to a septic dog with CPE should include clinical examinations followed by routine laboratory examinations such as hemogram. Hemogram analysis can reveal abnormalities in different cellular lineages. Among the hemogram parameters, hematocrit can show anemia secondary to blood loss, hemolysis, oxidative stress and decreased erythrocyte production. Polycythemia may indicate hemoconcentration and splenic contraction in hypovolemic animals. Lymphopenia and leukopenia associated with immunosuppression and lymphocyte apoptosis may also persist. In addition, disseminated intravascular coagulopathy (DIC) due to platelet consumption has also been reported as a common finding associated with thrombocytopenia (5,10,14).

For this reason, the aim of this study is to evaluate the diagnostic effectiveness of clinical and hemogram parameters comparatively and to emphasize their importance in routine examinations in dogs with CPE which were classified as septic and non-septic according to 2001 SIRS criteria.

MATERIAL AND METHODS

This study was conducted with the approval of the Harran University Animal Experiments Local Ethics Committee dated 28/03/2022, number 2022/002.

The animal material of this study consisted of a total of 61 dogs, aged 4-6 months, non-neutered (31 male, 30 female), 7 healthy (Control Group) and 54 diseased dogs with clinical signs of CPE such as anorexia, lethargy, vomiting and hemorrhagic enteritis (CPE Group). All dogs included in the study were unvaccinated and mixed breed. Breeds known to be predisposed to CPE, such as German shepherds and Dobermans, were not included in the study. Body weights were determined as 8.6 (7.9-12.4) kg in the Control Group and 8.65 (5.7-13.1) kg in the CPE Group. In addition, anamnestic data revealed that all dogs in the study were fed on a commercial dry dog food, and no treatment was given for non-specific gastroenteritis symptoms such as vomiting and diarrhea.

Inclusion and Exclusion Criteria

Inclusion criterias were the presence of acute clinical manifestations of CPE (anorexia, vomiting, lethargy, and hemorrhagic enteritis) (1,2), not receiving any treatment and positive result of canine parvovirus (CPV) rapid test (CDV/CPV/CAV-2 Antibody (Ab), Biotech Laboratories, USA) which utilizes the principle of lateral flow immunochromatographic assay technique. Dogs that were determined to have gastroenteritis or comorbid diseases of different etiologies as a result of clinical, laboratory and rapid diagnostic test kit applications were not included in the study.

Clinical Examinations

Clinical examinations included respiratory rate (RR), heart rate (HR), capillary refill time (CRT), body temperature measurements, as well as evaluation of mucous membranes, lung and heart auscultation, and examination of palpable lymph nodes. In addition, fecal samples were taken from all dogs

and microscopic (Olympus CX43, light microscope, x40 magnification, Tokyo, Japan) examinations were performed in order to investigate the presence of parasites/parasite eggs.

Application of Rapid Diagnostic Test Kits

Canine distemper virus, canine parvovirus, canine adenovirus type-2 antibody (CDV, CPV, CAV-2, Ab) rapid diagnostic test kits were applied to all the dogs in accordance with the manufacturer's instructions (CDV/CPV/CAV-2 Ab, Biotech Laboratories, USA. Compared to PCR, for CDV, specificity: 98.3% sensitivity: 96.1%; for CPV, specificity: 98.8% sensitivity: 92%; for CAV-2, specificity: 97.8% sensitivity: 100%). In addition, the rapid diagnostic test for Giardia antigen (Giardia Ag, VETSCAN, Zoetis, USA. Compared to PCR, specificity: 99.3% sensitivity: 98.1%) from fecal samples was performed according to the manufacturer's instructions. As a result of rapid diagnostic test kit application, it was determined that CPV Ab results of all the dogs with gastroenteritis were positive, and CDV Ab, CAV-2 Ab, Giardia Ag rapid test kit results and microscopic fecal examination results were negative. The same examinations and test were also applied to the dogs in the Control Group and results were found to be negative.

Forming Subgroups

Dogs included in the CPE Group as a result of clinical and laboratory examinations and rapid diagnostic test kit application results were divided into two subgroups as Septic CPE and Non Septic CPE in accordance with 2001 SIRS criteria. Confirmation of the 2001 SIRS criteria was accepted as the presence of at least two of the following criterias; body temperature $<37.8^{\circ}\text{C}$ or $>39.4^{\circ}\text{C}$, heart rate >140 bpm, respiratory rate >30 breaths/minute, WBC <6000 or >16000 cells/ μL (11). Considering these criterias, 25 dogs with CPE were included in the Septic CPE Group and 29 dogs in the Non Septic CPE Group.

Blood Sampling and Laboratory Examinations

Venous blood samples from vena cephalica (2-4 mL) were obtained from all the dogs with minimal restraint and patient stress. The venous blood samples were transferred into tubes containing K_3EDTA and measured without waiting using a hematology autoanalyzer (Sysmex pochH-100i, SYSMEX Corp, Japan). Within the scope of hemogram analyses, white blood cell (WBC), lymphocyte, monocyte, granulocyte, red blood cell (RBC), mean corpuscular volume (MCV), hematocrit (Hct), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), reticulocyte distribution width (RDW) and hemoglobin (Hb) measurements were performed in the central laboratory of the animal hospital.

Statistical Analysis

Statistical analysis of all data was performed using SPSS 25.00 (IBM, USA) software. Kolmogorov-Smirnov test was used to determine whether the data were parametric or non-parametric, and Mann Whitney U test was used to determine the p values. Non-parametric data were presented

as median (min, max). ROC analyses were performed using the same statistical software to demonstrate the clinical significance of the parameters which were determined to have statistical significance as a result of the analysis. Within the scope of ROC analyses, area under curve (AUC, >0.600), p value (<0.05), sensitivity and specificity ($>70\%$) parameters were evaluated. Statistical significance was accepted as $p < 0.05$, CI = 95% for all the data.

RESULTS

Clinical Examination Results

As a result of clinical examinations, it was determined that character of diarrhea was hemorrhagic in all dogs in the CPE group. Vomiting was present in 50 of 54 diseased dogs. Skin turgor time was 5 (3-6) seconds in CPE group and 2 (2-4) seconds in Control group ($p < 0.000$). The mucous membranes were hyperemic in 44 of the CPE group dogs, while 10 dogs had pallor. Lymphadenopathy was detected in 26 of 54 diseased dogs.

Compared to the Control Group, it was determined that RR, HR and body temperature values of the CPE Group were higher ($p < 0.000$) and CRT value was shorter ($p < 0.014$). Comparison of clinical examination findings of Control with CPE groups is presented in Table 1. In the comparison of Septic CPE and Non Septic CPE groups, RR value was higher in the Septic CPE Group ($p < 0.001$). In the evaluation of the gingival mucous membrane, a marked hyperemic appearance was detected in dogs in the Septic CPE Group (23 out of 25 dogs). No statistical difference was observed in other clinical examination parameters ($p > 0.05$). Comparison of clinical examination findings of Septic with Non Septic CPE groups is presented in Table 2.

Table 1. Comparison of clinical examination findings of control with CPE groups

Parameters	Control Group (n:7) Median (min, max)	CPE Group (n:54) Median (min, max)	P value
RR (breaths/min)	35 (27, 46)	88 (68, 99)	0.000
HR (beats/min)	77 (65, 88)	102 (84, 164)	0.000
CRT (seconds)	3 (2, 3)	2 (1, 3)	0.014
Temp ($^{\circ}\text{C}$)	38.10 (37.70, 38.50)	39.25 (38.00, 40.50)	0.000

RR: Respiratory rate, HR: Heart rate, CRT: Capillary refill time, Temp: Body temperature.

Table 2. Comparison of clinical examination findings of septic with Non Septic CPE groups

Parameters	Septic CPE Group (n: 25) Median (min, max)	Non Septic CPE Group (n: 29) Median (min, max)	P value
RR (breaths/min)	92 (79, 99)	84 (68, 99)	0.001
HR (beats/min)	105 (90, 164)	101 (84, 164)	0.137
CRT (seconds)	2 (1, 3)	2 (1, 3)	0.518
Temp ($^{\circ}\text{C}$)	39.30 (38.80, 40.50)	39.2 (38, 40.50)	0.294

RR: Respiratory rate, HR: Heart rate, CRT: Capillary refill time, Temp: Body temperature.

Hemogram Findings

Compared to the Control Group, WBC, granulocyte, MCH, MCHC and Hb values were lower ($p < 0.031$) and the RDW value was higher ($p < 0.001$) in the CPE group. However, no difference was detected in terms of lymphocyte, monocytes, RBC, MCV and Hct values ($p > 0.05$). Comparison of hemogram results of Control with CPE groups is presented in Table

3. In the comparison of Septic CPE and Non Septic CPE groups, it was observed that WBC, lymphocyte, monocytes and granulocyte values of the Septic CPE Group were lower ($p < 0.006$) and MCH values were higher ($p < 0.004$). No difference was detected in terms of RBC, MCV, Hct, MCHC, RDW and Hb values ($p > 0.05$). Comparison of hemogram results of Septic with Non Septic CPE groups is presented in Table 4.

Table 3. Comparison of hemogram results of Control with CPE groups

Parameters	Control Group (n: 7) Median (min, max)	CPE Group (n: 54) Median (min, max)	P value
WBC (m/mm ³)	14.76 (8.80, 18.50)	9.90 (1.29, 22.47)	0.009
Lym (m/mm ³)	4.17 (2.10, 5.16)	3.70 (1.01, 12.32)	0.973
Mon (m/mm ³)	0.80 (0.10, 1.70)	0.54 (0.05, 5.90)	0.393
Gra (m/mm ³)	9.79 (5.45, 13.40)	4.41 (0.20, 14.39)	0.004
RBC (M/mm ³)	6.90 (5.79, 7.86)	7.09 (4.06, 10.57)	0.333
MCV (fl)	63.85 (56.00, 73.20)	69.20 (48.70, 91.30)	0.374
Hct (%)	44.78 (37.21, 51.56)	48.10 (26.50, 84.40)	0.122
MCH (pg)	23.80 (21.76, 25.11)	19.40 (13.00, 24.10)	0.000
MCHC (g/dl)	32.45 (28.44, 39.42)	29.30 (20.50, 35.80)	0.025
RDW (fl)	9.70 (8.26, 11.10)	10.85 (8.90, 18.00)	0.001
Hb (g/dl)	15.36 (14.47, 19.70)	14.20 (6.70, 21.40)	0.031

WBC: White blood cell, Lym: Lymphocyte, Mon: Monocyte, Gra: Granulocyte, RBC: Red blood cell, MCV: Mean corpuscular volume, Hct: Hematocrit, MCH: Mean corpuscular hemoglobin, MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration, RDW: Reticulocyte distribution width, Hb: Hemoglobin.

Table 4. Comparison of hemogram results of Septic with Non Septic CPE groups

Parameters	Septic CPE Group (n: 25) Median (min-max)	Non Septic CPE Group (n: 29) Median (min-max)	P value
WBC (m/mm ³)	6.64 (1.29, 16.90)	13.11 (4.59, 22.47)	0.000
Lym (m/mm ³)	2.77 (1.01, 6.56)	4.64 (1.24, 12.32)	0.006
Mon (m/mm ³)	0.35 (0.05, 2.50)	0.95 (0.14, 5.90)	0.001
Gra (m/mm ³)	1.87 (0.20, 9.33)	7.02 (1.02, 14.39)	0.000
RBC (M/mm ³)	7.36 (5.13, 10.54)	6.91 (4.06, 10.57)	0.557
MCV (fl)	70.10 (62.60, 78.80)	66.20 (48.70, 91.30)	0.078
Hct (%)	53.70 (26.90, 72.50)	45.50 (26.50, 84.40)	0.356
MCH (pg)	20.70 (16.80, 24.10)	18.20 (13.00, 23.00)	0.004
MCHC (g/dl)	29.80 (24.30, 35.80)	28.70 (20.50, 32.20)	0.168
RDW (fl)	11.20 (10.00, 13.70)	10.80 (8.90, 18.00)	0.520
Hb (g/dl)	15.30 (11.00, 21.10)	12.70 (6.70, 21.40)	0.060

WBC: White blood cell, Lym: Lymphocyte, Mon: Monocyte, Gra: Granulocyte, RBC: Red blood cell, MCV: Mean corpuscular volume, Hct: Hematocrit, MCH: Mean corpuscular hemoglobin, MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration, RDW: Reticulocyte distribution width, Hb: Hemoglobin.

ROC Analyses Findings

The diagnostic performances of the parameters such as respiratory rate, WBC, lymphocyte, monocyte, granulocyte and MCH values that were determined to be statistically different as a result of the comparison of the Septic CPE and Non Septic CPE groups were investigated by ROC analysis. In order to distinguish septic dogs from non-septic ones, it was determined that respiratory rate had good AUC (0.765), excellent sensitivity (100%) and low specificity (32%), WBC value had excellent AUC (0.924), sensitivity (93.1%) and

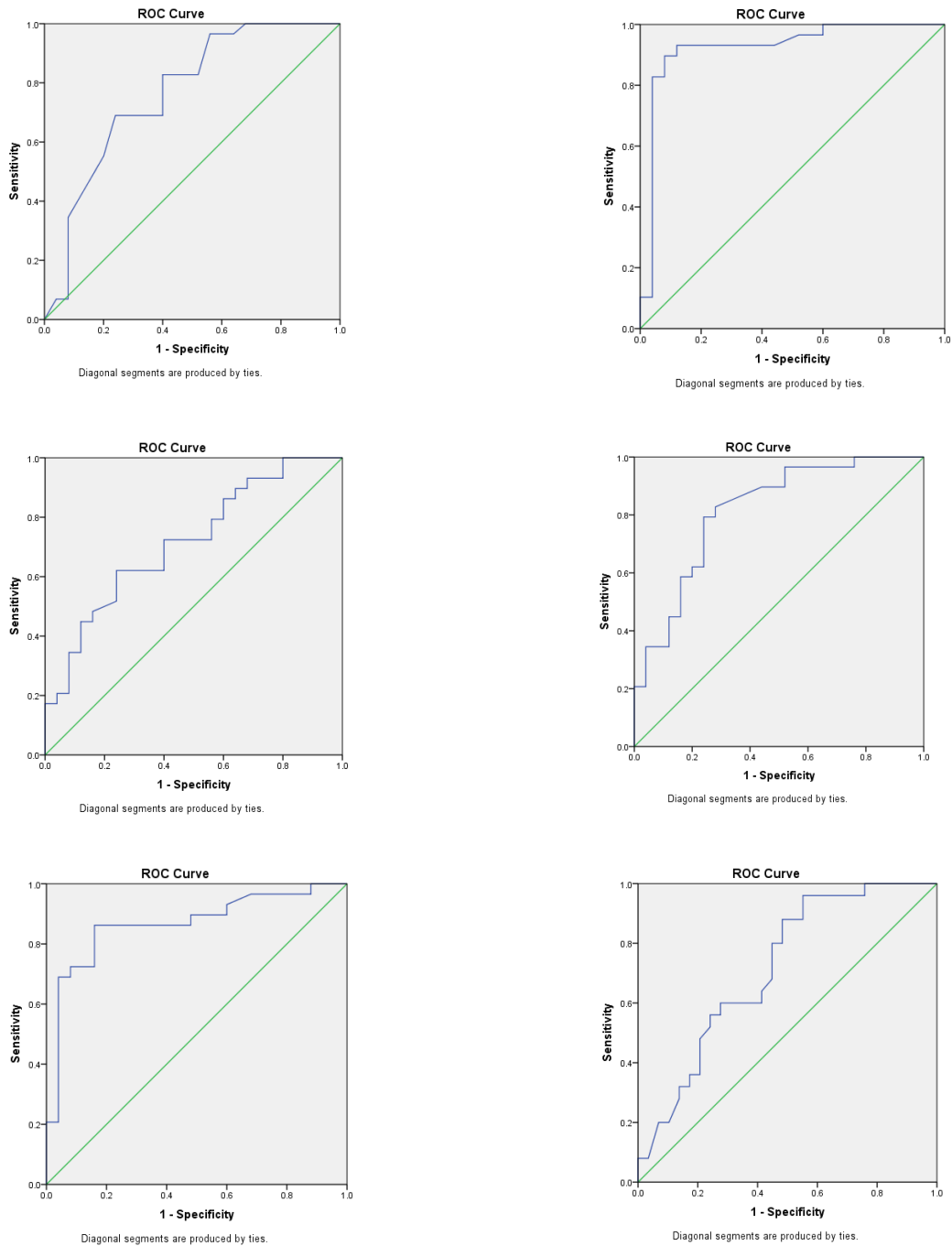
specificity (88%), lymphocyte and MCH values had good AUC (0.716 and 0.717, respectively), sensitivity (72.4% and 60%, respectively) and specificity (60% and 58.6%), and monocyte and granulocyte values had good AUC (0.815 and 0.866, respectively), sensitivity (82.8% and 86.2%, respectively) and specificity (72% and 84%, respectively). ROC analysis results of Septic with Non Septic CPE groups comparison are presented in Table 5 and ROC curves of diagnostic performance analyses are presented in Graph 1.

Table 5. ROC analysis results of Septic with Non Septic CPE groups comparison

Parameters	AUC	Std. Error	AsympSig	Asymptotic 95% Confidence Interval		Cut-off value	Sensitivity	Specificity
				Lower Bound	Upper Bound			
				RR (breaths/min)	0.765			
WBC (m/mm ³)	0.924	0.042	0.000	0.841	1.000	8.75	93.1%	88%
Lym (m/mm ³)	0.716	0.069	0.007	0.580	0.852	2.97	72.4%	60%
Mon (m/mm ³)	0.815	0.059	0.000	0.700	0.930	0.40	82.8%	72%
Gra (m/mm ³)	0.866	0.052	0.000	0.764	0.968	3.84	86.2%	84%
MCH (pg)	0.717	0.069	0.006	0.580	0.853	19.20	64%	58.6%

RR: Respiration rate, WBC: White blood cell, Lym: Lymphocyte, Mon: Monocyte, Gra: Granulocyte, MCH: Mean corpuscular hemoglobin, AUC: Area under curve, Std.Error: Standard error, Asymp sig: Asymptotic significance

Graph 1. ROC curves of diagnostic performance analyses



Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis of respiratory rate (A), WBC (B), lymphocyte (C), monocyte (D), granulocyte (E) and MCH (F) values. Diagonal segments are produced by ties.

DISCUSSION AND CONCLUSION

In the present study, the diagnostic performances of clinical and hemogram parameters of dogs with CPE, which were classified as septic and non septic according to 2001 SIRS criteria, were evaluated.

Dogs younger than 1 year-old are frequently diagnosed with gastrointestinal infections and among the viral agents, CPV is an important cause of morbidity and mortality (7). The virus spreads from animal to animal by the oronasal route and shows tropism to lymphoid tissue, bone marrow, and intestinal epithelium. In addition, in dogs younger than 3 week-old, the virus can also affect the myocardium (15). In addition, it has been reported that dogs less than 6 month-old, unvaccinated or given an inadequate/wrong vaccination program are susceptible to CPE (2,3,16). In the present study, the rate of sepsis development in dogs with CPE was determined as 46.29%. However it should be kept in mind that the population characteristics including an overrepresentation of animals within the susceptible age group and being unvaccinated may also have contributed for the discrepancy between the results obtained in this study and the ones previously cited.

The clinical signs of animals affected by sepsis reflect the systemic inflammatory status as well as changes in vitals such as body temperature, heart and respiratory rate. These parameters should be evaluated on admission to the hospital, and the diagnosis of sepsis should be made when the presence of infection with SIRS is detected. The inflammatory response to the disease may have predictive value for the changes observed in the presence of sepsis. It has been reported that heart and respiratory rate as well as leukocyte count considered as mortality-related parameters (2).

Non-specific findings such as pyrexia, lethargy, anorexia, increased respiratory rate are associated with viremia in 1-5 days after the onset of CPV infection. Dehydration and hypovolemia resulting from fluid loss due to vomiting and diarrhea impair tissue perfusion, and thus mucous membrane color changes, tachycardia, and prolonged CRT can be observed (7). Therefore, findings such as dryness of mucous membranes, prolonged CRT and loss of skin elasticity in CPV infections are associated with a large amount of fluid and protein loss from the gastrointestinal tract (16). In the present study, it was determined that the RR, HR and body temperature values of CPE Group were higher ($p<0.000$) and the CRT value was lower ($p<0.014$) when compared to the Control Group. These differences were thought to be related to the hemodynamic response to maintain tissue perfusion (2). In the comparison of Septic CPE and Non Septic CPE groups, only the RR value differed statistically and it was found to be higher in the Septic CPE group ($p<0.001$). RR is the sentinel and arguably most important vital sign because its normal values are breached before those of other vital signs in nearly all states of clinical decline. Changes in respiratory rate are often the earliest warning of SIRS, sepsis, respiratory insufficiency and shock among others. In these conditions, abnormalities in RR first herald the need for additional patient assessment and rapid intervention to prevent further decline. Tachypnea is often the first sign of SIRS, sepsis and

respiratory insufficiency (17). Therefore, although traditional resuscitation goals such as normalization of respiratory rate may be insufficient to detect tissue hypoxia, these parameters should not be ignored (15). Optimization and normalization of mucous membrane color along with vitals increases survival rate in dogs with CPE.

Evaluation of clinical parameters such as CRT, heart and respiratory rate and hydration status along with routine laboratory tests such as hemogram provide important clinical information for diagnosis, differential diagnosis and monitoring the complications secondary to viral infection (15, 16). Depending on the tropism of CPV, clinical and hemogram findings differ according to the affected cell type. Immunosuppression may occur due to the death of myeloproliferative cells and thymic lymphocytosis (2,16). Mild to severe leukopenia has been reported in dogs with CPE (7). This is associated with viral replication in bone marrow and lymphatic tissue that destroys active mitotic myeloid precursors and lymphoid cells. It was reported that leukopenia at admission and 24 and 48 hours after admission could be used to predict outcome and increases over time in total WBC and absolute differential leukocyte counts would be associated with better outcome (1,7,10). However, the occasionally observed leukocytosis in cases of CPE may be due to primary or secondary bacterial infection, acute intravascular hemolysis, secondary to increased cell production by the bone marrow causing a shift of cells from the marginal pool to the circulation, or damage to the liver and/or other organs. In addition, it has been reported that neutrophilia and lymphopenia may be associated with a severe inflammatory reaction induced by bacterial infections in cases of CPE (18). Moreover, common hematological abnormalities such as low levels of RBC, MCH, MCHC and Hb have been reported to be associated with regenerative anemia and/or iron deficiency anemia due to viral persistence in the bone marrow. However, significant dehydration due to fluid loss from the gastrointestinal tract may mask anemia and cause relative polycythemia (19). The decrease in Hb level may be due to blood loss with feces and/or vomiting in CPE cases. Furthermore, low Hb levels may result from reduced erythropoiesis due to direct damage by CPV to the bone marrow, and accumulation of toxic waste products during the viremia and febrile phase as well as the dog's previous poor health (18,20). Besides, the changes in these parameters may be associated with hypochromic anemia caused by proinflammatory cytokines and the disruption of the development of reticulocytes by converting iron into a less usable form (16). In the present study, the WBC, granulocyte, MCH, MCHC and Hb values of the CPE Group were lower ($p<0.031$) and the RDW value was higher ($p<0.001$) when compared to the Control Group. Considering the presence of sepsis, in the Septic CPE Group, the WBC, lymphocyte, monocytes and granulocyte values were found to be lower ($p<0.006$) and MCH value was found to be higher when compared with the Non Septic CPE Group ($p<0.004$). These differences were interpreted as a result of the destruction of hematopoietic lineage precursors, depletion of lymphoid organs and massive intestinal recruitment in the presence of sepsis (10). Low MCH, MCHC and Hb levels of

the CPE Group compared with the Control Group are associated with iron recovery and/or disruption of iron metabolism in erythroid precursor cells (2,16). The high MCH value observed in the Septic CPE Group was thought to be related with not having enough vitamin B12 or folic acid in the body as a result of malnutrition and/or malabsorption due to villous atrophy (10,16).

Monocytes have an essential role in CPE due to their functions such as removal of necrotic debris, viral inactivation, response to foreign bodies and phagocytosis of old or abnormal erythrocytes. In previous studies, it was reported that an increase in monocyte counts had prognostic value and were associated with higher survival rate (21,22). The low monocyte levels detected in the Septic CPE Group of the present study were consistent with previous studies, and it was thought that this finding might be related to immunosuppression due to lymphoid tissue damage (7). In addition, this finding can be explained by the fact that monocytes begin to migrate to the inflamed tissue when the inflammatory response begins as a result of infection (23).

The limitations of this study are the limited number of animals which may influence the results of the ROC-based diagnostic performance analysis results and the evaluation of hemogram analysis within the scope of routine laboratory examination.

Although interest in routine hematological parameters has increased recently (24), data on clinical and hematological parameters in dogs with parvoviral enteritis and sepsis are limited. With this study, based on the ROC-based diagnostic performance analysis, it was observed that RR, WBC, lymphocyte, monocytes, granulocyte and MCH parameters in the presence of sepsis have higher diagnostic performance and provide clinically important information in routine clinical and laboratory examinations. As a result, it was concluded that the evaluation of WBC, lymphocyte, monocytes, granulocyte and MCH values together with clinical examination findings in dogs with CPE who developed sepsis according to 2001 SIRS criteria, may improve early identification of severely ill patients at triage and allow more aggressive and timely interventions to improve the prognosis of these patients.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Gülersoy E, Ok M, Yıldız R, Koral E, İder M, Sevinç M, Zhunushova A. (2020). Assessment of Intestinal and Cardiac-related Biomarkers in Dogs with Parvoviral Enteritis. *Pol J Vet Sci.* 23(2): 211-219.
- Alves F, Prata S, Nunes T, Gomes J, Aguiar S, Aires da Silva F, Tavares L, Almeida V, Gil S. (2020). Canine Parvovirus: A Predicting Canine Model for Sepsis. *BMC Vet Res.* 16(1): 199.
- Mylonakis ME, Kalli I, Rallis TS. (2016). Canine Parvoviral Enteritis: An Update on the Clinical Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Vet Med (Auckl).* 7: 91-100.
- Krentz T, Allen S. (2017). Bacterial Translocation in Critical Illness. *J Small Anim Pract.* 58(4): 191-198.
- Drobatz KJ, Hopper K, Rozanski EA, Silverstein DC. (2019). Gastroenteritis. In: *Textbook of Small Animal Emergency Medicine.* Drobatz KJ, Hopper K, Rozanski EA, Silverstein DC (eds). 1st ed. pp. 485-486. Wiley-Blackwell, New Jersey, USA.
- Yılmaz Z, Senturk S. (2007). Characterisation of Lipid Profiles in Dogs with Parvoviral Enteritis. *J Small Anim Pract.* 48(11): 643-50.
- Goddard A, Leisewitz A. (2010). Canine Parvovirus. *Vet Clin NA Small Anim Pract.* 40(6):1041-1053.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (sepsis-3). *JAMA.* 315: 801-810.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA (1992). Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest.* 101(6): 1644-1655.
- Sykes JE. (2014). Canine Parvovirus Infections and Other Viral Enteritides. *Canine and Feline Infectious Diseases.* PMC7152455: 141-151.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D. (2003). 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 29(4): 530-538.
- Goddard A, Leisewitz AL, Christopher MM, Duncan NM, Becker PJ. (2008). Prognostic Usefulness of Blood Leukocyte Changes in Canine Parvoviral Enteritis. *J Vet Intern Med.* 22(2): 309-316.
- Sharp CL. (2018). Systemic Inflammatory Response Syndrome, Sepsis, and Multiple Organ Dysfunction Syndrome. In: *Textbook Of Small Animal Emergency Medicine.* Drobatz KJ, Hopper K, Rozanski E, Silverstein DC (eds). pp. 1030-1037. Wiley Blackwell, New Jersey, USA.
- Girardot T, Rimmelé T, Venet F, Monneret G. (2016). Apoptosis-induced Lymphopenia in Sepsis and Other Severe Injuries. *Apoptosis.* 22(2): 295-305.
- Prittie J. (2004). Canine Parvoviral Enteritis: A Review of Diagnosis, Management, and Prevention. *Vet Emerg Crit Care.* 14(3): 167-176.
- Gülersoy E, Balıkçı C, Günel İ, Şahan A. (2022). Evaluation of the Efficacy of Blood Gases and Hemogram Parameters in the Diagnosis of non Neurogenic Distemper and Parvoviral Enteritis in Dogs with Acute Gastroenteritis. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 32(rcfcv-e32091): 1-8.
- Loughlin PC, Sebat F, Kellett JG. (2018). Respiratory Rate: The Forgotten Vital Sign—Make It Count! *Jt Comm J Qual Patient Saf.* 44(8): 494-499.
- Sharma R, Kumar A, Goel P, Kumar R. (2008). Clinical Haematology in Canine Haemorrhagic Gastroenteritis. *Haryana Vet.* 47(8): 35-38.
- Wysoke JM, Van Heerden J. (1990). Polycythemia Vera in a Dog. *J S Afr Vet Assoc.* 61(4):182-183.
- Biswas S, Chakravorty D, Pradhan NR. (2005). Clinical and Haemato-biochemical Changes in Parvovirus Infection in Dogs. *Indian J Vet Med.* 25(1): 16-18.
- Alves FS, Barbosa BC, Coelho NGD, Pinto PCO, Campos MTG, Horta RS, Freitas PMC, Beier SL, Paes PRO. (2019). Clinical and Hematological Prognostic Factors in Dogs with Parvoviral Enteritis and Sepsis. *Braz J Dev.* 40(3): 1477-1488.
- Gülersoy E, Kapar MM, Durgut MK, Naseri A, Ok M. (2022). Evaluation of Clinical, Hematochemical and Cerebrospinal Fluid Analysis Findings in Dogs Naturally Affected by the Neurological Form of Canine Distemper. *Magy Allatorvosok Lapja.* 144(1): 13-29.

23. Pierini A, Gori E, Lippi I, Lubas G, Marchetti V. (2020). Are Leukocyte and Platelet Abnormalities and Complete Blood Count Ratios Potential Prognostic Markers in Canine Sepsis? Front Vet Sci. 7:578846.
24. Lee SH, Kim JW, Lee BC, Oh HJ. (2020). Age-specific Variations in Hematological and Biochemical Parameters in Middle- and Large-sized of Dogs. J Vet Sci. 21(1): e7.

✉ **Corresponding Author:**

Erdem GÜLERSOY

Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary
Medicine, Harran University, Şanlıurfa, TÜRKİYE.

E-mail: egulersoy@harran.edu.tr



Antimikrobiyel Direnç: Küresel Bir Sorun

Murat GÜLMEZ^{1,a,✉}

¹ Siirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Siirt, TÜRKİYE

^aORCID: 0000-0003-3888-6815

Geliş Tarihi/Received
18.01.2022

Kabul Tarihi/Accepted
16.05.2022

Yayın Tarihi/Published
30.06.2022

Öz

Dünya’da her yıl 700.000 kişinin kaybına neden olan antimikrobiyel direnç sorunu devam edecek olursa 2030 yıllarında küresel gelirlerin %2-3 oranında azalacağı ve 100-600 trilyon dolarlık bir küresel ekonomik kaybın olacağı, 2050’den itibaren ise her yıl 10 milyon kişinin hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir. Türkiye OECD ülkeleri arasında antibiyotik direncinin en fazla geliştiği ülkedir. Türkiye’de antibiyotiklerin %35’ine direnç geliştiği bildirilmiştir. Bu oran bazı Avrupa ülkelerinde %5’e kadar düşürülmüştür. G20 zirvelerini ve Dünya Sağlık Örgütünü sürekli meşgul eden bu konu hakkında farkındalığı artırmak, kullanımı sınırlamak ve yeni tedavi ve koruma şekilleri bulmak şeklinde küresel politikalar geliştirilmektedir. Hem tıp ve hem de Veteriner Hekimliği alanında uygulanan Reçete Bilgi Sistemi (RBS) etkili bir uygulamadır. Dünya Antibiyotik Farkındalık Haftası (13-19 Kasım)’nda tüm dünyada konuya dikkat çekilmektedir. Kişi başı en fazla antibiyotik tüketen ülke Türkiye’dir. Direnç sorununun kaynağında bitki ve hayvan sağlığını koruyucu ve/veya verim artırıcı olarak kullanılan antimikrobiyel maddeler yer almaktadır. Tarım ve hayvancılıkta antimikrobiyel kullanımı mutlaka denetim altına alınması gerekir. Antibiyotikler tarımda ve hayvancılıkta hastalık koruma amacıyla kullanılmamalıdır. İlaçlı yem ticareti yasaklanmalıdır. Reçetesiz tarım ve veteriner ilacı kullanımı engellenmelidir. Gıdalar dahi ilaç kalıntısı ve direnç genleri bakımından denetlenmelidir. Tedavi amaçlı antibiyotik kullanımında doz ve kullanım süresi takibi yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyel, bitki, çevre, direnç, gıda, sağlık.

Antimicrobial Resistance: A Global Problem

Abstract

If this problem, which causes the loss of 700,000 people every year in the world, continues, it is estimated that it will decrease by 2-3% in global incomes in 2030, and it will cause a global economic loss of 100-600 trillion dollars. Also it is estimated that 10 million people will die every year in 2050. It has been reported that antibiotic resistance develops the most in Turkey among OECD countries and resistance develops to 35% of antibiotics. However, this rate has been reduced to 5% in some European countries. Global policies are being developed in the form of raising awareness, limiting use and finding new forms of treatment and protection on this issue, which constantly occupies the G20 summits and the World Health Organization. The Prescription Information System, which is applied in both medicine and veterinary medicine, is an effective application. World Antibiotic Awareness Week (13-19 November) draws attention to the issue all over the world. Turkey is the country that consumes the most antibiotics per capita. The source of the resistance problem is antimicrobial substances that are used to protect plant and animal health and/or increase productivity. The use of antimicrobials in agriculture and animal husbandry must be strictly controlled. Antibiotics should not be used for disease prevention in agriculture and animal husbandry. The medicated feed trade should be banned. The use of non-prescription agricultural and veterinary drugs should be prevented. Even foods should be inspected for drug residue and resistance genes. In the use of antibiotics for therapeutic purposes, dose and duration of use should be followed.

Key Words: Antimicrobial, environment, food, health, plant, resistance

GİRİŞ

Antimikrobiyeller bakteri, virüs, küf ve protozoa grubundaki zararlı mikroorganizmaların yok edilmesi veya kontrol altına alınması amacı ile kullanılan kimyasal maddelerdir. Bunlar antibiyotik, antiseptik, dezenfektan, deterjan, kozmetik, gıda koruyucu (benzoat, fosfat, nitrat, nitri tuzları), çinko ve bakır gibi metal iyonlarıdır (1). İlk başta antibiyotik bulundu ve insan sağlığında kullanılmaya başlandı. Sonra diğer antimikrobiyel maddeler bulunarak insan ve hayvan tedavilerinde kul-

lanıldı. Ancak bunlara karşı mikrobiyel direnç gelişimi de gecikmedi. Örneğin β -lactam grubu antibiyotikler (Cephalosporin, Penicillin, Cefotaxime, Monobactam ve Carbapenem) 1928’de bulundu, 1938’de kullanılmaya başlandı, 1945’te direnç geliştiği tespit edildi. Antimikrobiyel kullanımı sürekli arttı (2). Bitki ve hayvan sağlığını korumak amacıyla giderek daha yaygın ve hatta rutin olarak kullanılmaya başlandı. Küresel ısınma, nüfus artışı, kuraklık gibi nedenlerle giderek daha fazla üretilerek ve birim alandan daha fazla verim ala-

rak gıda talebi karşılanmaya çalışılmaktadır. Bitkisel üretimde verim artırmak için kuraklığa ve hastalıklara dayanıklı hibrit tohumlarla üretim yapılmaya çalışılmaktadır. Artan gıda talebi tarımda ve hayvancılıkta verim artırıcı ve hastalıklardan koruyucu antimikrobiyel madde kullanımını da artırmıştır. Bu noktadan sonra ise antimikrobiyel direnç (AMD) sorunu patlak verdi. Streptomisin, tetrasiklin ve tiyazol gibi bazı ilaçlar hem bitkilerde hem de hayvanlarda kullanıldı. İnsan eliyle geliştirilen dirençli genler toprak, su, bitki ve hayvan mikroflora üyeleri arasında taşınmaktadır (3). Günümüzde bu sorun küresel bir sorun olarak tüm yaşam formlarını tehdit etmektedir (4).

Alexander Fleming ilk antibiyotik olan penisilini Eylül 1927'de keşfetti. Bu buluş sayesinde hastalıklar tedavi edilip ortalama ömür uzadı. Ancak günümüzde antibiyotiklerin tedavi edici yetenekleri azaldı, bakteriler antibiyotiklere direnç kazandı. Bunun başlıca nedeni aşırı ve kontrolsüz antibiyotik kullanımınıdır. Sadece insan değil hayvanlarda da aynı antibiyotiklerin kullanılması süreci hızlandırdı. Antibiyotiklerin yeme katılarak hayvanlarda verim artırmak amacıyla kullanılması, konuyu bugünün en büyük sağlık sorunu haline getirdi (5). Pnömoni, tüberküloz, belsoğukluğu ve salmonelloz gibi tedavisi basit hastalıklar tedavi edilemez hale geldi. Her yıl tüberküloz yakalananların sayısı 10 milyonu, bu hastalıktan ölenlerin sayısı ise 1,6 milyonu bulmuştur. Bunlardan 600.000 kişide çoklu antibiyotik direnci geliştiği görülmüştür. Dünya Sağlık Örgütü 2019 Deklarasyonu'nda AMD sorununu başlıca 10 küresel sorun arasında saymıştır (6). Alarm veren bu konu üzerinde bilim insanları gece gündüz çalışmakta, devletler büyük bütçelerle Ar-Ge çalışmalarını desteklemektedir. Türkiye, 32 Avrupa ülkesi arasında en çok antibiyotik kullanan ülke olup, bu direnç sorunundan en çok mağdur olan ülkelere birisidir (7).

Tiseo ve ark (8) derledikleri bilgilere göre 41 ülkede tavuk, sığır ve domuz için 2017 yılında 93.000 Ton antibiyotik satılmıştır. Araştırmacılar bu oranın güncel trendin altında artış göstermesi durumunda dahi en iyi tahminle 2030 yılında 104.000 Ton; en çok antibiyotik kullanan ülkelerin yine Çin, Brezilya, Amerika, Tayland ve Hindistan olacağını bildirmişlerdir. Tedavi amacıyla kullanılan antibiyotiklerin %70'i hayvancılıkta ve %30'u insan sağlığında kullanılmaktadır. Bu antibiyotiklerin %70'i idrara ve dışkı ile çevresel döngüye bırakılmaktadır. İnsan ve hayvandan atığa, atıktan toprağa, topraktan bitkiye, bitkiden insan ve hayvana olmak üzere döngü devam ettikçe direnç sorunu da katlanarak büyümektedir. Balıkçılıkta kullanılan antibiyotiklerin %70'i serbest çevresel dolaşıma girmektedir (1). Çevre-bitki-hayvan-insan ekosistemleri arasında mikroflora değişimi ve dolayısı ile AMD genlerinin aktarımları da süregelmektedir (9). Bu nedenle AMD sorunu tek sağlık kapsamında ele alınmakta ve bahse konu edilen bütün ekosistemler içerisinde kontrol altına alınması gerekmektedir (10, 11). Bu nedenden dolayı konu hakkında kapsamlı araştırmalar ve koruma – kontrol programları uygulanmaktadır. Konu, ülkeler ve AB gibi ülke toplulukları düzeyinde ele alınmakla birlikte tüm dünyayı içerisine alan programlar da yürütülmektedir. Bunlardan başlıca olanı "The Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS)"tır (12). AB hastalık Kontrol Merkezi tarafından European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

(EARS-Net) sitesi de bu konuda görev yapmaktadır (13). Dünya Sağlık Örgütü Antimikrobiyel Direnç Dökümantasyon Merkezi belge ve bilgi üreten bir merkezdir (14). AMD sorununu azaltma konusunda başarı sıralamasında bazı İskandinav ülkeleri öne çıkarken bazı ülkelerde yeterli iyileşme görülmüş değildir. Türkiye de sorununu öncelikler arasında görmüş ve küresel programlara katılmıştır. Mevcut durumda etkili takip (Reçete Bilgi Sistemi) ve AMD sorunu ile mücadelede stratejik eylem planlarının uygulamada başarılı olunmaya çalışılmaktadır. Avrupa Birliği ülkelerinin günlük ve bir tedavi periyodunda kullanmalarına izin verilen antibiyotiklere ait maksimum dozlar bildirilmiştir (17).

Bakteriler genel olarak enzimlerini kullanarak ilaçlara direnç gösterirler. Bazen de bir metabolik yolu değiştirirler. Direnç gelişimi genel olarak bakterilerin genetik kodlarına işlenir. Bu kodlar diğer bakterilere de horizontal gen transferi ile geçebilir. Bakteriler arasında AMD genleri toprak, su, bağırsak ve gıda gibi bakterilerin üreme ortamlarında integronlar ve transpozonlar gibi mobil DNA havuzunu oluşturan moleküller üzerinden konjugasyon, transdüksiyon ve transformasyon yoluyla, plazmidlerde ise konjugasyon yoluyla aktarılmaktadır (18). Bakteriler arasında AMD genlerinin aktarımı insan, çevre ve hayvan ekosistemi içerisinde direnç sorununun hızla artmasına neden olmakta ve bu durum insan sağlığını tehdit etmektedir (19). İnsanların solunum, sindirim, ürogenital, kan ve lenf sisteminde latent olarak bulunan ve ömür boyu sağlık riskine neden olmayan bakterilere de bu direnç genleri aktarılmaktadır. Bu bakterilerin veya vücuda giren zararlı (patojen) bakterilerin de bu genlerle dirençli hale gelmesi ile asıl ölümcül sağlık riskleri ortaya çıkmaktadır (10). Bu genlerin aktarımını sağlayabilecek kaynaklardan biri de gıdalardır. Steril gıda üretimi yok denecek kadar azdır ve fermente gıdalar gibi bakteri yükü fazla olan gıdalar da bu kapsamda değerlendirilmektedir.

1. Antimikrobiyel Direnç Açısından Gıda ile İlgili Sorunlar

Tarım ürünlerinin ve hayvanların sağlığını artırarak verim artışı sağlamak amacı ile yasak olsa da antibiyotik ve benzeri maddelerin kullanımı henüz tam olarak engellenmiş değildir. Dolayısı ile bitkisel ve hayvansal gıdalara hali hazırda AMD gen taşıyıcı vasatlar olarak bakılmaktadır. Bakteriler arasında gen aktarımı riski ile çevre, bitki, hayvan ve insan sağlığı risk altına girmektedir. Gıdaların bir kısmı tarladan hasat edildiği haliyle işlem görmeden tüketilmektedir ve bunların mikroflorası insan ve hayvan sindirim sistemine doğrudan dahil olmaktadır. Diğer gıdalar ise ısı uygulama, fermente etme ve kurutma gibi işlemlerden geçirildiğinde flora profilleri değişmekle birlikte bunlar içerisinde de AMD genleri taşınabilir. Gıdada bulunan antimikrobiyel madde ve/veya AMD genleri taşıyan bakteriler gibi birçok etmen gıdanın AMD risk düzeyini belirlemektedir.

Hayvansal gıdalar

Satışa sunulan gıdalar antibiyotik kalıntısı bakımından da yasal limitlere uymak zorundadır. Özellikle Kuzey Avrupa ülkeleri ve diğer Avrupa ülkelerinde AMD takip sistemleri daha sıkı uygulanmakta ve bu nedenle Avrupa'da daha az AMD ve kalıntı riski bulunduğu bildirilmektedir. Yapılan bir çalışmada

hayvansal gıdaların antibiyotik kalıntı riski yüksek olan ülkeler Nijerya, Brezilya, Tanzanya, Vietnam, İran, Çin, Suudi Arabistan, Bangladeş, Kenya, Uganda, Slovenya, Türkiye gibi sıralama verilmiştir (20). Ancak bu araştırma sonuçları ülkeler hakkında gerçek durumun daha da vahim olabileceği fikrini doğurmaktadır. Bazı ülkelerde konu hakkında yayın yapmak bazı nedenlerden dolayı zor olabilir. Bu çalışmada dikkat çeken bir diğer konu da en fazla antibiyotik içeren hayvansal gıdaların sırasıyla süt, deniz ürünleri, kanatlı eti, sığır eti, yumurta, domuz eti ve koyun eti olmasıdır. Türkiye’de gıdalardaki antibiyotik kalıntılarını tespit etmek üzerine yapılan araştırma sonuçları yayınlanan bir derlemede verilmiştir (21).

Hayvanlara tedavi koruma ve daha fazla verim elde etme gibi farklı amaçlarla kullanılan antimikrobiyeller veya bunların yan ürünleri vücutta kansere kadar varan hasarlara neden olabilmektedirler. Örneğin kloramfenikol kemik iliği hasarı yaparken sülfametazin, oksitetrasiklin, furazolidon ve nitrofurazon karsinogenik etki göstermektedir (20). Tarım ve hayvancılıkta kullanılan antibiyotiklerin neredeyse tamamı hayvansal gıdalarla insan bağırsağına ulaşan antibiyotiklerden ve/veya antibiyotik dirençli aktif genlerden insan sağlığı zarar görmektedir (22, 23).

AB ülkelerinde ve Türkiye’de 2006 yılında ABD’de ise 2017 yılında verim artırıcı amaçla antibiyotik kullanımına son verildi. Ancak Avrupa da henüz sağlıklı hayvanların mikrop-ları arasında AMD genlerinin eradikasyonu ile uğraşmakta ve hayvancılıkta antibiyotik kullanımını azaltmaya çalışmaktadır. Kasaplık hayvanlar, özellikle domuz ve kanatlı hayvanlar entansif yetiştiricilik koşullarında bağırsak sağlığını koruyamadıkları için sık sık antibiyotiğe ihtiyaç duymaktadırlar. Özellikle kanatlı hayvanların kesimleri kitlesel olduğu için etlerde ve dolayısı ile mutfaklarda çapraz kontaminasyon riski artmaktadır. Avrupa başlıca sağlık sorununa neden olan salmonella gıda zehirlenmeleri ile çoklu ilaç direnci sorunu nedeni ile henüz başa çıkamamıştır (24). Amerika’da da durum aynıdır (25). Özellikle hayvansal gıdalarla ve özellikle etlerle insanlara geçen zoonoz bakteriyel etkenlerden *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus spp.* ve *Escherichia coli* insan sağlığını daha fazla tehdit eder hale gelmiştir (26).

Hayvansal gıdalar içerisinde bulunan antibiyotikler ürün teknolojilerinde starter kültür gelişimine engel olmak suretiyle üretim parametrelerini bozmaktadır. Ayrıca ortamda bulunması muhtemel zararlı bakterilerin bu antibiyotiklere direnç kazanmaları durumunda insan enfeksiyonlarına neden olmaları halinde tedavi zorlaşmaktadır. Ayrıca kültür mikroorganizmalarının üreyerek patojen bakterileri gıda içerisinde baskılaması durumu da sektöre uğrayabilir ve bu gibi ürünleri gıda zehirlenmelerine neden olabilir (27). Avrupa Tıp Teşkilatı (The European Medicines Agency, EMA), Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority, EFSA) ve Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) antimikrobiyel madde kullanımı ile direnç gelişimi arasındaki ilişki (Joint Inter-agency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis, JIACRA)’ye ait verileri ortaklaşa rapor etmektedir. Bu rapora göre hayvanlarda kullanılan antibiyotikler hem hayvanda ve hem de insanda ortak bakterilerde

(*Campylobacter jejuni* gibi) direnç sorununa neden olmaktadır. Bunun önüne geçebilmek için “Tek Sağlık Konsepti” içerisinde önlemler alınması gerektiği, bu kapsamda yapılan çalışmalardan da iyi sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Bu rapora göre hayvancılıkta özellikle kolistin ve oksitetrasiklin kullanımının yüksek olduğu ve bunun azaltılması gerektiği bildirilmiştir (28).

Entansif tavukçulukta kullanılan antikoksidiyallerin bir kısmı AMD sorunu nedeni ile yasaklanmıştır. Bağırsak sağlığını ve dolayısı ile verimi de teşvik eden bu ürünlerin alternatifi olabilecek ürünlerin geliştirilmesine gayret edilmektedir. Zira son yıllarda özellikle iyonofor grubu antikoksidiyallerin sadece Eimeria değil Gram pozitif bakteri duvarında da iyon taşıma mekanizmasını bozarak gösterdiği etkiye karşı bakterinin direnç geliştirdiği ortaya konmuştur. Antikoksidiyallerin diğer canlı sistemleri üzerindeki etkinin antibiyotiklerle benzer olduğu bildirilmiştir (2). Tavuk eti üretim başta olmak üzere yoğun entansif üretimlerin gelecekte Asya-Pasifik ve Güney Amerika ülkelerinde artacağı, dolayısı ile AMD riskinin de en fazla bu bölgelerde kaynak alacağı bildirilmektedir (ek7).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde de antibiyotik kullanımı yaygındır. Şili somon üretiminde Norveç’ten sonra ikinci sırada yer almaktadır. Zhao ve ark. (29) yayınladıkları derleme makalelerinde su ürünleri yetiştiriciliğinde yemlerle birlikte antibiyotik kullanımının diğer kullanım şekillerine göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, balıklarda antibiyotik kalıntısının, antibiyotik kalıntı geni taşıyan balık bakterilerinin (özellikle insan sağlığı için de önemli olan *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas*, *Clostridium* gibi bakteriler), suda dirençli gen ve antibiyotik kalıntısı veya dirençli gen taşıyan bakterilerin bulunmasının diğer biyolojik sistemlere de sirayet edebileceğini bildirmişlerdir (29). Şili’de 2016 yılında ton başına 0,53 kg antibiyotik kullanılırken Norveç’te sadece 0.0008 kg kullanılmıştır (30) AB ülkeleri 2006 yılında, ABD ise 2018 yılında verim artırıcı antibiyotik kullanımını yasaklama kararı almıştır. Hali hazırda diğer birçok ülkede yasal düzenlemeler henüz yoktur (29).

Bitkisel gıdalar

Bitkisel üretimde başta bakteri ve mantar hastalıklarının önlenmesinde antimikrobiyel maddeler kullanılmaktadır. Kullanılan miktar hayvancılıkta kullanılanlardan daha az olarak bildirilmiş olsa da yasal sınırlamalar ve düzenlemelerin eksikliği nedeniyle bildirilen miktardan daha fazla kullanım olabilir. Sadece birkaç ülke birkaç antibiyotik (streptomisin, oksitetrasiklin ve kasugamisin gibi) ve birkaç bitkide (yumuşak çekirdekli meyveler ve narenciye) kullanım hakkında sınırlama getirilmiştir (31-34). Avrupa ülkelerinde kullanımları yasak olsa da az gelişmiş ülkelerde kullanımı serbest olan bu gibi antimikrobiyel maddeler pirinç, sebzeler, hatta çığ olarak tüketilen brokoli ve karnabahar gibi sebzelerin üretiminde dahi kullanılmaktadır. Yeşil yapraklı sebzeler ve brokoli gibi değerli sebzelerde ot ve böcek öldürücü ilaçların da kullanıldığı bilinmektedir. Bazı gelişmiş ülkeler bazı antimikrobiyel maddelerin kullanımına tam yasak getirirken bazılarının bazı gıdalarda kullanımına izin vermektedir. Örneğin Japonya’da pirinçte *Burkholderia glumae* etkenine karşı, İsrail’de armutta *Erwinia amylovora* etkenine karşı oksolinik asit kullanımına

izin verilmektedir. Hindistan'da ise meyve, sebze, patates, pirinç gibi birçok gıdanın üretiminde hastalık etkenlerine karşı streptomisin (streptomisin ve tetrasiklin kombinasyonu) kullanımına izin verilmiştir (34).

Bitki sağlığını korumak amacı ile bitkilerin üzerin su içerisinde doğrudan uygulanan antimikrobiyel maddelerin yanı sıra insan ve hayvanlarda kullanılan antibiyotiklerin özellikle idrar ve dışkı kaynaklarından atık sulara, toprağa, oradan toprak bakterilerine ve bitkiye ulaşması riski vardır. Balıkçılıkta kullanılan antimikrobiyel maddeler de aynı döngü ile bitkilere ulaşabilmektedir. Neticede bu antimikrobiyel kalıntıların insana veya hayvana geri dönmesi, bu kalıntıların toprak bakterilerinde veya bitki yüzeyi bakterilerinde direnç sorununa neden olarak bu bakterilerle direnç genlerinin insan ve hayvana geri dönmesi gibi sorunlar ortaya çıkmaktadır. Toprak bakterileri ve gıda işlemede kullanılan endüstriyel bakterilerin yanı sıra saprofit ve kommensal yaşam gibi yaşam formlarını da etkileyen bu durum karşısında önlemler alınmadığı takdirde çevre, insan ve hayvan üzerinde yaşayan tüm bakteriler ve diğer yaşam formları bu durumdan etkilenmektedir (19, 35, 36).

Hayvan, bitki ve çevre sağlığını toprak mikrobiyomunun sağlığı etkilemektedir. Toprak içerisinde bolca yer alan ve insan patojenlerini de içerdiği bilinen bakterilerin (*Devosia*, *Shinella*, *Stenotrophomonas*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Leifsonia*, *Gemmatimonas*) hayvan gübresi içerisinde bulunan sülfadyazin ile üreme kinetiğinin arttığı, buna mukabil *Pseudomonas*, *Lysobacter*, *Hydrogenophaga* ve *Adhaeribacter* gibi toprak kalitesini artıran cinslerin de azaldığı bildirilmiştir (37). Forsberg ve ark. (38) β -lactam, aminoglikozid, amfenikol, sulfonamid ve tetrasiklin gibi antibiyotik gruplarına dirençli gen paketlerini hem toprak bakterilerinden hem de insan patojenik bakterilerinden tanımlamışlardır (39).

Fermente gıdalar

Beslenmede fermente süt ürünlerinin yeri büyüktür (40, 41). Üretimde pastörize süt kullanıldığı zaman çiğ süt florasının %99,9'u yıkılanır. Ancak canlı kalan %0,1'lik kısım içerisinde yer alan pastörizasyona dirençli bakteriler üretim esnasında üreyip gıdada asitlik oluşumu henüz yeterli değil iken çoğalabilir (42, 43). Fermantasyonda çiğ veya pastörize ham maddeler kullanılabilir. Fermantasyon kültürü olarak doğal floradan yararlanılabileceği gibi, üretici eliyle eklenen mikroflora (maya, starter kültür, olgunlaştırma kültürü) da kullanılabilir. Yoğurt, kefir, kıymız, peynir, tereyağı, ayran, boza, ekmekek mayası ve diğer fermente gıdaların üretiminde kültür mikroorganizmaları kullanılır. Fermente ürünler içerdikleri mikroflora ile birlikte ve çoğunlukla doğrudan tüketildikleri için bu mikrofloranın bir kısmı bağırsağa kadar ulaşmaktadır (38).

Fermente gıdaların içerdiği bakteriler AMD sorununun bir parçası olarak görülmektedir. Mayalanma esnasında meydana gelen bakteri üremeleri yoğun olduğu için bu aşamada dikey gen transferleri meydana gelmektedir. Bu genler fermente gıda tüketen bireyler tarafından yoğun olarak alınmaktadır. Bu nedenle gıda ve gıda desteklerinin içerdiği mikrobiyel kültürlerin AMD genlerini taşımamaları gerekir (4, 44). Laktik asit bakterilerinde antimikrobiyel direncin diğer bağırsak florası üyelerinden daha fazla olduğu bilinmektedir. Bu bakterilerde AMD olması doğaldır ve gereklidir. Şayet bu

olmasa idi bağırsak yararlı mikroflorası antibiyotik kullanımından sonra daha fazla yok olacak ve önce ishal ve daha sonra da genel sağlık riskleri ortaya çıkacaktı. Bununla birlikte bu genlerin örneğin salmonella gibi önemli gıda patojenlerine aktarılması durumunda oluşacak sağlık riskleri üzerinde de durulmaya başlanmıştır (18). Her oral antibiyotik kullanımında bir miktar faydalı bağırsak bakterisi ölürken bazıları da direnç kazanabilir. Bu durumda ortaya çıkabilecek sağlık risklerinin önlenmesi amacıyla hekimler antibiyotik tedavilerinde hastalara fermente gıdalar, probiyotik gıdalar veya probiyotik gıda takviyeleri önermektedirler. Bu konuda gelecekte yapılacak araştırmalarla daha aydınlatıcı bilgiler ortaya konarak faydalı bakteriler ve zararlı bakteriler arasında direnç genlerinin transferi konusu halk sağlığı açısından daha detaylı izahlara ulaşacağını tahmin etmekteyiz.

Süt içerisinde bakteriler arasında gen aktarımının sıvı besi yeri ile kıyaslandığında 10 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (45). Laktik asit bakterilerinden patojen bakterilere sütün mayalanması esnasında gen aktarımı olduğu da bildirilmiştir (46). Bu durumun pastörize edilerek fermente edilen gıdalarda hatalı pastörizasyon ve sekonder kontaminasyon durumunda önemi ortaya çıkmaktadır. Örneğin yoğurt yapılacak süt pastörize edildikten sonra zararlı bakteriler tarafından kontamine olursa ve kullanılan starter kültür bakterilerinin taşıdığı dirençlilik genleri (ki bu kültürlerin antibiyotik direncine sahip olmaları istenir) patojen bakterilere aktarılacaktır. Öte yandan fermente gıda tüketimi ile bağırsağa ulaşan starter kültür veya probiyotik bakterilerinin dirençlilik genleri bağırsağın latent halde bulundurduğu fırsatçı patojen bakterilere geçerek riskli durumlar oluşturabilir. Gıda starter kültürleri (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus*), fermente gıdalarda kullanılan biyoprezervatif özellikli bakteriler, destek kültürleri (starter geliştiriciler, lezzet ve aroma oluşturuçular, asit veya bakteriyozin oluşturuçular gibi) probiyotikler veya bakteriyofajlar bu bakımdan değerlendirilmektedirler. AB ülkeleri faj kullanımına izin vermemekle birlikte, ABD peynir muhafazasında *Listeria monocytogenes* riskine karşı kullanılmasına izin vermiştir. ABD'de Generally Recognized As Safe (GRAS) ve AB'de Qualified Presumption of Safety (QPS) konsepti içerisinde kullanımına izin verilen mikroorganizmaların listesi yer almaktadır (18, 47). Bu nedenle ideal gıda tanımı içerisinde gelecekte "AMD dirençli genetik materyal içermez" ifadesi yer alabilir. Bu perspektiften bakılınca çiğ süt kullanılarak üretilen fermente süt ürünleri, salamuralar, turşular ve boza hakkında yeni araştırmaların yapılması yararlı olacaktır.

2. Antimikrobiyel Direnç Sorunu ile Mücadelede Çözüm Önerileri

Bitki, çiftlik hayvanları ve çiftlik balığı yetiştiriciliğinde koruyucu ve verim artırıcı amaçla kullanımı yasaklandığında ortaya büyük verim kayıpları çıktı. Bunu engellemek ve alternatiflerini ortaya koymak için probiyotikler, prebiyotikler, bitkisel öz maddeler, aşı ve diğer immun sistem modülatörleri, faj, biyopeptitler, organik asitler gibi birçok madde kullanılmaya başlanmıştır (48,49). Gıda üretim esnasında da gıda muhafazası ve raf ömrünün doğal antibiyotik özellikli bitkisel ekstraktlar kullanılarak azaltılmaya çalışılmaktadır (50, 51).

SONUÇ

Yasal engellerin az olmasından ötürü Çin ve Hindistan günümüzde antimikrobiyel madde üretiminde ve tüketiminde ilk sırada yer almaktadır. Ancak AMD sorunu sınır tanımaz. Bu genler gıda, bitki ve hayvan üzerinden tüm dünyaya yayılma riski taşımaktadır. Tedavide kullanılan antimikrobiyel ilaçların insan, bitki ve hayvanlarda sadece izin verilenler ile izin verilen şekilde tedavide kullanılmaları yasalarla denetlenmelidir. Veteriner hekimliği sahasında yoğun antibiyotik kullanımının azaltılmasının insan sağlığı üzerinde olumlu etkisi olacaktır. Gübre, atık su, sulak alanlar, balık ve diğer hayvan çiftlikleri, kesimhane çalışanları, hayvan gübresi kullanılan topraklar AMD riski bakımından denetlenmelidir. Global çapta uygulanan bir "Antibiyotik Direnci Risk Giderme Programı" bütün ülkeler tarafından benimsenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Essack SY. (2021). Antimicrobial Resistance and the Environment: Implications for SDGs. Erişim: https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/AMR_in_the_environment_implications_for_SDGs_SYEssack_UKZN.pdf Erişim tarihi: 16.11.2021.
2. Kadykalo S, Roberts T, Thompson M, Wilson J, Lang, M, Espeisse, O. (2018). The Value of Anticoccidials for Sustainable Global Poultry Production. *Int J Antimicrob Agents*. 51(3):304-310. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.09.004.
3. Pan M, Chu LM. (2017). Transfer of Antibiotics from Wastewater Or Animal Manure to Soil and Edible Crops. *Environ Pollut*. 231(1):829-836. doi: 10.1016/j.envpol.2017.08.051.
4. FAO (2017). Antimicrobial Resistance in Food and Agriculture. <http://www.fao.org/3/a-i7138e.pdf>. Erişim Tarihi 12.01.2021.
5. Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet, J, et al. (2015). The Global Threat of Antimicrobial Resistance: Science for Intervention. *New Microbes and New Infect*. 6: 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.02.007>
6. Roberts, SC, Zembower, TR. (2020). Global Increases in Antibiotic Consumption: A Concerning Trend for WHO Targets. Erişim: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30456-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30456-4). Erişim tarihi: 10.11.2021
7. Morgan DJ, Okeke IN, Laxminarayan R, Perencevich EN, Weisenberg S. (2011). Non-prescription Antimicrobial Use Worldwide: A Systematic Review. *Lancet Infect Dis*. 11: 692-701.
8. Tiseo K, Huber L, Gilbert M et al. (2020). Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030. *Antibiotics*. 9:918. doi:10.3390/antibiotics9120918
9. Wellington EMH, Boxall AB, Cross, P et al. (2013). The Role of the Natural Environment in the Emergence of Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Lancet Infect Dis*. 13:155-165. doi:10.1016/S1473-3099(12)70317-1.
10. Pruden A, Larsson DG, Amezquita A, et al. (2013). Management Options for Reducing the Release of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes to the Environment. *Environ. Health Perspect*. 121: 878-885. doi:10.1289/ehp.1206446.
11. OIE. (2021). WHO, FAO, and OIE Unite in the Fight Against Antimicrobial Resistance. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/FAO_OIE_WHO_AMRfactsheet.pdf Erişim Tarihi 12/01/2021.
12. WHO. (2021). Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS). <https://www.who.int/initiatives/glass>. Erişim Tarihi 24.11.2021.
13. ECDC. (2021). European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net>. Erişim Tarihi 12/01/2021.
14. WHO (2021). Antimicrobial Resistance Document Centre. Essential Medicines and Health Products. https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/AMR_Document_Center/en/ Erişim Tarihi 12/01/2021.
15. WHO (2021). WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption: 2016-2018 Early Implementation ISBN 978-92-4-151488-0. https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/who-amr-amc-report-20181109.pdf Erişim Tarihi 12/01/2021
16. İşler B, Keske S, Aksoy M, Azap OK, Yılmaz M, Yavuz SS, Aygün, Tigen E, Akalın H, Azap A, Ergönül O. (2019). Antibiotic Overconsumption and Resistance in Turkey. *Clinical Microbiol and Infect*. 25(6): 651-653. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.02.024>.
17. EMA (European Medicines Agency) (2016). Defined Daily Doses for Animals (Dddvet) and Defined Course Doses for Animals (DCDvet). EMA/224954/2016 Report. Erişim: https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/defined-daily-doses-animals-dddvet-defined-course-doses-animals-dddvet-european-surveillance_en.pdf. Erişim Tarihi: 17.11.2021.
18. Finley RL, Collignon P, Larsson DG, McEwen SA, Li XZ, Gaze WH et al. (2013). The Scourge of Antibiotic Resistance: the Important Role of the Environment. *Clin Infect Dis*. 57:704-710. doi:10.1093/cid/cit355.
19. Treiber FM, Beranek-Knauer H. (2021). Antimicrobial Residues in Food from Animal Origin—A Review of the Literature Focusing on Products Collected in Stores and Markets Worldwide. *Antibiotics*. 10:534. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050534>.
20. Küçükbüğrü N, Acaröz U. (2020). Gıdalarda Antibiyotik Kalıntıları ve Halk Sağlığına Etkileri. *Vet Farm Toks Dern Bult*. 11 (3): 161-167. DOI: 10.38137/vetfarmatoksbulen.822713. Erişim: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/vetfarmatoksbulen/issue/58592/822713>, Erişim tarihi: 24.11.2021.
21. Williams-Nguyen J, Sallach JB, Bartelt-Hunt S, et al. (2016). Antibiotics and Antibiotic Resistance in Agroecosystems: State of the Science. *J Environ Qual*. 45(2):394-406. DOI:10.2134/jeq2015.07.0336.
22. Manyi-Loh C, Mamphweli S, Meyer E, Okoh A. (2018).. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules*. 23(4): 795. doi: 10.3390/molecules23040795.
23. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J*. 15:5077.
24. Velasquez CG, Macklin KS, Kumar S, Bailey M, Ebner P, Oliver HF. (2018). Prevalence and Antimicrobial Resistance Patterns of Salmonella Isolated from Poultry Farms in Southeastern United States. *Poult Sci*. 97:2144–2152. DOI: 10.3382/ps/pex449.
25. Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell J. (2004). Does the Use of Antibiotics in Food Animals Pose A Risk to Human Health? A Critical

- Review of Published Data. *J Antimicrob Chemother.* 53(1):28-52. doi: 10.1093/jac/dkg483.
26. Yaman İ, Taşçı F. (2019). Hayvansal Gıdalarda Antibiyotik Kalınlığı ve Halk Sağlığı Açısından Önemi. Kongre kitapçığı: s2-28. VIII. Ulusal II. Uluslararası Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi 24/27 Ekim 2019 Antalya. Erişim: <https://www.researchgate.net/publication/340033665>. Erişim tarihi: 17.11.2021.
27. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Food Safety Authority (EFSA) and European Medicines Agency (EMA). (2021). Third Joint Inter-agency Report on Integrated Analysis of Consumption of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Humans and Foodproducing Animals in the EU/EEA JIACRA III 2016-2018. *EFSA Journal.* 19(6):6712. Erişim: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/6712>. Erişim tarihi:21.11.2021.
28. Zhao Y, Yang QE, Zhou X, Wang FH, Muurinen J, Virta MP, Brandt KK, Zhu YG. (2021). Antibiotic Resistome in the Livestock and Aquaculture Industries: Status and Solutions, Critical Reviews in Environ Sci Technol. 51:19, 2159-2196, DOI: 10.1080/10643389.2020.1777815.
29. Miranda CD, Godoy FA, Lee MR. (2018). Current status of the use of antibiotics and the antimicrobial resistance in the Chilean Salmon Farms. *Frontiers in Microbiol.* 18(9):1284. doi: 10.3389/fmicb.2018.01284.
30. Iwu CD, Korsten L, Okoh AI. (2020). The Incidence of Antibiotic Resistance within and Beyond the Agricultural Ecosystem: A Concern for Public Health. *Microbiology Open.* 9:e1035. Doi: 10.1002/mbo3.1035. Erişim: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mbo3.1035>. Erişim tarihi: 17.11.2021.
31. Joakim Larsson DG, Flach CF. (2021). Antibiotic Resistance in the Environment. *Nature Reviews/Microbiology.* Erişim: <https://www.nature.com/articles/s41579-021-00649-x>. Erişim tarihi: 21.11.2021.
32. Pan M, Chu LM. (2017). Transfer of Antibiotics from Wastewater or Animal Manure to Soil And Edible Crops. *Environ Pollut.* 231(1):829-836. doi: 10.1016/j.envpol.2017.08.051.
33. Haynes E, Ramwell C, Griffiths T, Walker D, Smith J. (2019). Review of Antibiotic Use in Crops, Associated Risk of Antimicrobial Resistance and Research Gaps. Erişim: <https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/review-of-antibiotic-use-in-crops-associated-risk-of-antimicrobial-resistance-and-research-gaps-final.pdf>. Erişim tarihi:17.11.2021.
34. Thanner S, Drissner D, Walsh F. (2016). Antimicrobial Resistance in Agriculture. *mBio* 7(2):e02227-15. doi:10.1128/mBio.02227-15.
35. Zalewska M, Błazejewska A, Czapko A, Popowska M. (2021). Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Animal Manure – Consequences of its Application in Agriculture. *Front. Microbiol.* 12:610656. doi: 10.3389/fmicb.2021.610656.
36. Ding G-C, Radl V, Schlöter-Hai B, Jechalke S, Heuer H, et al. (2014). Dynamics of Soil Bacterial Communities in Response to Repeated Application of Manure Containing Sulfadiazine. *PLoS ONE* 9(3): e92958. doi:10.1371/journal.pone.0092958.
37. Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MO, Dantas G. 2012. The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens. *Science.* 337:1107–1111. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1220761>.
38. Zhu B, Chen Q, Chen S, Zhu Y-G. (2017). Does Organically Produced Lettuce Harbor Higher Abundance of Antibiotic Resistance Genes than Conventionally Produced? *Environ. Int.* 98:152–159. doi: 10.1016/j.envint.2016. 11.001.
39. Marshall BM, Levy SB. (2011). Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clin Microbiol Rev.* 24:718-733.
40. IDF Factsheet 003/2017-05. Guidance on Antimicrobial Resistance from the Dairy Sector. Erişim: https://www.fil-idf.org/wp-content/uploads/2017/05/Factsheet-003_2017-Guidance-on-Antimicrobial-Resistance-from-the-Dairy-Sector.pdf. Erişim Tarihi 12.10.2021.
41. Biomerieux. (2021) Antimicrobial Resistant Genes in Fermented Food Products. Erişim: <https://www.biomerieuxconnection.com/2021/01/19/antimicrobial-resistant-genes-in-fermented-food-products/> Erişim Tarihi 12.01.2021.
42. Gülmez, M. and Güven, A. (2003). Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b and *Yersinia enterocolitica* O3 in Different Yogurt and Kefir Combinations as Pre-fermented Contaminant. *J Appl Microbiol.* 95: 631-636. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02016.x>
43. Gülmez, M. and Güven, A. (2003). Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b and *Yersinia enterocolitica* O3 in Ayran and Modified Kefir as Pre- and Postfermentation Contaminant. *Vet Med Czech.* 48:126-132. <https://doi.org/10.17221/5759-VETMED>
44. Verraes C, Van Boxtael S, Van Meervenne E et. al. (2013). Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review *Int. J Environ Res Public Health.* 10:2643-2669. doi:10.3390/ijerph10072643.
45. Van der Auwera GA, Timmerly S, Hoton F, Mahillon J. (2007). Plasmid Exchanges Among Members of the *Bacillus Cereus* Group in Foodstuffs. *Int. J Food Microbiol.* 113: 164–172. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.030.
46. Toomey N, Monaghan A, Fanning S, Bolton DJ. (2009). Assessment of Antimicrobial Resistance Transfer Between Lactic Acid Bacteria and Potential Foodborne Pathogens Using in Vitro Methods and Mating in a Food Matrix. *Foodborne Pathog Dis.* 6: 925–933. doi: 10.1089/fpd.2009.0278.
47. Sarkar DJ, Mukherjee I, Shakil NA, Rana VS, Kaushik P, Debnath S. (2018). Antibiotics in Agriculture: Use and Impact. *IJEPP.* 4 (1): 4-19. Erişim: <https://www.researchgate.net/publication/325010472>. Erişim Tarihi: 24.11.2021.
48. World Health Organization. (2015). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Erişim: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/>. Erişim Tarihi: 24.11.2021.
49. Erdoğan ŞZ, Gülmez N, Fındık A, Şah H, Gülmez M. (2018). Efficacy of Probiotics on Health Status and Growth Performance of *Eimeria Tenella* Infected Broiler Chickens. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, 25(3): 311-320. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2018.20889>
50. Gülmez M, Oral N, Vatansever L. (2006). The Effect of Water Extract of Sumac (*Rhus coriaria* L.) and Lactic Acid on Decontamination and Shelf-life of Raw Broiler Wings. *Poultry Sci.* 85:1466-1471. <https://doi.org/10.1093/ps/85.8.1466>
51. Oral N, Gülmez, M, Vatansever L, Güven A. (2008). Application of Antimicrobial Ice for Extending Shelf Life of Fish. *J Food Prot.* 71(1): 218-222. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.1.218>.

✉ Sorumlu Yazar:

Murat GÜLMEZ

Siirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Siirt, TÜRKİYE

E-posta: murat.gulmez@siirt.edu.tr



Propolis ve Ruminantlarda Alternatif Yem Katkı Maddesi Olarak Kullanımı

Ali KABİLOĞLU^{1,a,✉}, Neşe KOCABAĞLI^{2,b}

¹İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul, TÜRKİYE

²İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, TÜRKİYE

^aORCID: 0000-0003-1579-1901; ^bORCID: 0000-0002-2797-9410

Geliş Tarihi/Received
30.03.2022

Kabul Tarihi/Accepted
16.05.2022

Yayın Tarihi/Published
30.06.2022

Öz

Apiterapi, arıcılık ürünleri kullanılarak yapılan doğal bir tedavi yöntemi olup tıp dünyasında "tamamlayıcı/destekleyici tedavi" niteliğinde kabul edilmektedir. Dünyada arı ürünlerinin gıda, tarım ve hayvancılıkta kullanımına yönelik çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Propolis, bal arıları tarafından çeşitli bitki kaynaklarından toplanmış reçinemi materyalin genel adıdır. Propolis özellikle yapısındaki zengin flavonoid, fenolik asit ve terpenoidler nedeniyle antibakteriyel, antifungal, antiviral, antikarsinojen, antioksidan ve yangı giderici aktivite gösteren organik bir maddedir. Araştırmalar propolisin söz konusu özelliklerinden dolayı gerek organik hayvancılık gerek hayvan sağlığı ve gerekse alternatif büyütme faktörleri bakımından üzerinde durulması gereken alternatif bir yem katkısı olabileceğini göstermektedir. Bu derlemenin amacı, propolisin farklı özelliklerini ve bu konuda ruminant beslemede yapılan araştırmaları değerlendirmektir.

Anahtar Kelimeler: Propolis, ruminant, yem katkısı.

Propolis and its Use as an Alternative Feed Additive in Ruminants

Abstract

Apitherapy is a natural treatment method using beekeeping products and is considered a "complementary/supportive treatment" in the medical world. Various studies are carried out in the world for the use of bee products in food, agriculture, and animal husbandry. Propolis is the general name for the resinous material collected from various plant sources by honeybees. Propolis is an organic substance with antibacterial, antifungal, antiviral anticarcinogen, antioxidant and antienflamatur activity, especially due to its rich flavonoid, phenolic acid and terpenoids. Studies show that propolis can be an alternative feed additive that should be considered in terms of organic livestock, animal health and alternative growth factors due to its properties. The purpose of this review is to evaluate the different properties of propolis and the studies on this subject in ruminant feeding.

Key Words: Feed additive, propolis, ruminant.

GİRİŞ

Antik uygarlıklardan bu yana arı ürünleri insan, hayvan ve bitki sağlığını iyileştirmek için kullanılmaktadır. "Apiterapi" adı verilen bu yöntem, doğal ürünlerin kullanımına bağlı olması nedeniyle, beşerî hekimlikte "destekleyici/tamamlayıcı uygulama" niteliğindedir. Bal, polen, arı sütü, arı zehri, propolis, arı ekmeği ve apilarnil arı ürünleri olup değişik uygulama biçimlerinde, değişik ekstrakt, dilüsyon ve dozlarda hayvan sağlığı için kullanılmaktadır (1).

Propolis, Yunancadan gelen bir kelime (Pro-polis: şehir savunması-bölge savunması) olup; ağaç kabuklarından, bitkilerin filiz, dal ve tomurcuklarından işçi arılar (*Apis mellifera*) tarafından toplanıp arka bacaklarındaki polen sepetçiklerinde kovana taşıdıkları; reçinemi maddeleri ve bitki nektarlarını, başının arka tarafında bulunan salgı bezlerinden salgılanan enzimlerle biyokimyasal değişikliğe uğratarak ve bir miktar bal mumuyla muamele ederek oluşturdukları, elde edildiği bitki popülasyonuna göre koyu kahverenginden açık

sarıya kadar değişen renk ve kıvamda, oda sıcaklığında genellikle yarı katı halde olan organik yapışkan bir maddedir (2). Doğada arılar, kovanın girişini, her türlü çatlağını, kovanda öldürülen düşmanları ve ölen arıları bu materyalle kaplayarak koloninin korunmasını sağlamaktadır (3).

Halk sağlığında birçok hastalık üzerinde yapılan çalışmalarda hastalıkların önlenmesi ya da destekleyici tedavisine propolisin olumlu yönde katkıda bulunduğu belirlenmiştir. İrinli yaraların sağaltımı, diş hassasiyetinin azaltılması ya da çürüklerin önlenmesinde, kalp ve damar sağlığının korunmasında propolis kullanıldığı bildirilmiştir (4).

Geçmiş yıllarda rumen fermantasyonunun olumsuz etkilerini önlemek, ruminant gastrointestinal sisteminde zararlı mikroorganizmaları kontrol etmek, yemden yararlanma oranını artırmak amacıyla yem katkı maddesi olarak iyonofor grubu antibiyotikler ve kemoterapötikler kullanılmıştır. Ancak, bu maddelerin yemlere ilavesinin mikroorganizma direncini artırdığı ve hayvansal ürünlerde rezidü riskine yol açtığı rapor edilmiştir (5). Avrupa Birliği, hayvansal ürünlerde

saptanan ilaç kalıntılarının insan ve hayvan sağlığı üzerindeki potansiyel olumsuz etkileri nedeni ile antibiyotikler başta olmak üzere birçok antimikrobiyal ilacın yem katkı maddesi olarak kullanımını yasaklamıştır (6).

Propolisin bakteriyel RNA polimerazını, bakterilerin hücre duvarı, sitoplazmik membran ve sitoplazmasının yapısını bozması özellikle gram pozitiflere karşı antibakteriyel etkiye sahip olması (7), serbest radikaller ile erimez bileşik oluşturarak oksitlenmeyi engellemesi (8), antiprotozoel etkisi ile rumendeki siliatlar tarafında metan üretimine etki ederek enerji kaybını azaltması (9), rumende amonyak üretimini azaltması (10), karaciğer enzim aktivitelerini düzenleyici etkisi ve aflatoksinlere karşı karaciğeri koruyucu olması (11), hiyaluronidaz enzim aktivitesini azaltıcı etkinliği ile yangı giderici etki göstermesi ile hayvanlarda sağlık, verim ve büyüme performansını olumlu etkileyecek potansiyele sahip olabileceği düşünülmektedir (12).

PROPOLİSİN YAPISI VE ÖZELLİKLERİ

Propolis soğukta çimento gibi katı ve kırılgan, sıcakta ise yumuşak ve yapışkan olup, 15-25°C arasında ise mum gibi elastik bir yapıdadır. Toplandığı bitkinin kaynağına göre rengi açık sarı, yeşil ve koyu kahverengine kadar değişim gösterebilmektedir (13). Propolis, hekzan, etil asetat metanol, etanol gibi çözücülerde büyük ölçüde çözünmekte suda ya hiç ya da çok az çözünebilmektedir. Bunun yanında, değişik sıcaklık ve basınç altında birçok çözücü ile ekstraksiyonu yapılabilmektedir (14, 15). Çok çeşitli bir bileşime sahip olan propolis, fenolik asitler, flavonoidler, terpenler gibi potansiyel olarak biyoaktif bileşikler de içermektedir (16). Genel olarak propolis toplandığı bitki florasına bağlı olarak %40-70 reçine; %3-5 uçucu yağ; %25-30 balmumu; %5 mineral madde, protein ve vitamin gibi diğer maddelerden meydana gelmiştir (17, 18). Kimyasal olarak başta pinosambirin, pinobanksin, quersetin, pinosembirin, galangin, ve kamferol olmak üzere 38 farklı flavonoid belirlenmiştir. Propoliste Fe, Se, Si, Ca, Cu, Mn, Mg, Zn, K, Na mineralleri ve B₁, B₂, B₆, C ve E vitaminleri bulunur (19). Türkiye’den elde edilen propolislerdeki fenolik bileşenler ağırlıklı olarak kumarik asit, galangin, naringenin, kuarsetin, ferulik asit olmakla birlikte (18) propolisin yapısında mirisetin, pinosembirin krisin, rutin, luteolin, sinamik asit gibi fenolik maddeler tespit edilmiştir (20). Yapılan çalışmalar bitkisel kaynaklar ve coğrafi özelliklerin propolisin kimyasal bileşimi ve standardizasyonunu sınırladığını göstermektedir (21). Tablo 1’de propolisin genel olarak yapısı (22) ve Tablo 2’de biyolojik olarak aktif bileşikler verilmiştir (23).

Tablo 1. Propoliste bulunan bileşikler (22)

Bileşen	Ana Maddeler	Miktar (%)
Reçine	Flavonoidler, terpenler, kumarinler, fenolik asitler ve esterleri	50-55
Bal mumu ve yağ asitleri	Steroidler, esterler, diğer asit ve türevleri	20-35
Uçucu yağlar	Uçucu bileşenler	5-10
Polen	Proteinler, serbest aminoasitler, vitaminler	2-5
Diğer maddeler	Ketonlar, laktonlar, kinonlar, şekerler	5-15

Tablo 2. Propolisin biyolojik aktif bileşikler (23)

Biyolojik aktivite	Etken madde
Antibakteriyel	Flavononlar, flavonlar, fenolik asitler ve esterleri, prenilat p-kumarik asitler, labdane diterpenler
Antifungal	Pinosembirin, galangin, benzoik asit, salisilik asit, vanillin, mono ve sesquiterpenler, artipellin C
Antiviral	Polifenoller, fenil karboksilik asitler, sinamik asit esterleri, kafeik asit, quersetin, luteolin, fisetin, quersajetin
Antioksidan	Flavonoid fenolikler ve esterleri
Radyasyon koruyucu	Prenilat p-kumarik asitler, flavonoidler
Karaciğer koruyucu	Flavonoidler, kafeik asit feniletil esteri, ferulik asit, kafeik asit, prenilat p-kumarik asitler, flavonoidler, lignanlar
Antikanser/ Antitümör	Kafeik asit, kafeik asit feniletil esteri, apigenin, quercetin, genistein, artipellin C, baccharin, drupanin, sinamik asit derivatları, prenilat p-kumarik asitler, klerodan diterpenler, benzofuranlar
İmmunmodilatör	Kafeik asit feniletil esteri, krisin, benzilkafeat, feniletilferulolat, sinamik asit, kafeoilquinik asit derivatları, klerodan diterpenler, artipellin C
Antiinflamatuvar	Flavononlar, flavonlar, fenolik asitler ve esterleri, artipellin C
Kalp koruyucu	Kafeik asit feniletil esteri, asasetin, krisin, quersetin, kafeoilquinik asit
Antiülser	Kafeik asit, pinosembirin, galangin, krisin, ferulik asit, p-kumarik asit ve sinamik asit

Propolis trombosit agregasyonu ve prostaglandin ve lökotrienlerin sentezini inhibe ederek yangı önlemede yardımcı olur (24). Propolisin içerisindeki aktif flavonoidlerinden olan quersetin özellikle kronik yangılarda çok etkilidir (25). Quersetin ve galanginin flavonoidleri, siklooksijenaz ve lipooksijenaz aktivitesini inhibe etmektedir. Ilman bölgelerden toplanan propoliste bolca bulunan kafeik asit fenil ester (CAPE), lenfokin üretimi ve T hücre proliferasyonu ile sitokin ve kemokin üretimini inhibe ederek yangıyı azaltır (26).

Propolisin antioksidan etkisi içerisindeki kafeik asit fenil esterinin (CAPE), serbest radikallerin üretimini inhibe etmesi, hücresel düzeyde H₂O₂ ve NO’in azaltılması, yağların peroksidasyonuna karşı hücresel membranı koruması ve protein nitrosasyonunu azaltmasından kaynaklanmaktadır (24). Sun ve arkadaşları (27) oksidatif stres oluşturulmuş ratlarda yaptıkları çalışmada propolis grubunun plazma C vitamini konsantrasyonu ile C vitamini doku konsantrasyonları incelenmiş olup propolis grubunda C vitamini konsantrasyonunu önemli oranda daha yüksek bulmuştur. Bu sonuç, propolisin bir antioksidan olarak hareket ederek dokularda C vitamininden tasarruf edildiğini ortaya çıkarmıştır.

Propolisin antimikrobiyal etkisinin yapısındaki sinamik asit, benzil p-kumarat ve kafeik asit esterlerinden ve pinosembirin, galangin, pinosilvin ve pinobanksin flavonoidlerinden kaynaklanmaktadır (28, 29). Propolisin laboratuvar çalışmalarında *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans*, *Enterococcus* spp., *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Tchophyton mentagrophytes* türlerine karşı antimikrobiyal etkisinin olduğu saptanmıştır (30). Ankara Kazan ve Muğla Marmaris’ten elde

edilen propolisin etanolik ekstraktlarıyla yapılan bir çalışmada (31) *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Bacillus subtilis*'e karşı antibakteriyel etkisi belirlenmiştir. Propolisin antimikrobiyal etkisinin türüne, dozuna, çözücüsüne ve çözünme süresine göre değiştiği bildirilmiştir (14). Çözücü olarak genellikle etil alkol, propilen glikol, gliserol veya su (32) kullanılsa da en yaygın antibakteriyel etkinliğini %70'lik etil alkol çözeltisinde göstermektedir (14).

Propolisin karbon tetraklorür ve alkol kaynaklı oksidatif stres ile deneysel sarılık modellerindeki oksidatif stres sonucu oluşan karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğu (33, 34, 35) rapor edilmiştir. Türkez ve arkadaşlarının Alüminyum klorür (AlCl₃)'e bağlı genotoksisite ve hepatotoksisiteye karşı propolisin etkisini belirlemek için yaptıkları çalışmada propolis uygulanan gruplarda hasarın önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. (36). Özellikle propolisin önceden uygulanması, oluşması muhtemel hasarlara karşı karaciğeri koruyucudur (37).

Propolisin antikanser ve antitümör özellikleri, dokulardaki artırılmış antioksidan duruma, bağışıklığı güçlendirmesine, maling üremeyi baskılamasına, kanser kök hücre sayısının azalmasına, onkogenik sinyal yollarının tıkanmasına, anti-anjiyogeneze, kemoterapötiklerin neden olduğu yan etkilerin hafifletilmesine dayanmaktadır (38, 39). Bu şekilde antitümör etki apoptoz, hücre döngüsü tutukluğu ve metabolik müdahale çerçevesinde gerçekleşmektedir (40). Propolisin yapısında yer alan kafeik asit, kafeik asit fenil ester (CAPE), kuersetin ve krizin tümör hücre gelişimini inhibe edebilme yeteneğine sahip olan bileşenlerdir. Ayrıca, propolisten izole edilen bir diğer madde olan artepilin C'nin apoptoz, olgunlaşmamış mitoz ve yoğun nekrozla oluşan malign melanoma hücreleri ile kanser hücrelerinin sitotoksitesini azalttığı daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (41).

Kaya ve arkadaşlarının kemoterapötik bir ilaç olan siklofosamidin kardiyotoksitesini üzerine propolisin etkilerini incelediği bir çalışmada propolisin siklofosamide bağlı kardiyotoksik etkileri azaltabileceği saptanmıştır (42).

Propolis ile ilgili diğer çalışmalarda ise *Candida albicans*, *Fusarium oxysporium f. sp. Malonis* ve *Alternaria alternata* gibi mantarlar üzerine antifungal ve antimikotik etki gösterdiği (43, 44); çeşitli grip virüsleri ve HIV-1 gibi virüsler üzerine de antiviral etki gösterdiği bildirilmiştir (45). Ayrıca yol açtığı pandemi hala devam etmekte olan SARS ve Cov-2 virüsleri üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar da devam etmektedir (46).

RUMİNAL FERMANTASYONA, SAĞLIĞA VE VERİME ETKİSİ

Ruminantların beslenmesi ve sağlığı ile ilgili propolis ile yapılan çalışmalar, propoliste bulunan flavonoidler ve fenolik bileşiklerinin hayvanların verimi ve rumen sağlığı açısından yararlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca flavonoidler ile fenolik bileşikler, rumen fermantasyonu, asidoz ve ruminal şişkinlik gibi beslenme streslerini de kontrol altına almaktadır (47,48).

Rumen florasında bulunan selüloolitik, hemiselüloolitik, pektinolitik ve eriyebilir şekerleri fermente eden mikroorganizmaların düzeyi, uçucu yağ asitlerinin (UYA) ve mikrobiyal proteinin üretimine bağlı olarak değişebilmektedir. Asetat ve metan üreten selüloolitik bakterilerin çoğu gram pozitif, propiyonat üretenler ise gram negatiftir (49). Selüloolitik bakteri-

ler (*Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* ve *Butyrivibrio fibrisovens*) rumendeki bitki parçalarına yapışır ve yapısındaki lif unsurlarını büyük ölçüde sindirir (50). Propolisin özellikle gram pozitif bakteriler olan asetat ve metan üreten selüloolitik bakterilerin üzerine olumsuz etkiye sahip olarak yemlerdeki lif sindirimini düşürdüğü belirlenmiştir (23).

Gram pozitif bakterilerine göre gram negatif bakteriler üzerinde daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermesi nedeniyle propolis, rumende mikrobiyal fermantasyonu düzenleyerek metan (CH₄) olarak atılan enerji kaybını azaltmak için kullanılabilir alternatif doğal bir üründür (51). Rumene gelen karbonhidratlar rumendeki mikrobiyal aktiviteyle fermente edilerek asetik, propiyonik ve bütirik asite (uçucu yağ asitleri-UYA) dönüşürler (52). Ayrıca rumendeki mikrobiyal sindirimin son ürünleri arasında hidrojen ve karbondioksit (CO₂) gazı da bulunmakta olup hidrojen metanojenik bakterilerce kullanılarak metan (CH₄) gazına dönüştürülür (49). Rumende propiyonik asit üretimi artırıldığında, hidrojen ve formik asitin rumen düzeyinin azaltılmasıyla metan oluşumu (metanogenezis) düşürülebilir (53). Morsy ve arkadaşları (54) Brezilya propolislerinin rumen gaz üretiminde ve organik maddelerin sindirilebilirliklerinde herhangi bir olumsuzluk oluşturmadan rumen CH₄ üretiminde azalma sağladıklarını bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada hem Brezilya kırmızı propolisi hem de Mısır kahverengi propolisi ekstraktlarının metan üretimini nispeten engellediğini ve bu etkinin metagonesis reaksiyonu için gerekli hidrojeni temin eden protozoalara karşı antiprotozon aktivitesinden kaynaklandığı bildirilmiştir (51, 55).

Rumende amonyak üretimi, mikroorganizmaların yemlerdeki proteinleri peptitlere ve aminoasitlere kadar parçalaması ve bu azotlu bileşiklerden amonyak oluşturulması ile olmaktadır (56). Amonyakın büyük bölümü rumen epitelinden emilir ve rumeno-hepatik azot siklusuyla tekrar rumene gelir. Amonyakı rumen mikroorganizmaları mikrobiyal protein sentezinde kullanabilirler. Ancak yemle alınan proteinin tamamının burada parçalanması istenmez, belli kısmının rumende değişikliğe uğramadan by-pass protein ya da by-pass aminoasit olarak duodenuma ulaşır burada protein sindirimi uğrayıp aminoasitlerin duodenum epitellerinden emilmesi istenir (23). Propolis ve nisinin rumen fermantasyonu üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada; propolis ve nisinin ruminal amonyak konsantrasyonunu azalttığı belirlenmiştir (57). Benzer bir çalışmada laktasyondaki ineklerin rasyonuna Brezilya propolisi ekstraktlarının ilave edilmesinin ham proteinin rumende parçalanabilirliğini düşürdüğü ve ruminal amonyak üretimini azalttığını ve ham proteinin by-pass olarak bağırsak sindirilebilirliğini artırdığı belirlenmiştir (58). Çalışmalar rumen azot metabolizması üzerinde propolisin olumlu etkiye sahip olduğunu göstermektedir (59). Propolisin rumendeki azot konsantrasyonunu düşürücü etkisinin aminoasitleri fermente eden bakterilerin gelişim ve büyümesinin azalmasından veya aminoasitlerin deaminasyonunun azalmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (10, 57).

Yeni doğan buzağılarda görülen ishaller üzerine propolisin etkilerini incelemek amacıyla yürütülen bir araştırmada buzağılara 2 cc %96'lık etil alkol çözeltisi ile hazırlanan propolis verilmiştir. Bir aylık deneme süresi sonunda propolis

grubu buzağılarda neonatal ishal görülmemiş ve ortalama dışkı puantajı 3 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu buzağılarda ise dışkı puantajı 5 düzeyinde bulunmuştur (60). Yücel ve arkadaşları (61) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, propolis uygulanan buzağılarda hiçbir yeni doğan ishalinin gözlenmediği ve ortalama dışkı skorunun 2'den az olduğu sonucuna varılmıştır. Kontrol grubu buzağılarında 4 skoru kaydedilmiştir. Yeni doğan buzağılara günde 4 ml etanol ekstrakt propolis uygulamasının kandaki demir içeriğini artırdığı gözlenmiştir (62).

Hashem ve arkadaşları (63), propolis etanolik ekstraktının, eritrosit sayısı, hematokrit değeri ve hemogloblin konsantrasyonunu dolayısıyla hematopoezisi arttırdığını bulmuşlardır. Ayrıca, propolis takviyesi ile dokularda antioksidan kapasite, kan plazma kolesterolü ve trigliserit konsantrasyonları azalırken, glikoz ile yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) düzeyleri artmıştır.

Morsy ve arkadaşları (64) tarafından propolis Santa Inês koyunlarında antiparaziter etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, *Trichuris sp.*, *Trichostrongylus sp.* ve *Ascaris sp.* ile doğal olarak enfekte olmuş koyunlarda %33'lük propolis ekstraktı kullanılmıştır. Denemede propolis uygulanan hayvanlarda toplam dışkı yumurta sayısında ortalama %59.7 azalma ve kontrol grubunda ortalama %63.6 artış bulunmuştur.

Ismael ve arkadaşları (65) tarafından yapılan bir çalışmada, listeriosisden şüphelenen koyun ve keçilerde antibiyotiklerin propolisle birlikte daha yüksek düzeyde klinik iyileşme sağladığını belirlemişlerdir.

Sakker ve ark. (66), süttan kesilmiş Hanwoo Kore buzağılarında propolis alternatif ve doğal bir yem katkı maddesi olarak etkisini, antibiyotik olan Neomisin ile karşılaştırmışlardır. Propolis uygulanan grubunun immünoglobulin G, A ve M konsantrasyonlarında, büyüme potansiyeli, yem tüketimi ve kanın biyokimyasal özelliklerinde artışa neden olduğunu bulmuşlardır.

Propolis uygulaması, meme dokusu enfeksiyonu olan mastitise karşı da olumlu sonuçlar vermektedir. Çeşitli araştırmalarda hem keçi hem de inek mastitis patojenlerine karşı tedavide düşük maliyeti ve yüksek antibakteriyel etkisi ile propolis kullanılabilirliği ifade edilmiştir (67, 68).

Zawadzki ve ark. (69) besi sığırlarının rasyonlarına propolis ekstraktı ilavesinin besi sonu canlı ağırlığı artışı, ortalama günlük canlı ağırlık artışı, sıcak karkas ağırlığı ve yemden yararlanmanın monensin ve kontrol grubuna göre önemli düzeyde olumlu etkilendiğini belirlemişlerdir.

Aguiar ve arkadaşları (58) tarafından propolisin süt verimi ve kalitesi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışma, propolis takviyesi ile beslenen ineklerde sütte protein içeriğinin daha yüksek olduğunu ve aynı zamanda ineklerin daha yüksek süt verimine sahip olduğunu göstermektedir.

Yüksek flavonoid içeriği nedeniyle propolis hayvanların üreme performansını da etkileyebilmektedir. Hashem ve arkadaşları (63), propolis etanol ekstraktının (150 mg/kg rasyonda) rasyona ilavesinin, subtropik sıcak mevsimlerde cinsel aktiviteyi, yüksek sperm konsantrasyonu, semen kalitesini ve testosteron konsantrasyonunu iyileştirdiğini tespit etmişlerdir.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarla, propolis yapısındaki zengin flavonoid, fenolik asit ve terpenoidler nedeniyle antioksidan, antibakteriyel, antifungal ve antiviral aktivite gösteren organik bir madde olduğu açık bir şekilde ortaya konmuştur. Bu özellikleri ile propolis, hayvansal ürünlerde kalıntı bırakmaması, buzağı ishalleri başta olmak üzere çeşitli hastalıklarda koruyucu-tamamlayıcı tedavide güvenle kullanılabilmesi, ruminal fermentasyon ve mikrobiyal yapısı üzerine etkisiyle yemden yararlanmayı ve verimi artırabilmesi, üreme performansı üzerine etkisi ve doğal büyüme faktörü olarak kullanılabilmesi gibi özellikleriyle alternatif yem katkısı olarak üzerinde durulması gereken organik bir madde olarak değerlendirilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Topal E, Yücel B, Köseoğlu M. (2015). Arı Ürünlerinin Hayvancılık Sektöründe Kullanımı. J Anim Production. 56(2): 48-53.
2. Özcan M, Ceylan DA, Unver A, Yetisir R. (2003). Türkiye'nin Çeşitli Bölgelerinden Saglanan Polen ve Propolis Ekstraktlarının Antifungal Etkisi. Uludag Bee Journal. 3 (3): 27-34.
3. Kutluca S, Genç F, Korkmaz A. (2006). Propolis. Samsun Valiliği, Tarım İl Müdürlüğü, Baskı: Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şube Müdürlüğü, Samsun, ss:1-57.
4. Acun S, Gül H. (2020). Fonksiyonel Bir Ürün Olan Propolisin Sağlık Üzerine Etkisi. Uludag Bee Journal. 20(2): 189-208.
5. Yıbar A, Soyutemiz E. (2013). Gıda Değeri Olan Hayvanlarda Antibiyotik Kullanımı ve Muhtemel Kalıntı Riski. Atatürk Üni Vet Bil Derg. 8(1): 97-104.
6. Resmi Gazete, <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2022/02/20220218-3.htm> Erişim tarihi:12.03.2022.
7. Prado OPP, Zeoula LM, Moura LPP, Franco SL, Paiva SB, Arcuri PB. (2010). Isolation And Expeditious Morphological, Biochemical and Kinetic Characterization of Propolis-Tolerant Ruminant Bacteria. R Bras Zootec. 39(9): 2048-54.
8. Cottica SM, Aguilar SC, Paula EM et al. (2011). Antioxidant Activity in Milk of Dairy Cows Fed Diets Containing Propolis-based Products. ADSA, ASAS New Orleans, Louisiana/USA.
9. Rispoli TB, Rodrigues IL, Martins Neto RG et al. (2009). Ruminant Ciliate Protozoa of Cattle and Buffalo Fed on Diet Supplemented with Monensin or Extracts from Propolis. Pesqui Agropecu Bras. 44: 92-7.
10. Öztürk H, Pekcan M, Sireli M, Fidancı UR. (2010). Effects of Propolis on in Vitro Rumen Microbial Fermentation. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 57: 217-221.
11. El-Shobaki FA, Refaat OG, Saleh ZA, Abd-Elftah ABS, El-Hagar EF. (2011). The Effect of Consuming a Cake Containing Propolis on Gut Micro Flora and Toxicity. J American Sci. 7(7): 421-429.
12. Park YK, Ikegaki M. (1998). Preparation of Water and Ethanol Extracts of Propolis and Evaluation of the Preparations. Biosci Biotechnol Biochem. 62(11): 2230-2232.
13. Kumova U, Korkmaz A, Avcı BC, Ceyran G. (2002). Önemli Bir Arı Ürünü: Propolis. Uludag Bee Journal. 2 (2): 10-23.
14. Bakkaloğlu Z, Arıcı M. (2019). Farklı Çözücülerle Propolis Ekstraksiyonunun Toplam Fenolik İçeriği, Antioksidan Kapasite ve Antimikrobiyal Aktivite Üzerine Etkileri. Akademik Gıda. 17(4) 538-545.
15. Keskin M, Kolaylı S. (2019). Propolis Ekstraktlarının Kalite Parametreleri Açısından Karşılaştırılması. Uludağ Bee Journal. 19(1),43-49.

16. Omar B, Badia D, Abdelhakim B, Yousif L, Nadia SS, Jamal A. (2019). Phenolic Content, Antibacterial and Antioxidant Activities of Moroccan Propolis. Bentham Science Publishers. 15 (6): 696-705.
17. Ismail TNNT, Sulaiman SA, Ponnuraj KT, Man CN, Hassan NB. (2018). Chemical Constituents of Malaysian Apis Mellifera Propolis. Sains Malaysiana. 47(1): 117-122.
18. Keskin Ş, Yatanaslan L, Karlıdağ S. (2020). Anadolu'nun Farklı İllerinden Toplanan Propolis Örneklerinin Kimyasal Karakterizasyonu. Uludag Bee Journal. 20(1): 81-88.
19. Coşkun P, İnci H. (2020). Propolisin Kimyasal İçeriği ile Antibakteriyel, Antiviral ve Antioksidan Aktivitesi. ISPEC Tarım Bilimleri Derg. 4 (4):1059.
20. Gargouri W, Oses SM, Fernandez-Muino MA, Sancho MT. (2019). Evaluation of Bioactive Compounds and Biological Activities of Tunisian Propolis. Food Science and Technology. 111: 328-336.
21. Wang T, Liu Q, Wang M, Zhang L. (2020). Metabolomics Reveals Discrimination of Chinese Propolis from Different Climatic Regions. Foods. 9(4): 491.
22. Aydın M, Arslan D, Türker S. (2021). Propolisin Genel Özellikleri ve Kullanımı. Gıda. 46 (1): 69-81.
23. Kara K, Kocaoğlu Güçlü B, Karakaş Oğuz, F. (2014). Propolis ve Fenolik Asitlerin Ruminant Beslemede Kullanımı. Erciyes Ü Vet Fak Derg. 11: 43-53.
24. Memmedov H, Aldemir O, Aliyev E. (2017). Propolisin Antioksidan ve Antiinflamatuvar Etkisi. Arıcılık Araştırma Dergisi. 9(2):56-62.
25. Yanga Y, Zhangb X, Xua M, Wuc X, Zhaod F, Zhaoe C. (2018). Quercetin Attenuates Collagen-induced Arthritis by Restoration of Th17/Treg Balance and Activation of Heme Oxygenase 1-Mediated Anti-inflammatory Effect. International Immunopharmacology. 54:153-162.
26. Martos MV, Navajas YR, Fernandez LJ, Alvarez JAP. (2008). Functional Properties of Honey, Propolis and Royal Jelly Journal of Food Sci. 73(9).
27. Sun F, Hayami S, Haruna S et al. (2000). In Vivo Antioxidative Activity of Propolis Evaluated by the Interaction with Vitamins C and E and The Level of Lipid Hydroperoxides in Rats. J Agric Food Chem. 48 (5): 1462-1465.
28. Seven İ, Aksu T, Tatlı Seven P. (2007). Propolis ve Hayvan Beslemede Kullanımı. YYÜ Vet Fak Derg. 18(2):79-84.
29. Almuhayawi MS. (2020). Propolis as a Novel Antibacterial Agent. Saudi Journal of Biological Sciences. 27:3079-3086.
30. Uzel A, Sorkun K, Önçay Ö, Çogulu D, Gençay Ö, Salih B. (2005). Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Four Different Anatolian Propolis Samples. Microbiol Res. 160: 189-195.
31. Kartal M, Yıldız S, Kaya S, Kurucu S, Topçu G. (2003). Antimicrobial Activity of Propolis Samples from Two Different Regions of Anatolia. J Ethnopharmacol. 86(1): 69-73.
32. Silici, S. (2019). Honeybee Products and Apitherapy. Turk J Agric Food Sci Technol. 7(9): 1249-1262.
33. Bhadauria M, Nirala SK, Shukla S. (2007). Propolis Protects CYP 2E1 Enzymatic Activity and Oxidative Stress Induced by Carbon Tetrachloride. Mol Cell Biochem. 302: 215-224.
34. Kolankaya D, Selmanoglu G, Sorkun K et al. (2002). Protective Effects of Turkish Propolis on Alcohol-induced Serum Lipid Changes and Liver Injury in Male Rats. Food Chemistry. 78: 213-217.
35. Kismet K, Sabuncuoglu MZ, Kilicoglu SS et al. (2008). Effect of Propolis on Oxidative Stress and Histomorphology of Liver Tissue in Experimental Obstructive Jaundice. Eur Surg Res. 41: 231-237.
36. Turkez H, Yousef Mokhtar I, Geyikoglu F. (2010). Propolis Protects Against 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced Toxicity in Rat Hepatocytes. Food Chem Toxicol. 50: 2142-2148.
37. Doğanıyigit Z. (2013). Propolis ve Karaciğer Koruyucu Etkisi. U Bee J. 13 (2): 70-78.
38. Benkovic V, Knezevic HA, Brozovic G et al. (2007). Enhanced Antitumor Activity of Irinotecan Combined with Propolis and Its Polyphenolic Compounds on Ehrlich Ascites Tumor in Mice. Biomed&Pharmacotherapy. 61:292-297.
39. Memmedov H, Aldemir O, Aliyev E. (2018). Propolisin Antikanser Etkisi. Arıcılık Araştırma Dergisi. 10 (1): 20-27.
40. Patel S. (2016). Emerging Adjuvant Therapy for Cancer: Propolis and its Constituents, J Diet Suppl.13(3): 245-268.
41. Galati G, Teng S, Moridani MY, Chan TS, O'Brien PJ. (2000). Cancer Chemoprevention and Apoptosis Mechanisms Induced by Dietary Polyphenolics. Drug Metabol Drug Interact. 17: 311-349.
42. Kaya E, Yılmaz S, Çolakoğlu N. (2019). Ratlarda Siklofosfamidin Sebep Olduğu Kardiyotoksistide Propolisin Koruyucu Rolü. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 66: 13-20.
43. Moreno MA, Vallejo AM, Ballester AR et al. (2020). Antifungal Edible Coatings Containing Argentinian Propolis Extract and Their Application in Raspberries. Food Hydrocolloids. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.105973. 107: 105973.
44. Katircioğlu H, Mercan N. (2006). Antimicrobial Activity and Chemical Compositions of Turkish Propolis from Different Regions. African Journal of Biotechnology. 5(11): 1151-1153.
45. Mojarab S, Shahbazzadeh D, Moghbeli M et al. (2020). Immune Responses to HIV-1 Polytope Vaccine Candidate Formulated in Aqueous and Alcoholic Extracts of Propolis: Comparable Immune Responses to Alum and Freund Adjuvants. Microbial Pathogenesis. Doi: 10.1016/j.micpath.2019.103932. 140:103932
46. Kumar V, Dhanjal JK, Kaul SC, Wadhwa R, Sundar D. (2020). Withanone and Caffeic Acid Phenethyl Ester are Predicted to Interact with Main Protease (Mpro) of SARS-CoV-2 and Inhibit Its Activity. J Biomol Struct Dynamics. 1-17.
47. Yıldız B, Öztürk, YE, Kardeş YM, Mut H, Gülümser E. (2021). Kaba Yem Olarak Değerlendirilen Ökse Otunun Antioksidan Özellikleri ve Kondanse Tanen İçeriklerinin Belirlenmesi. Anadolu Tarım Bil Derg. 36(1): 132-137.
48. Boğa M, Kocadayıoğulları F, Erkan Can M. (2022). Flavonoid ve Saponinlerin Ruminant Hayvan Beslemede Kullanımı. Derleme (Review). 5(1): 34-41.
49. Moss AR, Jouany JP, Newbold J. (2000). Methane Production by Ruminants: Its Contribution to Global Warming. Annal Zootech. 49: 231-253.
50. Kocaoğlu Güçlü B, Kara K. (2010). Ruminant Beslemede Alternatif Yem Katkı Maddelerinin Kullanımı. II. Organik asit, Yağ Asiti, Adsorban. Erciyes Üni Vet Fak Derg. 7(1): 43-52.
51. Morsy AS, Soltan YA, Sallam SMA et al. (2015). Comparison of the in Vitro Efficiency of Supplementary Bee Propolis Extracts of Different Origin in Enhancing the Ruminant Degradability of Organic Matter and Mitigating the Formation of Methane. Anim Feed Sci Technol. 199 (1): 51- 60.
52. Varga GA, Kolver ES. (1997) Microbial and Animal Limitations to Fiber Digestion and Utilization. J Nutr. 127: 819-823.

53. Kocaoğlu Güçlü B, Kara K. (2009). Ruminant Beslemede Alternatif Yem Katkı Maddelerinin Kullanımı. I. Probiyotik, Prebiyotik, Enzim. Erciyes Üni Vet Fak Derg. 6(1): 65-75.
54. Morsy AS, Soltan YA, Elzaat HM et al. (2011). Effect of Two Types of Brazilian Propolis Extracts on Rumen Gas and Methane Production and Truly Degradability in Vitro. Middle East and North Africa J of Ani Sci. 4 (1): 446 – 456.
55. Ndimballan M, Yücel B. (2021). Hayvanların Sağlıklı ve Doğal Geleşiminin Desteklenmesinde Yeni Bir Vizyon; Arı Ürünleri. 5th International Students Science Congress 21-22 May, Izmir – Turkey.
56. Theodorou MK, Kingston-Smith AH, Winters AL et al. (2006). Polyphenols and Their Influence on Gut Function and Health in Ruminants: A review. Environ Chem Lett. 4: 121-126.
57. Öztürk H, Emre B, Samanlıoğlu V, Piskin I. (2010). Effects of Nisin and Propolis on Ruminal Fermentation in Vitro. J Anim Vet Adv. 9(21): 2752-2758.
58. Aguiar SC, Cottica SM, Boeing JS et al. (2014). Effect of Feeding Phenolic Compounds from Propolis Extracts to Dairy Cows on Milk Production, Milk Fatty Acid Composition, and the Antioxidant Capacity of Milk. Animal Feed Science and Technology. 193: 148-154.
59. Soltan YA, Morsy A, Sallam S, Hashem N, Abdalla A. (2016). Propolis As a Natural Feed Additive in Ruminant Diets; Can Propolis Affect the Ruminants Performance? Egyptian Journal of Nutrition and Feeds. (19):73-79.
60. Tolon B, Önenç A, Kaya A, Altan Ö. (2002). Effects of Propolis on Growth of Calves. 1st German Congress for Bee Products and Apitherapy. 23-24 March, Passau-Germany.P.71.
61. Yücel B, Onenc A, Kaya A, Altan O. (2015). Effects of Propolis Administration on Growth Performance and Neonatal Diarrhea of Calves. SOJ Vet Sci 1(1): 102.
62. Kupczyński R, Adamski M, Falta D, Roman A. (2012). The Efficiency of Propolis in Post-Colostrual Dairy Calves. Archiv fur Tierzucht 55(4): 315-324.
63. Hashem NM, El-Hady A, Hassan O. (2013). Effect of Propolis Supplementatin on Semen Quality, Oxidative Status and Hemato Biochemicalchanges of Rabbit Bucks During Hot Season. Livestock Sci. 157(2) 520–526.
64. Morsy AS, Abdalla AL, Soltan YA et al. (2013). Effect of Brazilian red Propolis Administration on Hematological, Biochemical Variables and Parasitic Response of Santa Inés Ewes During and After Flushing Period. Tropical Animal Health and Production. 45 (7):1609–1618.
65. Ismael AB, El-Sayed EM, Sameh Mohammed EN. (2019). Potential Clinical Role of Propolis in Treatment of Clinical Ovine and Caprine Listeriosis. J Vet Med. 57: 301-309.
66. Sarker MSK, Yang CJ. (2010). Propolis and Illite as Feed Additives on Performance and Blood Profiles of Pre-weaning Hanwoo calves. J Anim Vet Adv. 9(19): 2526-2531.
67. Silva CSR, Villaça CLPB, Peixoto B et al. (2012). Antibacterial Effect of Brazilian Brown Propolis in Different Solvents Against *Staphylococcus spp.* Isolated from Caprine Mastitis. Ci Anim Bras 13(2): 247-251.
68. Erski-Biljic, M., Dobric D. (2003). The Efficacy of Propolis to Causative Agents of Mastitis of Dairy Cows. 38th International Apicultural Congress, 24-29 August, Ljubljana-Slovenia. P. 938.
69. Zawadzki F, Prado IN, Marques JA et al. (2011). Sodium Monensin or Propolis Extract in the Diets of Feedlot-finished Bulls: Effects on Animal Performance and Carcass Characteristics. J Anim Feed Sci. 20: 16–25.

✉ **Sorumlu Yazar:**

Ali KABİLOĞLU

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Öğrencisi, 34320 Avcılar, İstanbul, TÜRKİYE

E-posta: alikabiloglu@hotmail.com