

ISSN 1016 - 3573 • e-ISSN 2717 - 8099



VETERİNER KONTROL MERKEZ  
ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ  
Etlik - ANKARA



# ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ

JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY  
ANKARA - TURKEY



Cilt/Volume 34 ♦ Sayı/Issue 2 ♦ 2023

ISSN 1016-3573 • e-ISSN 2717-8099



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



# **ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ**

JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY  
ANKARA – TURKEY

**Cilt/Volume 34 ♦ Sayı/Issue 2 ♦ 2023**



---

**Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi**  
**Journal of Etlik Veterinary Microbiology**

**Cilt/Volume 34 ♦ Sayı/Issue 2 ♦ 2023**

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

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

Türkçe ve İngilizce / *Turkish and English*

ISSN 1016-3573 • e-ISSN 2717-8099

---

**Sahibi / Owner**

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

Uzm. İsmail AYDIN

Enstitü Müdürü / *Director*

**Yayın Kurulu / Publication Board**

**Sorumlu Yazı İşleri Müdürü / Managing Editor**

Dr. Özlem ŞAHAN YAPICIER, Türkiye

**Yardımcı Editörler / Associate Editor**

Dr. Erdem DANYER, Türkiye

Dr. Sabri HACIOĞLU, Türkiye

Dr. Selçuk PEKKAYA, Türkiye

Dr. Özlem ŞAHAN YAPICIER, Türkiye

**Dil Editörleri / Copy Editors**

Deniz ACUN YILDIZ, Türkiye

Yusuf Ziya KAPLAN, Türkiye

Tuğba Buket MERMER, Türkiye

Adem TUFAN, Türkiye

Dr. Yeliz YIKILMAZ, Türkiye

**Bilimsel Kurul\* / Editorial Board**

Dr. Neslihan AKBULUT TOSUN, Türkiye

Dr. Mihriban Hatun AKSOY, Türkiye

Dr. Ayşin BAŞSATAN YORULMAZ, Türkiye

Dr. Ayşe DEMİRHAN, Türkiye

Orhan DUDAKLI, Türkiye

Ekrem ERDOĞAN, Türkiye

Dr. Ali ERKURT, Türkiye

Dr. Özden KABAKLI, Türkiye

Dr. Özlem KARDOĞAN, Türkiye

Dr. İpek KESKİN, Türkiye

Dr. Bahadır KILINÇ, Türkiye

Dr. Çağla KORKMAZ, Türkiye

Dr. Yeliz KÖKSAL, Türkiye

Adnan ÖZTÜRK, Türkiye

Dr. Halil PİR, Türkiye

Dr. Zeynep ŞIK, Türkiye

Uzm. Erdal TURHAN, Türkiye

Dr. Yavuz ULUSOY, Türkiye

Dr. Gülşah UYUNMAZ SAKLI, Türkiye

Bora ÜNDAR, Türkiye

Büşra YAZICI KÜÇÜK, Türkiye

Kemal ZENGİN, Türkiye

**Danışma Kurulu / Advisory Board**

Ersan AĞTÜRK, ŞAP(F&M disease) Ins., Türkiye

Dr. Bülent AKSAKAL, Vet. Cont. Cent. Res. Ins., Türkiye

Dr. Eylem Emek AKYÜREK, University of Padova, Italy

Dr. Ayşe ATEŞOĞLU, Pendik Vet. Cont. Inst., Türkiye

Dr. Işıl AYTEMİZ DANYER, University of Padova, Italy

Dr. Martin BACHMANN, Martin Luther Uni., Germany

Prof. Dr. Tanay BİLAL, Istanbul Uni., Türkiye

Doç. Dr. Abdurrahman Anıl ÇAĞIRAN, Bornova Vet. Cont. Inst., Türkiye

Dr. Erdim Ozan ÇAKIR, Pendik Vet. Cont. Inst., Türkiye

Dr. Elvin ÇALIŞKAN, Vet. Cont. Cent. Res. Ins., Türkiye

Dr. Öğretim Üyesi G. Ülke ÇALIŞKAN, Kastamonu Üni. Türkiye

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

Doç. Dr. Dilek DÜLGER, Karabük Üni. Türkiye

Dr. Seda EKİCİ, Vet. Cont. Cent. Res. Ins., Türkiye

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

Dr. Yasemin ERDOĞAN, Erzurum Vet. Cont. Inst., Türkiye

Dr. Öğretim Üyesi Ufuk EROL, Cumhuriyet Üni., Türkiye

Dr. Hande ERPEK, Pendik Vet. Cont. Inst., Türkiye

Prof. Dr. Hüseyin ESECELİ, Bandırma Onyediy Eylül Üni. Türkiye

Dr. Lucrezia FERRETTI, University of Padova, Italy

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

Doç. Dr. Elçin GÜNAYDIN, Kastamonu Üni., Türkiye

Prof. Dr. Tolga GÜVENÇ, Ondokuz Mayıs Üni., Türkiye

Prof. Dr. Murat GÜZEL, Ondokuz Mayıs Üni., Türkiye

Dr. Bünyamin İREHAN, Harran Üni., Türkiye

Dr. Günel İSMAİLOVA, Independent Consultant, Italy

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

Mehmet KARAKAYA, ŞAP(F&M disease) Ins., Türkiye

Doç. Dr. İlke KARAYEL HACIOĞLU, Ankara Üni., Türkiye

Dr. Mustafa KARS, Adana Vet. Cont. Inst., Türkiye

Next ...

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

E-posta / e-mail: etlikdergi@tarimorman.gov.tr

İnternet adresi ve Arşiv / Web Site and Archive: <https://vetkontrol.tarimorman.gov.tr/merkez> • <https://dergipark.org.tr/pub/evmd>

**Danışma Kurulu\* / Advisory Board** (...continued)

Dr. Selma KAYA, Samsun Vet. Cont. Inst., Türkiye  
 Dr. Deniz KILIÇOĞLU, Cont. Cent. Res. Ins., Türkiye  
 Dr. Muhsin MUTLU, Elazığ Vet. Cont. Inst., Türkiye  
 Doç. Dr. Emre OZAN, Ondokuz Mayıs Uni., Türkiye  
 Dr. Öğretim Üyesi Ediz Kağan ÖZGEN, Atatürk Üni. Türkiye  
 Doç. Dr. Ahu PAKDEMİRLİ, Sağlık Bilimleri Üni. Türkiye  
 Dr. Elif Karadeniz PÜTÜR, Erzurum Vet. Cont. Inst., Türkiye  
 Dr. Fahriye SARAC, Bornova Vet. Cont. Inst., Türkiye  
 Dr. Esra SATIR, Pendik Vet. Cont. Inst., Türkiye

Dr. Gülnur SERDAR, Samsun Vet. Cont. Inst., Türkiye  
 Dr. Sedat SEVİN, University of Andong National, South Korea  
 Dr. Osman SEZER, Adana Vet. Cont. Inst., Türkiye  
 Mehmet Ali SÖZMEN, Adana Vet. Cont. Inst., Türkiye  
 Dr. Zeynep ŞIK, Etlik Vet. Cont. Cent. Res. Ins., Türkiye  
 Dr. Özhan TÜRKYILMAZ, Bornova Vet. Cont. Inst., Türkiye  
 Prof. Dr. Armağan Erdem ÜTÜK, Çukurova Uni., Türkiye  
 Prof. Dr. Ender YARSAN, Ankara Üni., Türkiye  
 Prof. Dr. Yeliz YILDIRIM, Erciyes Uni., Türkiye  
 Doç. Dr. Nuray Gamze YÖRÜK, Dokuz Eylül Üni., Türkiye

**Hakem Listesi\* / Reviewer List:**

Dr. Öğr. Görevlisi Kadir AKAR	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fak. Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Dr. Öğr. Görevlisi Gökhan AKÇAKAVAK	Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fak. Patoloji AD. Türkiye
Dr. Öğr. Görevlisi Tuğçe ANTEPLOĞLU	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fak. Patoloji AD. Türkiye
Prof. Dr. Zeki ARAS	Aksaray Üniversitesi Veteriner Fak. Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Prof. Dr. Ahmet AYDOĞAN	Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fak. Patoloji AD. Türkiye
Prof. Dr. Yıldırım BAŞBUGAN	Yüzüncüyıl Üniversitesi Veteriner Fak. İç Hastalıklar AD.
Prof. Dr. Pınar COŞKUN	Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fak. Biyokimya AD. Türkiye
Prof. Dr. Miyase ÇINAR	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fak. Biyokimya AD. Türkiye
Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ	Fırat Üniversitesi Veteriner Fak. Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları AD. Türkiye
Dr. Öğr. Gör. Sibel DANIŞAN	Eskişehir Osman Gazi Üniversitesi Mahmudiye Atçılık Meslek Yüksekokulu, Türkiye
Dr. Öğr. Gör. Muhammet Bahaeddin DÖRTBUDAK	Harran Üniversitesi Veteriner Fak. Patoloji AD. Türkiye
Dr. Öğr. Gör. Selda DURAN YELKEN	Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fak. Viroloji AD. Türkiye
Prof. Dr. Armağan ERDEM ÜTÜK	Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fak. Parazitoloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Hüseyin Serkan EROL	Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fak. Biyokimya AD. Türkiye
Dr. Araş. Gör. Emre Sunay GEBEŞ	Ankara Üniversitesi Veteriner Fak. Hayvan Besleme ve Beslenme AD. Türkiye
Doç. Dr. Gülşen GONCAGÜL	Bursa Uludağ Üniv.-Mennan Pasınlı Atçılık MYO, Bitk. Ve Hayv. Üretim, Atçılık Ve Antr. Türkiye
Dr. Öğr. Gör. Özlem GÜCÜYENER HACAN	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fak. Zootekni AD. Türkiye
Doç. Dr. Hıdır GÜMÜŞ	Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniv. Veteriner Fak. Hayvan Besleme ve Beslenme AD. Türkiye
Doç. Dr. Elçin GÜNAYDIN	Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fak. Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Dr. Murat KAPLAN	Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, Müdürlüğü. Viroloji Laboratuvarı, Türkiye
Dr. Öğr. Gör. Özhan KARATAŞ	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fak. Patoloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Sibel KIZIL	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fak. Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Bahattin Taylan KOÇ	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fak. Viroloji AD. Türkiye
Dr. Öğr. Gör. Onur KÖSE	Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fak. Parazitoloji AD. Türkiye
Doç. Dr. İnci Başak MÜŞTAK	Ankara Üniversitesi Veteriner Fak. Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Doç. Dr. Emre OZAN	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fak. Veteriner Hekimliği Temel Bil. Böl., Lab. Hayv. AD. Türkiye
Prof. Dr. Dilek ÖZTÜRK	Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fak. Mikrobiyoloji AD. Türkiye
Dr. Öğr. Gör. Meryem ŞENTÜRK	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fak. Biyokimya AD. Türkiye
Doç. Dr. Hakan TAVŞANLI	Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fak. Halk Sağlığı AD. Türkiye
Doç. Dr. Bilge Kaan TEKELİOĞLU	Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fak. Viroloji AD. Türkiye

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

Editör olarak bu sayıya katkılarından dolayı Dr. Özlem KARDOĞAN'a teşekkürlerimizi sunarız.

ULAKBİM Yaşam Bilimleri, Türkiye Atıf Dizini, EBSCO, CAB Abstracts, AGRIS, Academindex gibi ulusal ve uluslararası veri tabanları kapsamında dizinlenen DergiPark'da ücretsiz olarak açık erişimi bulunan, "en az çift kör hakemli" bir dergidir.

Yazım kuralları ve HYPERLINK "<https://dergipark.org.tr/tr/pub/evmd/indexes>" derginin indekslendiği güncel veri tabanları hakkında bilgiye internet sitesinden ulaşabilirsiniz.

*Journal of Etlik Veterinary Microbiology is a free-open access journal, that evaluated by at least double-blind reviewers; indexing in the scope of national and international databases like, ULAKBİM life sciences, Turkish citation index, CAB abstracts, Academindex and published on DergiPark system. "https://dergipark.org.tr/tr/pub/evmd/indexes" You can find more information about instruction for authors and the updated databases in which the journal is indexed, from the journal website.*

Copyright © Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2023, Her hakkı saklıdır. / All rights reserved.

Basım Tarihi / Publishing Date: Aralık / December 2023, Baskı adedi / Circulation: 500 : online olarak yayımlanmaktadır.

Tasarım ve Baskı / Designed and Pressed by



Medisan Yayinevi Ltd.Şti.

Çankırı Cad. 45 / 347 Ulus - Ankara, Türkiye Tel : +90 312 311 24 26 – 311 00 57 medisan yayinevi@gmail.com

## İçindekiler / Contents

### Original Article / Özgün Araştırma

#### **Diagnosis of *Mycoplasma* spp., *Streptococcus* spp., *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella* spp., by real-time PCR and pathological methods in dogs with bronchopneumonia**

Bronkopnömonili köpeklerde *Mycoplasma* spp., *Streptococcus* spp., *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella* spp.'nin Real-time PCR ve patolojik yöntemler ile teşhisi

Gökhan Akçakavak, Nevin Tuzcu, Özgür Özdemir, Mehmet Tuzcu, Osman Dağar, Ayşenur Tural, Fatih Mehmet Öztürk, Zeynep Çelik, Nida Sönmezler, Mehmet Halit Atik, Özgür Kanat ..... 129

#### **Detection of bacterial and fungal agents in the skin of various domestic animals**

Farklı evcil hayvanların derisindeki bakteri ve mantar etkenlerinin tespiti

Seyide Sarıçam İnce, Ebru Torun ..... 139

#### **Resistance to antimicrobials of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from turkeys in a slaughterhouse**

Bir mezbahada hindilerden izole edilen *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli*'nin antimikrobiallere direnci

Özlem Kardoğan, İnci Başak Müştak ..... 146

#### **Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in shelter cats in Erzurum province of Türkiye**

Türkiye'nin Erzurum ilinde barınak kedilerinde *Toxoplasma gondii* enfeksiyonu için seroprevalans ve risk faktörleri

Başak Hanedan, Cahit Babür, Muhammed Sertaç Eroğlu, Selin Sinem Sümbül, Ömer Alkan ..... 151

#### **Microbiological quality of some artisanal Italian cheeses retailed in the Turkish market**

Türkiye'de perakende olarak satışa sunulan bazı el yapımı İtalyan peynirlerinin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi

Tahsin Onur Kevenk, Ahmet Koluman ..... 156

#### **Effects of night lighting with red light on melatonin and milk quality parameters in holstein cows**

Holştayn ineklerde kırmızı ışıkla gece aydınlatmasının melatonin ve süt kalite parametrelerine etkileri

Rukiye Garip, Nuri Başpınar, Beyza Suvarıklı Alan, Mustafa Garip, Pınar Coşkun, Emre Arslan ..... 161

#### ***Silybum marianum*'un broyler böbreğinde methomyl hasarına karşı etkilerinin patolojik ve biyokimyasal olarak araştırılması**

Pathological and biochemical investigation of the effects of *Silybum marianum* against methomyl damage in broiler kidney

Bahadır Kılınç, Ertan Oruç ..... 174

**Broyler rasyonlarında prebiyotik ve organik asit kullanımının performans ve bazı kan parametreleri üzerine etkilerinin belirlenmesi**

Determination of the effects of prebiotic and organic acid use on performance and some blood parameters in broiler rations

Mustafa Coşar, Mehmet Akif Karşlı ..... 182

**Kanatlılarda kronik solunum yolu hastalığının (CRD) serolojik tanısı için in-House Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA) geliştirilmesi**

Preparation of in House Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for serologic diagnosis of chronic respiratory disease (CRD) in poultry

Sevil Erdenliğ Gürbilek, Ayfer Güllü Yüceetepe, Ahmet Murat Saytekin, Oktay Keskin, Osman Yaşar Tel..... 198

**Case Report / Olgu Sunumu**

---

**Multietiological abortion due to *Brucella melitensis* and *Chlamydia abortus* in a sheep fetus**

Bir koyun fetusunda *Brucella melitensis* ve *Chlamydia abortus* nedeniyle oluşan multietiyolojik abort

İbrahim Deniz, Ertan Oruç ..... 205

**Derleme / Review Article**

---

**Yarasa kaynaklı zoonotik viruslar**

Bat-borne zoonotic viruses

Müge Fırat..... 211



## Diagnosis of *Mycoplasma* spp., *Streptococcus* spp., *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella* spp., by real-time PCR and pathological methods in dogs with bronchopneumonia

Gökhan Akçakavak<sup>1\*</sup>, Nevin Tuzcu<sup>2</sup>, Özgür Özdemir<sup>3</sup>, Mehmet Tuzcu<sup>4</sup>, Osman Dağar<sup>5</sup>,  
Ayşenur Tural<sup>6</sup>, Fatih Mehmet Öztürk<sup>7</sup>, Zeynep Çelik<sup>8</sup>, Nida Sönmezler<sup>9</sup>,  
Mehmet Halit Atik<sup>10</sup>, Özgür Kanat<sup>11</sup>

<sup>1</sup> Yozgat Bozok University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Yozgat, Türkiye

<sup>2</sup> Selcuk University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Konya, Türkiye

<sup>3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10</sup> Selcuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Konya, Türkiye

<sup>11</sup> Necmettin Erbakan University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Ereğli, Konya, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 04.09.2023, Kabul Tarihi / Accepted: 21.09.2023

**Abstract:** There are many bacterial agents that cause respiratory diseases in dogs. Bacterial bronchopneumonia is a lung disease caused by bacteria in the lower respiratory tract and lung parenchyma. In this study, it was aimed to determine *Mycoplasma* spp., *Streptococcus* spp., *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella* spp., in dogs with bronchopneumonia by Real-time PCR and to compare the histopathological findings determined according to the agents. The material of the study was paraffin blocks of lung tissue taken from 37 dogs that died for different reasons and were diagnosed with bronchopneumonia during microscopic examination. Microscopically, edema in the alveolar lumens, shedding of the alveolar epithelium, shedding of the bronch and bronchial epithelium and bronchiectasis, mononuclear cell infiltration (MCI) and Polymorphonuclear leukocytes (PMNL) infiltration in the bronchial lumens, peribronchiolar MCI infiltration, Bacterial clusters localized to the bronch epithelium, PMNL infiltration in the interstitium, multifocal necrosis areas, bleeding and pleuritis were observed. Real-time PCR analysis revealed *Bordetella bronchiseptica* in 18 (48.64%) cases, *Mycoplasma* spp. in 9 (24.32%) cases, *Streptococcus* spp. in 10 (27.02%) cases, and *Klebsiella* spp. in 2 (5.4%) cases. In conclusion, this study showed that the causative agent can be determined in bacterial bronchopneumonias of dogs with Real-time PCR even in tissues without culture opportunity. In addition, this study indicates that polymicrobial lower respiratory tract infections can also be seen in dogs and reveals that more than one bacterial species should be investigated for diagnosis.

**Keywords:** Bronchopneumonia, Dog, Pathology, Real-time PCR

### Bronkopnömonili köpeklerde *Mycoplasma* spp., *Streptococcus* spp., *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella* spp. 'nin Real-time PCR ve patolojik yöntemler ile teşhisi

**Özet:** Köpeklerde solunum yolu hastalıklarına sebep olan çok sayıda bakteriyel etken vardır. Bakteriyel bronkopnömoni, alt solunum yollarında ve akciğer parankiminde bakterilerin neden olduğu akciğer hastalığıdır. Bu çalışmada bronkopnömonili köpeklerde *Mycoplasma* spp., *Streptococcus* spp., *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella* spp.'nin Real-time PCR ile belirlenmesi ve etkenlere göre belirlenen histopatolojik bulguların karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın materyalini farklı sebeplerden dolayı ölen ve mikroskopik muayenede bronkopnömoni belirlenen 37 adet köpekten alınan akciğer dokusuna ait parafin bloklar oluşturdu. Mikroskopik olarak alveol lümenlerinde ödem, alveol epitellerinde dökülme, bronş ve bronşiol epitellerinde dökülme ve bronşektazi, bronşiol lümenlerinde mononükleer hücre (MNH) ve Polimorfonükleer lökosit (PMNL) infiltrasyonu, peribronşiyoler MNH infiltrasyonu, bronş epitellerine lokalize olmuş bakteri kümeleri, intersitisyumda PMNL infiltrasyonu, multifokal nekroz alanları, kanama ve plöritis rastlandı. Real-time PCR incelemesinde 18 (%48.64) olguda *Bordetella bronchiseptica*, 9 (%24.32) olguda *Mycoplasma* spp., 10 (%27.02) olguda *Streptococcus* spp., 2 (%5.4) olguda *Klebsiella* spp. saptandı. Sonuç olarak bu çalışma, Real-time PCR ile köpeklerin bakteriyel bronkopnömonilerinde kültür imkânı olmayan dokularda bile etkenin belirlenebileceğini göstermiştir. Ayrıca köpeklerde polimikrobiyal alt solunum yolu enfeksiyonlarının da görülebileceğine işaret ederek teşhis için birden fazla bakteri türünün araştırılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Bronkopnömoni, Köpek, Patoloji, Real-time PCR

**Yazışma adresi / Correspondence:** Gökhan Akçakavak, Yozgat Bozok University Faculty of Veterinary Medicine, Sorgun, Yozgat  
e-mail: [gokhan.akcakavak@bozok.edu.tr](mailto:gokhan.akcakavak@bozok.edu.tr)

**ORCID IDs of the authors:** <sup>1</sup>0000-0001-5949-4752 • <sup>2</sup>0000-0002-1017-718X • <sup>3</sup>0000-0002-1595-0557 • <sup>4</sup>0000-0003-3118-1054  
• <sup>5</sup>0000-0003-2209-7512 • <sup>6</sup>0000-0003-1585-3359 • <sup>7</sup>0000-0001-9015-3649 • <sup>8</sup>0000-0002-9667-5728 • <sup>9</sup>0000-0002-2397-5092 •  
<sup>10</sup>0009-0008-7016-0436 • <sup>11</sup>0000-0002-9747-5496



## Introduction

There are many bacterial agents that cause respiratory diseases in dogs. Bacterial bronchopneumonia is a lung disease caused by bacteria in the lower respiratory tract and lung parenchyma (Proulx et al., 2014). Bacterial bronchopneumonia is among the most commonly diagnosed diseases in dogs with acute or chronic respiratory disease. Young animals are particularly susceptible to the development of bacterial pneumonia due to their sensitive immune systems. Chemotherapy and immunosuppressive drugs also increase the risk of bacterial pneumonia (Dear, 2020).

Mycoplasmas, belonging to the class *Mollicutes*, are the smallest free-living microorganisms capable of self-replication. In addition, they are difficult to grow in microbiological culture media and grow slowly. Most mycoplasma species are important pathogens for animals and cause diseases such as pneumonia, conjunctivitis, arthritis and mastitis (McAuliffe et al., 2003). Mycoplasmas are thought to be part of the normal bacterial flora found in the upper respiratory tract of dogs (Rosendal, 1982). From dogs with respiratory tract disease, *Mycoplasma bovis*, *M. canis*, *M. cynos*, *M. edwardii*, *M. feliminutum*, *M. gateae* and *M. spumans* were isolated (Armstrong et al., 1972; Rosendal, 1978).

Streptococcus species are gram-positive cocci that often appear in pairs or chains on cytological preparations and histological sections (Facklam, 2002). In general,  $\alpha$ -hemolytic and  $\gamma$ -hemolytic streptococci are normally found in the upper respiratory tract, intestine, lower urinary tract, and genital tract. Typically,  $\beta$ -hemolytic Streptococcus species are pathogenic (Quinn et al., 1999; Lamm et al., 2010). Streptococcus infection in dogs has been associated with abortion, pneumonia, septicemia, endocarditis, lower urinary tract infections, arthritis and meningoencephalitis (Vaissaire et al., 1991; Radaelli and Platt 2002; Seguin et al., 2003; O'Neill et al., 2006; Sykes et al., 2006; Pesavento et al., 2008). Pulmonary Streptococcus infection presents as bronchopneumonia or hemorrhagic form (Chalker et al., 2003; Buonavoglia and Martella 2007, Kim et al., 2007; Pesavento et al., 2008).

*Bordetella bronchiseptica* is a gram negative, non-spore, pleomorphic and aerobic coccobacillus that causes infectious respiratory disease syndrome or kennel cough disease in dogs (Ford, 2006). Canine infectious tracheobronchitis, caused by *Bordetella bronchiseptica*, is a highly contagious respiratory disease that affects dogs of all ages. *Bordetella*

*bronchiseptica* can cause tracheobronchitis alone as well as with canine parainfluenza virus or canine adenovirus. In puppies, death occurs due to severe disease (Ellis et al., 2001; Taha-Abdelaziz et al., 2016). In *Bordetella bronchiseptica* infections, macroscopically, the lesions are usually in the cranial and middle lung lobes. There may be leakage of foamy, mucoid or purulent contents in the trachea and bronchi. Histologically, cilia-associated *Bordetella bronchiseptica* localizes to the bronchi and is rarely found in medium or large bronchioles. Cilia-associated bacteria appear on the apical surface of the bronchial epithelium as short bacilli that mingle with or obscure the cilia. Basophilic staining of agent creates a contrasting appearance with eosinophilic cilia (Taha-Abdelaziz et al., 2016).

*Klebsiella pneumoniae*, belonging to the Enterobacteriaceae family, is a bacterium commonly found in the gastrointestinal tract of healthy humans and animals (Ulstaad et al., 2016; Marques et al., 2019). *Klebsiella pneumoniae* colonizes the mucosal surfaces of mammals and can also be found in the environment in shallow water, food, and soil (Jouini et al., 2015; Ulstaad et al., 2016; Navon-Venezia et al., 2017). In pets, *Klebsiella* spp. can cause serious infections such as respiratory and urinary tract infections. *Klebsiella pneumoniae* has been isolated from many canine infections and causes pyometra, cystitis, prostatitis, pneumonia, meningoencephalitis, enteritis, mastitis, neonatal septicemia, hepatic abscesses, and otitis externa (Songer and Post 2004).

Today, the incidence of bacterial bronchopneumonia in pet animals is increasing day by day and regional studies are carried out to determine the etiological agent. In this study, it was aimed to determine *Mycoplasma* spp., *Streptococcus* spp., *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella* spp. in dogs with bronchopneumonia by Real-time PCR and to compare the histopathological findings determined according to the agents.

## Materials and Methods

### Animal material and microscopic examination

The material of the study consisted of paraffin blocks of the lungs, which were taken from 37 dogs that died due to different reasons and were brought to Selçuk University Faculty of Veterinary Medicine Department of Pathology for pathological diagnosis, and bronchopneumonia was detected in microscopic examination. From the lung samples taken, 17 of the dogs with bronchopneumonia determined microscopically belonged to male and 20 of them

belonged to female dogs. It was determined that 19 of these lungs belonged to dogs less than one year old, eight of them were between one and five years old, and ten of them belonged to dogs older than five years. Of the dogs examined in the study, 22 were shelter dogs, 10 were stray dogs brought by municipal authorities or animal lovers, and five were owned dogs.

Lung samples were fixed in neutral formaldehyde for 24-48 hours, and then routine tissue follow-up was performed. Afterwards, paraffin was embedded and paraffin blocks were obtained. 5 µm sections were taken from paraffin blocks to slides and stained with Hematoxylin-Eosin (H-E). In addition, sections taken from paraffin blocks on slides were stained with MacCallum Goodpasteur (MCG) staining method (Luna, 1968). Sections were viewed under a light microscope (Olympus BX51, Tokyo, Japan) and photographed (Olympus EP50, Tokyo, Japan).

### Real-time PCR Analysis

For DNA isolation, 3-5 sections of 5 µm thickness were taken from paraffin blocks to slides. The sections taken were placed in a chalet with xylene added and the tissues were immersed in xylene, and they were kept in an oven at 55 °C for one hour and the paraffin was melted. Tissues were scraped from the slide and taken into Eppendorf tubes. Eppendorf tubes were vortexed by adding 96% ethanol, and then centrifuged and the supernatant was discarded. Eppendorf tubes were kept in an oven at 37°C for 10 minutes to completely remove the alcohol from the tissues. DNA isolation from paraffin blocks was performed using the commercial isolation kit (QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit, Cat. No: 56404) according to the manufacturer's instructions. Isolated DNAs were stored at -20°C for use in Real-time PCR analysis. DNA copies of *Mycoplasma* spp., *Streptococcus* spp., *Bordetella bronchiseptica* and *Klebsiella* spp. were searched with the QIAGEN Rotor Gene Q Real-time PCR device, using the primers prepared by a private company in accordance with the manufacturer's instructions. Deionized water was used as negative control. Primer sequences used in Real-time PCR analysis are given in Table 1.

**Table 1.** Primer sequences used in the study

SPECIES	PRIMARY SEQUENCES	
<i>Mycoplasma</i> spp.	F: 5'-GGTACAAAGAGACGCAATA-3' R: 5'-GCGATTACTAGCGATTCC-3'	(Hulse et al., 2018)
<i>Streptococcus</i> spp.	F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' R: 5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3'	(Greisen et al., 1994)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	F: 5'-CCCCGCACATTCCGAACCTTC-3' R: 5'-AGGCTCCCAAGAGAGAAAGGCTT-3'	(Schulz et al., 2014)
<i>Klebsiella</i> spp.	F: 5'-GGTGCTCTTTACATCATTGC-3' R: 5'-GCA ATG GCC ATT TGC GTT AG-3'	(Aher et al., 2012)

F: Forward, R: Reverse

## Results

The agents amplified by Real-time PCR from the lungs with bronchopneumonia microscopically and the determination of these agents according to age and gender are given in Table 2.

Although bronchopneumonia was determined microscopically in the analyses performed with Real-time PCR, amplification could not be obtained with the primers used in five lung tissues.

The agent with the lowest Cycle Threshold (CT) value was accepted as the agent causing broncho-

pneumonia in dogs whose amplification was determined with primer sequences belonging to more than one agent in Real-time PCR analysis. The gram staining results of the samples prepared from paraffin blocks of the lungs in which bronchopneumonia was detected, and DNA copies of *Mycoplasma* spp., *Streptococcus* spp., *Bordetella bronchiseptica* and *Klebsiella* spp. in these tissues by Real-time PCR, and CT values are given in Table 3.

The macroscopic findings in the records of the lungs examined in the study are given in Table 4.

**Table 2.** Determination of *Mycoplasma* spp., *Streptococcus* spp., *Bordetella bronchiseptica* and *Klebsiella* spp. in lung tissues with bronchopneumonia by Real-time PCR according to age and gender

SPECIES	N (37)	MALE	FEMALE	< 1 AGE	1-5 YAŞ AGE	> 5 AGE
<i>Mycoplasma</i> spp.	5	2	3	–	1	4
<i>Streptococcus</i> spp.	5	4	1	1	2	2
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	13	5	8	6	4	3
<i>Klebsiella</i> spp.	2	–	2	2	–	–
<i>Mycoplasma</i> spp. +	2	1	1	2	–	–
<i>Streptococcus</i> spp. +	2	1	1	2	–	–
<i>Bordetella bronchiseptica</i> +	3	2	1	3	–	–
<i>Streptococcus</i> spp. +	3	2	1	3	–	–
Samples for which no agents were isolated by Real-time PCR	5	2	3	3	1	1

**Table 3.** Gram staining results of samples prepared from paraffin blocks of lungs with bronchopneumonia, detection of DNA copies of *Mycoplasma* spp., *Streptococcus* spp., *Bordetella bronchiseptica* and *Klebsiella* spp. in these tissues by Real-time PCR and CT values.

NO	GRAM STAIN	CT VALUES DETERMINED BY REAL-TIME PCR			
		<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Klebsiella</i> spp.
1	Gram Negative			26	
2*	–				
3	–	29			
4	Gram Negative			30	
5	–		27		
6	–	31			
7	–				28
8	Gram Negative			32	
9	Gram Negative			28	
10	–		33		
11	Gram Negative			27	
12	–	30	35		
13	–			33	
14*	–				
15	–			34	
16	–			30	
17	–			32	
18	–	33			
19	Gram Negative		31	28	
20	Gram Positive		28		
21	–	28		30	
22	Gram Negative			29	

NO	GRAM STAIN	CT VALUES DETERMINED BY REAL-TIME PCR			
		<i>Mycoplasma spp.</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Klebsiella spp.</i>
23	–			27	
24	Gram Negative	31		27	
25	–			30	
26	–		34	29	
27	–	34			
28*	–				
29	–		32		
30	–		34		
31	–	29	34		
32*	–				
33	Gram Negative		30	28	
34	–	35			
35*	–				
36	–				26
37	Gram Negative			32	
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>18</b>	<b>2</b>

\*Samples whose amplification could not be determined by the primers used in the study

**Table 4.** Macroscopic findings in the records of lungs with bronchopneumonia

MACROSCOPIC FINDINGS	SPECIES			
	<i>Mycoplasma spp.</i> *	<i>Streptococcus spp.</i> *	<i>Bordetella bronchiseptica</i> *	<i>Klebsiella spp.</i>
Red-colored, sunken, viscous areas	8/8	4/5	17/17	2/2
The cross-sectional is flooded and moist	8/8	2/5	17/17	1/2
Foamy content in the trachea and bronchi	7/8	2/5	17/17	1/2
Bleeding areas	3/8	5/5	6/17	–
Fluid in the chest cavity	2/8	4/5	10/17	1/2

\* The agent with a lower CT value in polymicrobial cases was accepted as the agent causing bronchopneumonia.

Microscopically, mononuclear cell infiltration (MCI), epithelial shedding (Figure 1-A) and bronchiectasis were observed in the bronchi, bronchioles and alveolar lumens in seven of the lungs with *Mycoplasma* spp. In seven of these lungs, MCI located around the bronchi and bronchioles were noted. Pleuritis was detected in all of the lungs. Polymorphonuclear leukocyte (PMNL) infiltration, multifocal necrosis and bleeding areas were detected in one dog. Bacterial clusters were not found in the microscopic examinations of the lungs with *Mycoplasma* spp.

Microscopically, PMNL infiltration was observed in the lumen of the bronchi, bronchioles and the interstitium of the lung in all *Bordetella bronchiseptica* positive lungs. In addition, shedding was observed in the bronchi, bronchioles and alveolar epithelium. In ten of these lungs, edema in the alveoli (Figure 1-B), areas of multifocal necrosis scattered in the lung parenchyma, pleuritis and bacterial clusters localized to the bronchial and bronchiole epithelium (Figure 1-C) were noted. MCI in four dogs and bleeding areas in three dogs were determined.

Bleeding areas and hyperemia (Figure 1-D) were seen microscopically in the lungs with *Streptococcus* spp. In four of these lungs, the lumen of the bronchi and bronchioles was found to be filled with exudate mostly composed of neutrophils and erythrocytes. In addition, shedding was detected in the bronchi and bronchiole epithelium. Multifocal areas of necrosis, MCI, and pleuritis were detected in one dog, scattered throughout the lung parenchyma. In addition, coccoid bacteria clusters localized to the periphery of necrosis areas were noted in this sample.

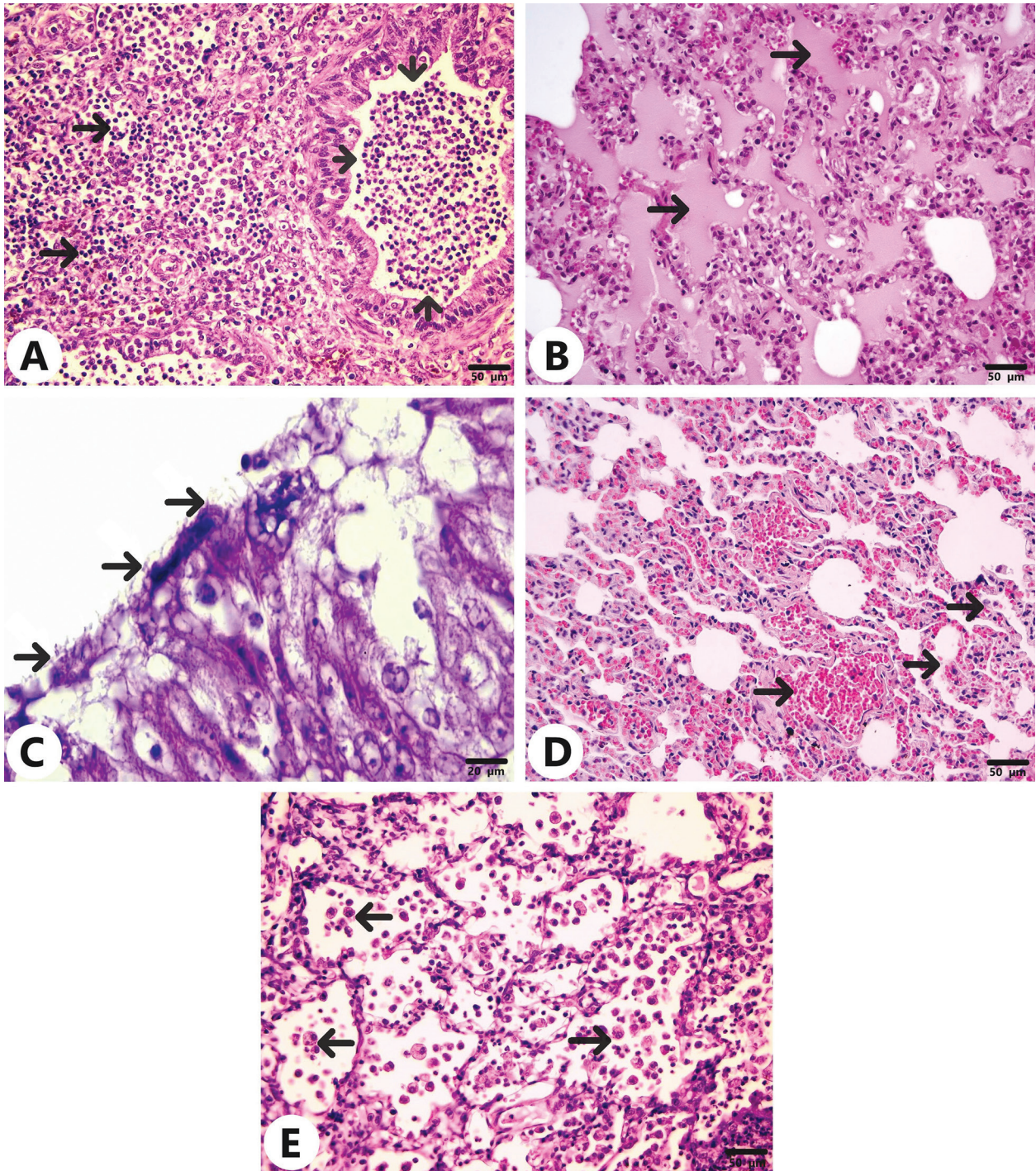
In two dogs with *Klebsiella* spp., PMNL infiltration and shedding of bronchial, bronchiole and alveolar epithelium were observed microscopically in the bronchi and bronchiole lumens and the interstitium of the lung (Figure 1-E). In one of these dogs, areas of multifocal necrosis scattered throughout the lung parenchyma were detected.

Microscopic findings in the lungs according to the agents determined by Real-time PCR in the study are given in Table 5.

**Table 5.** Microscopic findings in the lungs according to the agents determined by Real-time PCR in the study

MICROSCOPIC FINDINGS	SPECIES			
	<i>Mycoplasma</i> spp. *	<i>Streptococcus</i> spp. *	<i>Bordetella bronchiseptica</i> *	<i>Klebsiella</i> spp.
PMNL infiltration in bronchiole lumens	1/8	4/5	17/17	2/2
MCI in bronchiole lumens	7/8	1/5	4/17	–
Bronchial and bronchiolar epithelial shedding and bronchiectasis	7/8	4/5	17/17	2/2
Edema in alveolar lumens	3/8	3/5	10/17	–
Shedding of alveolar epithelium	7/8	4/5	17/17	2/2
PMNL infiltration in the interstitium	1/8	4/5	17/17	2/2
Peribronchiolar MCI infiltration	7/8	1/5	4/17	–
Multifocal areas of necrosis	1/8	1/5	10/17	1/2
Bleeding	1/8	5/5	3/17	–
Pleuritis	8/8	1/5	10/17	–
Clusters of bacteria localized to the bronchial epithelium	–	1/5	10/17	–

\* The agent with a lower CT value in polymicrobial cases was accepted as the agent causing bronchopneumonia.



**Figure 1.** Histopathological findings. **A:** Epithelial shedding with mononuclear cell infiltration in the bronchiole (arrowheads) and alveolar lumens (arrows) in the lung determined as *Mycoplasma* spp., by Real-time PCR, x400, H-E, **B:** Alveolar edema (arrows) in the lung determined by *Bordetella bronchiseptica*, x400, H-E, **C:** Bacterial clusters (arrows) localized to bronchial epithelium in the lung, x1000, MCG, **D:** Bleeding and hyperemia areas (arrows) in the lung determined by *Streptococcus* spp., x400, H-E, **E:** Shedding of alveolar epithelium and alveolar macrophages (arrows) in the lung determined by *Klebsiella* spp., x400, H-E.

## Discussion and Conclusion

Bronchopneumonia seen in dogs is one of the important diseases encountered in the clinic and bacterial-based infectious agents have an important place among the causes of bronchopneumonia. With this study, the role of *Mycoplasma* spp., *Streptococcus* spp., *Bordetella bronchiseptica* and *Klebsiella* spp. in bacterial bronchopneumonias of dogs in our region was revealed by Real-time PCR and pathological methods.

Diagnosis of bacterial pneumonia in dogs is based on the identification of the agent by bacteriological culture. Culture for aerobic bacteria and *Mycoplasma* spp. is generally not available for diagnosis. Most of the time, contaminations formed during the collection and transport of the samples to the laboratory and the use of empirical antibiotics reduce the success of the culture method. In these cases, methods based on amplification of the genomic DNA of the bacteria are an important option to determine the appropriate antimicrobial therapy.

In recent years, Real-time PCR has become an important diagnostic method in the field of veterinary medicine due to its rapid results, ability to detect microorganisms such as *Mycoplasma* spp., which are difficult to detect with conventional methods, and high sensitivity (Yoldaş et al., 2009; Tuzcu et al., 2012; Tuzcu et al., 2021; Tuzcu et al., 2022; Akçakavak et al., 2023; Tuzcu et al., 2023). In this study, agents such as *Mycoplasma* spp., *Streptococcus* spp., *Bordetella bronchiseptica* and *Klebsiella* spp., which are paraffin blocks of canine lungs with bronchopneumonia, were determined by Real-time PCR and their pathological findings were compared.

Dear (2020), based on literature data in a study in which he examined pneumonia in cats and dogs (Foster et al., 2004; Radhakrishnan et al., 2007; Johnson et al., 2013; Proulx et al., 2014) reported that 22-71% of pneumonias in dogs were associated with *Bordetella bronchiseptica*, 2-25% with *Klebsiella pneumoniae*, 30-70% with *Mycoplasma* spp., and 6-21% with *Streptococcus* spp. Maden et al. (2000) in a study with 31 dogs reported that 24% *Bordetella bronchiseptica*, 4% *Streptococcus* spp. and 4% *Klebsiella* spp. were isolated from the culture of bronchoalveolar lavage fluid. In a study conducted by Sayin et al. (2016) with 196 samples in the Konya region, they reported that *Bordetella bronchiseptica* was isolated at a rate of 48.7% by PCR and standard microbiological methods. In this study, the data we obtained with Real-time PCR was 48.64% for *Bordetella bronchiseptica*, 5.4% for *Klebsiella* spp., 24.32%

for *Mycoplasma* spp., and 27.02% for *Streptococcus* spp. It has been determined that the rates found are similar to the literature data. However, in the study of Maden et al. (2000), the reason for the lower rate of *Streptococcus* spp. isolating from this study may be related to the sampling method.

In adult dogs with respiratory tract infections, polymicrobial infections were detected in seven dogs in this study, as reported in previous studies (Lamm et al., 2010; Dear, 2020). It is a remarkable result that polymicrobial infections with *Streptococcus* spp., *Mycoplasma* spp. and *Bordetella bronchiseptica* were determined in dogs younger than one year old in this study.

Jameson et al. (1995), in their study in which they examined 93 dogs with bacterial pneumonia from which transtracheal aspiration samples were taken, reported that only *Mycoplasma* spp. was isolated in seven dogs according to the *Mycoplasma* spp. culture results, while another bacterium was found together with *Mycoplasma* spp. in 58 dogs. They also reported that the majority of dogs with *Mycoplasma* spp. were older than five years and there was no gender difference in dogs with *Mycoplasma* spp. In this study, *Mycoplasma* spp. was determined in nine dogs and genomic DNAs of *Streptococcus* spp. and *Bordetella bronchiseptica* were amplified as well as *Mycoplasma* spp. in two of these dogs. The majority of dogs identified only with *Mycoplasma* spp. were older than five years, which is similar to the findings of Jameson et al. (1995).

In a study conducted by Kirchner et al. (1990), *Mycoplasma* spp. was isolated in five laboratory dogs that showed clinical signs of respiratory distress, chronic cough and respiratory tract disease and identified macroscopic pneumonia lesion during thoracic surgery. They reported that they detected bronchiectasis, purulent bronchiolitis, bronchial and bronchiolar epithelial hyperplasia and chronic nonsuppurative peribronchiolitis in these dogs histopathologically. In the present study, mononuclear cell infiltration in the lumens of bronchi and bronchioles determined microscopically, shedding and bronchiectasis in the bronchial epithelium, and mononuclear cell infiltrations around the bronchi and bronchioles were detected. Our findings are similar to those reported by Kirchner et al. (1990).

In this study, genomic DNA of *Bordetella bronchiseptica* was amplified in 18 of the lung samples analyzed by Real-time PCR. In only 10 of these cases, bacterial ciliary adhesion was detected histopathologically in the lungs, similar to the literature (Taha-

Abdelaziz et al., 2016). The fact that the genomic DNAs of *Bordetella bronchiseptica* were amplified by Real-time PCR in cases where bacteria could not be detected in the cilia microscopically in this study reveals that the diagnosis should be confirmed by PCR and immunohistochemistry.

In the tissues in which *Bordetella bronchiseptica* was detected, findings such as PMNL infiltration in the bronchi and bronchiole lumens and interstitium of the lung, shedding in the bronchi, bronchioles and alveolar epithelium, edema in the alveoli, multifocal necrosis areas scattered in the lung parenchyma, pleuritis were found to be compatible with the literature (Ellis et al., 2001; Chambers et al., 2019). However, the fact that the severity of the findings determined in each dog is different indicates that it may be related to the immunity of the dogs, their housing patterns and the genetic difference of the agent.

In a retrospective study by Lamm et al. (2010) in which they examined 393 dogs, they associated 24 of the cases with bronchopneumonia with *Streptococcus* infection. In these cases, histopathologically, a large number of neutrophils and bacterial colonies were detected in the lumens of the bronchi, bronchioles and alveoli. They also reported that necrotic cells and fibrin formation were observed with neutrophils in severe cases. In the microscopic examination of the lungs of two dogs with hemorrhagic form, they reported that the alveolar lumens were filled with an exudate mixed with erythrocytes, neutrophils and fibrin. The findings in our study were found to be similar to the literature.

The conclusions of Chambers et al. (2019) that *Bordetella bronchiseptica* may cause secondary infections by causing ciliostasis of respiratory epithelial cells and the finding of *Streptococcus* spp. in three dogs with *Bordetella bronchiseptica* in this study are parallel.

*Klebsiella* spp. is found in the gastrointestinal tract of healthy animals and can cause pneumonia in dogs with low immunity (Roberts et al., 2000; Uls-tad et al., 2016; Marques et al., 2019; Carvalho et al., 2020). In the present study, *Klebsiella* spp. was detected in two dogs less than one year old with bronchopneumonia. This suggests that the age range of *Klebsiella* spp. identified animals may be related to insufficient breast milk intake.

In conclusion, this study showed that the causative agent can be determined in bacterial bronchopneumonias of dogs with Real-time PCR even in tissues without culture opportunity. In addition, this

study indicates that polymicrobial lower respiratory tract infections can also be seen in dogs and reveals that more than one bacterial species should be investigated for diagnosis.

**Ethics committee for the use of experimental animals and other ethical committee decisions and permissions:** Selcuk University Faculty of Veterinary Medicine Experimental Animal Production and Research Center Ethics Committee (SÜVDAMEK) approved the ethical compliance of the study (Approval No: 2023/077).

**Financial support and conflict of interest:** There is no person/organization that financially supports the work and the authors do not have any interest-based relationship.

## References

- Akçakavak G, Tuzcu M, Tuzcu N, Celik Z, Tural A, Dagar O. (2023) Investigation with Real-Time PCR and Histopathology on the presence of *H. felis*, *H. heilmannii* and *H. pylori* in dogs, *Rev Cient.* 33, 1-7.
- Aher T, Roy A, Kumar P. (2012) Molecular detection of virulence genes associated with pathogenicity of *Klebsiella* spp. isolated from the respiratory tract of apparently healthy as well as sick goats. *Isr J Vet Med.* 67, 249-52.
- Armstrong D, Morton V, Friedman M, Steger L, Tully J. (1972) Canine pneumonia associated with mycoplasma infection. *Am J Vet Res.*, 33, 1471-1478.
- Buonavoglia C, Martella V. (2007) Canine respiratory viruses. *Vet res.* 38, 355-73.
- Carvalho I, Alonso CA, Silva V, Pimenta P, Cunha R, Martins C, Igrejas G, Torres C, Poeta P. (2020) Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from healthy and sick dogs in Portugal. *Microb Drug Resist.* 26, 709-715.
- Chalker VJ, Brooks HW, Brownlie J. (2003) The association of *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* with canine infectious respiratory disease. *Vet Microbiol.* 95, 149-156.
- Chambers J, Matsumoto I, Shibahara T, Haritani M, Nakayama H, Uchida K. (2019) An outbreak of fatal *Bordetella bronchiseptica* bronchopneumonia in puppies. *J Comp Pathol.* 167, 41-45.
- Chandler JC, Lappin MR. (2002) Mycoplasmal respiratory infections in small animals: 17 cases (1988–1999). *JAAHA* 38, 111-119.
- Dear JD. (2020) Bacterial pneumonia in dogs and cats: An update. *Veterinary Clinics: J Small Anim Pract.* 50, 447-465.
- Ellis JA, Haines DM, West KH, Burr JH, Dayton A, Townsend HG, Kanara EW, Konoby C, Crichlow A, Martin K. (2001) Effect of vaccination on experimental infection with *Bordetella bronchiseptica* in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 218, 367-375.
- Facklam R. (2002) What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev.* 15, 613-630.
- Ford RB. (2006) Canine infectious tracheobronchitis. *Infectious diseases of the dog and cat.*
- Foster S, Martin P, Braddock J, Malik R. (2004) A retrospective analysis of feline bronchoalveolar lavage cytology and microbiology (1995–2000). *J Feline Med Surg.* 6, 189-198.



- Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. (1994) PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin. Microbiol.* 32,335-351.
- Hulse LS, Hickey D, Mitchell JM, Beagley KW, Ellis W, Johnston SD. (2018) Development and application of two multiplex real-time PCR assays for detection and speciation of bacterial pathogens in the koala. *J Vet Diagn Invest.* 30, 523-529.
- Jameson P, King L, Lappin M, Jones R. (1995) Comparison of clinical signs, diagnostic findings, organisms isolated, and clinical outcome in dogs with bacterial pneumonia: 93 cases (1986-1991). *J Am Vet Med Assoc.* 206, 206-209.
- Johnson L, Queen E, Vernau W, Sykes J, Byrne B. (2013) Microbiologic and cytologic assessment of bronchoalveolar lavage fluid from dogs with lower respiratory tract infection: 105 cases (2001–2011). *J Vet Intern Med.*, 27, 259-267.
- Jouini A, Klibi N, Dziri R, Alonso CA, Boudabous A, Slama B, Torres C. (2015) Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *Int J Food Microbiol.* 203, 86-92.
- Kim M, Jee H, Shin S, Lee B, Pakhrin B, Yoo H, Yoon J, Kim D. (2007) Outbreak and control of haemorrhagic pneumonia due to *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* in dogs. *Vet Rec.* 161, 528-530.
- Kirchner B, Port CD, Magoc T, Sidor M, Ruben Z. (1990) Spontaneous bronchopneumonia in laboratory dogs infected with untyped *Mycoplasma* spp. *Lab Anim Sci.* 40, 625-628.
- Lamm C, Ferguson A, Lehenbauer T, Love B. (2010) Streptococcal infection in dogs: a retrospective study of 393 cases. *Vet Pathol.* 47, 387-395.
- Luna L. (1968) Routine staining procedures. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Blakiston Division McGraw-Hill, New York, 258 p.
- Maden M, Birdane FM, Atkan F, Hadimli HH, Şen İ, Aslan V. (2000) Clinical, cytologic, bacteriologic and radiographic analysis of respiratory diseases in dogs. *Eurasian J Vet Sci.* 16, 43-50.
- Marques C, Belas A, Aboim C, Cavaco-Silva P, Trigueiro G, Gama LT, Pomba C. (2019) Evidence of sharing of *Klebsiella pneumoniae* strains between healthy companion animals and cohabiting humans. *J Clin Microbiol.* 57, e01537-18.
- McAuliffe L, Ellis RJ, Ayling RD, Nicholas RA. (2003) Differentiation of *Mycoplasma* species by 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 41, 4844-7.
- Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. (2017) *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS microbiol Rev.* 41, 252-275.
- O'Neill E, Day M, Hall E, Holden D, Murphy K, Barr F, Pearson G. (2006) Bacterial cholangitis/cholangiohepatitis with or without concurrent cholecystitis in four dogs. *J Small Anim Pract* 47, 325-35.
- Pesavento P, Hurley K, Bannasch M, Artiushin S, Timoney J. (2008) A clonal outbreak of acute fatal hemorrhagic pneumonia in intensively housed (shelter) dogs caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Vet Pathol.* 45, 51-3.
- Proulx A, Hume DZ, Drobatz KJ, Reineke EL. (2014) In vitro bacterial isolate susceptibility to empirically selected antimicrobials in 111 dogs with bacterial pneumonia. *J Vet Emerg Crit Care.* 24, 194-200.
- Quinn P, Carter M, Markey B, Carter G. (1999) The streptococci and related cocci. *Clin Vet Microbiol.* Mosby, Edinburgh, Scotland, 127-136.
- Radaelli ST, Platt SR. (2002) Bacterial meningoencephalomyelitis in dogs: a retrospective study of 23 cases (1990-1999). *J Vet intern med.*, 16, 159-163.
- Radhakrishnan A, Drobatz KJ, Culp WT, King LG. (2007) Community-acquired infectious pneumonia in puppies: 65 cases (1993–2002). *J Am Vet Med Assoc.* 230, 1493-7.
- Roberts DE, McClain HM, Hansen DS, Currin P, Howerth EW. (2000) An outbreak of *Klebsiella pneumoniae* infection in dogs with severe enteritis and septicemia. *J Vet Diagn Invest.* 12, 168-73.
- Rosendal S. (1978) Canine mycoplasmas: pathogenicity of mycoplasmas associated with distemper pneumonia. *J Infect Dis.* 138, 203-210.
- Rosendal S. (1982) Canine mycoplasmas: their ecologic niche and role in disease. *J Am Vet Med Assoc.* 180, 1212-1214.
- Sayin Z, Sakmanoglu A, Erganis O, Ucan US, Hadimli HH, Aras Z, Sanioglu G, Coskun AA. (2016) Genotypic Characterization of *Bordetella bronchiseptica* Strains Isolated from Stray and Pet Dogs. *Pak Vet J* 36, 482-486.
- Schulz B, Kurz S, Weber K, Balzer H-J, Hartmann K. (2014) Detection of respiratory viruses and *Bordetella bronchiseptica* in dogs with acute respiratory tract infections. *Vet J.* 201, 365-369.
- Seguin MA, Vaden SL, Altier C, Stone E, Levine JF. (2003) Persistent urinary tract infections and reinfections in 100 dogs (1989–1999). *J Vet Intern Med.*, 17, 622-631.
- Songer JG, Post KW. (2004) *Veterinary microbiology-E-book: bacterial and fungal agents of animal disease*, Elsevier Health Sciences. 434 p.
- Sykes JE, Kittleson MD, Pesavento PA, Byrne BA, MacDonald KA, Chomel BB. (2006) Evaluation of the relationship between causative organisms and clinical characteristics of infective endocarditis in dogs: 71 cases (1992–2005). *J Am Vet Med Assoc.* 228, 1723-34.
- Taha-Abdelaziz K, Bassel LL, Harness ML, Clark ME, Register KB, Caswell JL. (2016) Cilia-associated bacteria in fatal *Bordetella bronchiseptica* pneumonia of dogs and cats. *J Vet Diagn Invest.* 28, 369-376.
- Tuzcu M, Özmen M, Karakoç SR, Tuzcu N, Yoldaş A. (2012) Diagnosis of mycoplasmosis in chicks by pathological and Real Time-PCR methods. *Eurasian J Vet Sci.* 28, 82-86.
- Tuzcu M, Tuzcu N, Akçakavak G, Celik Z. (2022) Diagnosis of *Sarcina ventriculi*-derived haemorrhagic abomasitis in lambs by histopathology and real-time PCR. *Acta Vet Brno.* 91, 227-233.
- Tuzcu N, Tuzcu M, Akçakavak G, Başbuğ O, Kurul M. (2021) Köpeklerde canine distemper virüs enfeksiyonunun klinik, patolojik ve real-time RT-PCR ile teşhisi. *JAVST* 6, 57-64
- Tuzcu N, Celik Z, Akçakavak G, Bulut A, Salik R, Oner M, Kaya V, Tuzcu M. (2023) Determination of *Helicobacter heilmannii* in cats by real time polymerase chain reaction and histopathology. *MAE Vet Fak Derg.* 8, 69-73.
- Ulstad CR, Solheim M, Berg S, Lindbæk M, Dahle UR, Wester AL. (2016) Carriage of ESBL/AmpC-producing or ciprofloxacin non-susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in healthy people in Norway. *Antimicrob Resist Infect Control.* 5, 1-11.
- Vaissaire J, Remond M, Dufrene M, Laroche M, Le Doujet C, Peigné F, Lebreton F. (1991) Stérilité, avortements et mortalité chez la chienne d'élevage dus à *Streptococcus* spp. du groupe G de Lancefield. *Bull Acad Vet Fr.* 144, 345-350.
- Yoldaş A, Tuzcu M, Özmen E, Yiğın A, Özmen M, Seval K, Tuzcu N. (2009) Sığırlarda Kuduz Hastalığının Teşhisi ve Kuduz Virüsünün Anatomik Lokalizasyonunun Real Time PCR ile Belirlenmesi Üzerine Karşılaştırmalı Çalışmalar. *Dicle Üniversitesi Vet Fak Derg.* 2, 42-50.



# Detection of bacterial and fungal agents in the skin of various domestic animals

Seyyide Sarıçam İnce<sup>1\*</sup>, Ebru Torun<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 30.03.2023, Kabul Tarihi / Accepted: 10.07.2023

**Abstract:** It is important for public health to monitor infectious agents in domestic animals. This study aimed to detect of bacterial and fungal agents in the skin of various domestic animals. A total of 263 skin samples were collected during 2021-2023 from 147 cats, 102 dogs, 10 cows, 3 rabbits, and 1 iguana. Bacteriological examination indicated that 37.6% of the samples were positive. *S. pseudintermedius* (35.4%) was the dominant bacteria in all isolates, followed by *P. aeruginosa* (23.2%). *S. aureus* was isolated from one rabbit sample and *P. aeruginosa* was isolated from one iguana sample. These findings add to the limited number of studies on these species. As a result of mycological examinations, 61.6% of all samples were identified as positive by cultural examination. Saprophytes were found in 41.1% of all samples, specifically *A. niger* (30.6%), *Penicillium* spp. (28.7%), *A. fumigatus* (16.7%), *Alternaria* spp. (15.7%), *Mucor* spp. (4.6%), and *A. flavus* (3.7%). The high prevalence of saprophytes was correlated with environmental contamination. Dermatophytes were isolated in 20.5% of all samples. *M. canis* was the dominant dermatophyte (64.8%), followed by *T. mentagrophytes* (31.5%) and *M. ferrugineum* (3.7%). The higher prevalence of dermatophytosis in spring (51.9%), was associated with rainy seasonal conditions in Turkey.

**Keywords:** dermatophytosis, *M. ferrugineum*, pyoderma, saprophyte, *S. pseudintermedius*.

## Farklı evcil hayvanların derisindeki bakteri ve mantar etkenlerinin tespiti

**Özet:** Evcil hayvanlarda enfeksiyöz etkenlerin izlenmesi halk sağlığı açısından önemlidir. Bu çalışma, farklı evcil hayvanların derisindeki bakteri ve mantar etkenlerini saptamayı amaçlamıştır. Bu amaç doğrultusunda, 2021-2023 döneminde 147 kedi, 102 köpek, 10 inek, 3 tavşan ve 1 iguanadan olmak üzere toplam 263 adet deri numunesi toplandı. Bakteriyolojik inceleme, numunelerin %37,6'sının pozitif olduğunu gösterdi. Tüm izolatlar arasında *S. pseudintermedius* (%35,4) baskın bakteri iken, takiben *P. aeruginosa* (%23,2) izole edildi. Bir adet tavşan numunesinden *S. aureus* ve bir adet iguana numunesinden *P. aeruginosa* izole edildi. Bu bulgular, bu türleri ele almış sınırlı sayıda literatüre katkıda bulunmaktadır. Yapılan mikolojik incelemeler sonucunda, tüm numunelerin %61,6'sı kültürel inceleme ile pozitif tespit edildi. Tüm numunelerin %41,1'inde saprofit etken, *A. niger* (%30,6), *Penicillium* spp. (%28,7), *A. fumigatus* (%16,7), *Alternaria* spp. (%15,7), *Mucor* spp. (%4,6) ve *A. flavus* (%3,7), saptandı. Saprofitlerin yüksek prevalansı, çevresel kontaminasyon ile ilişkilendirildi. Tüm numunelerin %20,5'inde dermatofit izole edildi. Baskın dermatofit *M. canis* (%64,8) iken, takiben *T. mentagrophytes* (%31,5) ve *M. ferrugineum* (%3,7) izole edildi. İlkbaharda dermatofitoz prevalansının daha yüksek olması (%51,9), Türkiye'deki yağışlı mevsim koşulları ile ilişkilendirildi.

**Anahtar kelimeler:** dermatofitozis, *M. ferrugineum*, piyoderma, saprofit, *S. pseudintermedius*.

## Introduction

Dermatophytosis is the most frequent dermatological infection of keratinized tissues in animals worldwide (Nweze 2011). This infection is caused by *Microsporum*, *Trichophyton*, and *Epidermophyton* genera, which can use host keratin as a nutritional substrate. The most common observed dermatophytes are *Microsporum canis* (*M. canis*), *Microsporum gypseum* (*M. gypseum*) and *Trichophyton mentagrophytes* (*T. mentagrophytes*) responsible for more than 95% of all dermatophytosis in domestic animals (Roshanzamir et al. 2016).

Humans can be directly infected with dermatophytes through close contact with infected domestic animals (Nweze 2011), which are considered the main reservoir for dermatophytes (Seker and Dogan 2011). Many studies have demonstrated that dermatophytes are transmitted from domestic animals to humans and dermatophytosis is common among patients in contact with domestic animals (Ben-Ziony and Arzi 2000; Murmu et al. 2015; Maraki and Mavromanolaki 2016). Therefore, monitoring of dermatophytosis in domestic animals is critical to control infections and reduce transmission to hu-

mans (Roshanzamir et al. 2016). In addition, dermatophytes accompany various saprophytic fungi, such as *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., and *Alternaria* spp., while saprophytes mainly cause infections in immunosuppressive hosts (Ben-Ziony and Arzi 2000; Moosavi et al. 2019). Due to their infectious potential, it is important for public health to monitor of saprophytes like dermatophytes in domestic animals.

In addition to fungal agents, bacterial agents are frequently isolated from skin infections in domestic animals. *Staphylococcus pseudintermedius* (*S. pseudintermedius*) is the bacterium most frequently isolated from pyoderma in cats, dogs, and humans and is even considered the primary cause of pyoderma in companion animals (Somayaji et al. 2016; Müştak et al. 2019). *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) is another common opportunistic pathogen in animal and human skin (Hillier et al. 2006; Petersen et al. 2002). Following these bacteria, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus intermedius* (*S. intermedius*), *Staphylococcus simulans* (*S. simulans*), *Streptococcus* spp., and *Escherichia coli* (*E. coli*), etc. are rarely isolated from skin infections (Hanselman et al. 2009; Moon et al. 2022). As with dermatophyte and saprophyte epidemiology, pathogenic bacteria may be transmitted to humans through direct contact with infected domestic animals (Moon et al. 2022).

Accordingly, the present study aimed to determine the factors that may pose risks of transmission to humans by detecting bacterial and fungal agents in the skin of various domestic animals, during 2021-2023.

## Materials and Methods

### Sample collection

The samples were analyzed at Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, in 2021-2023. The sampling period was divided into 4 seasons: autumn (September-November), winter (December-February), spring (March-May) and summer (June-August). A total of 263 swap samples were obtained from the skin of cats (n=147), dogs (n=102), cows (n=10), rabbits (n=3), and iguana (n=1) that had not been treated with any antibacterial or antifungal drugs. Prior to sampling, the infection site was sterilized with 70% alcohol. The samples were collected according to the Kirk and Bister scraping procedure using sterile scalpels, petri dishes, and tweezers (Bister and Ford

1995) before being aseptically stored at +4°C until the analyses.

### Bacteriological examination

Each sample was inoculated on 5% sheep blood agar plate. The plates were incubated at 37°C for 24-48 h under aerobic conditions. All colonies were identified using standard bacteriological methods (Markey et al. 2013). Following Gram staining, the isolates were identified using catalase, oxidase, oxidation-fermentation, coagulase, citrate, DNase, indole, hemolysis, motility, nitrate, novobiocin (5 µg/disc), polymixin-B (300 U/disc), Voges-Proskauer, and urease tests. The isolates were cultured on *Eosin Methylene Blue* (EMB) Agar, MacConkey Agar (MCA), Mannitol Salt Agar (MSA), and Triple Sugar Iron (TSI) Agar (Oxoid, UK). Discrimination of *S. pseudintermedius* and *S. intermedius* species was performed by sequencing of the RNA polymerase B (*rpoB*) gene, as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI 2008). Polymerase chain reaction (PCR) and sequencing were performed using 31F and 830R primers (Drancourt et al. 2004). PCR mix consisted of 2.5 µL of 10xbuffer, 0.5 µL 10 mM dNTPs (Thermo Fisher Scientific, USA), 3 µL MgCl<sub>2</sub> (Thermo Fisher Scientific, USA), 1 µL of each 10 mM primer, 0.2 µL Taq polymerase (2U/ µL; Thermo Fisher Scientific, USA), and 2 µL template DNA. The mix increased to total 25 µL volume with PCR-grade water. PCR was run under the following conditions: pre-denaturation at 94°C for 3 min, 30 cycles of 94°C for 1 min, 58°C for 30 s, 72°C for 1 min, and final extension at 72°C for 7 min. Amplicons were purified with Exosap-IT (Thermo Fisher Scientific, USA). BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) was used for sequencing, while Sephadex (Oxoid, UK) gel filtration was used for purification. Sequencing was performed on an ABI 3500 genetic analyzer system (Applied Biosystems, USA). The obtained sequences were analyzed by CLC Main Workbench version 8.1.0 software (Qiagen, USA).

### Mycological examination

The samples were investigated by direct microscopy and cultural examination. Direct microscopy was performed using a sterile lancet, lam, and 10% solution of potassium hydroxide (KOH). All preparations were examined under a light microscope at 40x magnification to detect fungal components, such as hyphae, spore, and conidia. Cultural examination was conducted using Sabouraud Dextrose Agar (SDA) supplemented with 0.05 mg/ml chloramphen-

icol (Oxoid, UK). The plates were incubated at 25°C for 15 days under aerobic conditions. The fungal colonies were examined with both macroscopically and microscopically. Macroscopic examination was conducted to detect cultural features, while microscopic examination was performed by lactophenol cotton blue staining (Merck, Germany) under a light microscope at 40x magnification to identify fungal components. The fungal isolates were identified according to the guide of Larone (Walsh et al. 2006). The urease test was also used to identify of *T. mentagrophytes*.

## Results

### Bacteriological examination

Overall, 37.6% (99/263) of the samples were positive for bacterial agents. The highest prevalences were in the cat and dog: 36.1% (53/147) and 43.1% (44/102), respectively. No bacteria were isolated from the cow samples (Table 1).

**Table 1.** Bacterial isolation prevalence by host

Isolation	No. of isolates (%)					
	Cat	Dog	Cow	Rabbit	Iguana	Total
Negative samples	94 (63.9)	58 (56.9)	10 (100.0)	2 (66.7)	0	164 (62.4)
Positive samples	53 (36.1)	44 (43.1)	0	1 (33.3)	1 (100.0)	99 (37.6)
<b>Total</b>	<b>147 (100.0)</b>	<b>102 (100.0)</b>	<b>10 (100.0)</b>	<b>3 (100.0)</b>	<b>1 (100.0)</b>	<b>263 (100.0)</b>

*S. pseudintermedius* (35.4%, 35/99) was the dominant bacteria in all isolates, followed by *P. aeruginosa* (23.2%, 23/99). The dominant Gram-positive

and Gram-negative bacteria were the same in cats and dogs (Table 2).

**Table 2.** Distribution of bacterial agents by host

Bacteria	No. of isolates (%)					
	Cat	Dog	Cow	Rabbit	Iguana	Total
<i>S. pseudintermedius</i>	19 (35.8)	16 (36.4)	0	0	0	35 (35.4)
<i>S. aureus</i>	11 (20.8)	3 (6.8)	0	1 (100.0)	0	15 (15.2)
<i>S. intermedius</i>	4 (7.5)	7 (15.9)	0	0	0	11 (11.1)
<i>S. epidermidis</i>	3 (5.7)	1 (2.3)	0	0	0	4 (4.0)
<i>Streptococcus</i> spp.	0	2 (4.5)	0	0	0	2 (2.0)
<i>E. coli</i>	3 (5.7)	4 (9.1)	0	0	0	7 (7.1)
<i>P. aeruginosa</i>	12 (22.6)	10 (22.7)	0	0	1 (100.0)	23 (23.2)
<i>P. mirabilis</i>	1 (1.9)	1 (2.3)	0	0	0	2 (2.0)
<b>Total</b>	<b>53 (100.0)</b>	<b>44 (100.0)</b>	<b>0</b>	<b>1 (100.0)</b>	<b>1 (100.0)</b>	<b>99 (100.0)</b>

### Mycological examination

None of the samples tested by direct microscopy were positive for fungal agents. In contrast, 61.6% (162/263) of all samples tested by cultural examination were positive for fungal agents, while 38.4% (101/263) were negative. Dermatophytes (*M. canis*,

*M. ferrugineum*, and *T. mentagrophytes*) and saprophytes (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Alternaria* spp., *Mucor* spp., and *Penicillium* spp.) were detected in 20.5% (54/263) and 41.1% (108/263) of all samples, respectively (Table 3).

**Table 3.** Fungal isolation prevalence by host

Isolation	No. of isolates (%)					Total
	Cat	Dog	Cow	Rabbit	Iguana	
Dermatophytes	33 (22.4)	19 (18.6)	2 (20.0)	0	0	54 (20.5)
Saprophytes	64 (43.5)	42 (41.2)	2 (20.0)	0	0	108 (41.1)
Negative	50 (34.0)	41 (40.2)	6 (60.0)	3 (100.0)	1 (100.0)	101 (38.4)
<b>Total</b>	<b>147 (100.0)</b>	<b>102 (100.0)</b>	<b>10 (100.0)</b>	<b>3 (100.0)</b>	<b>1 (100.0)</b>	<b>263 (100.0)</b>

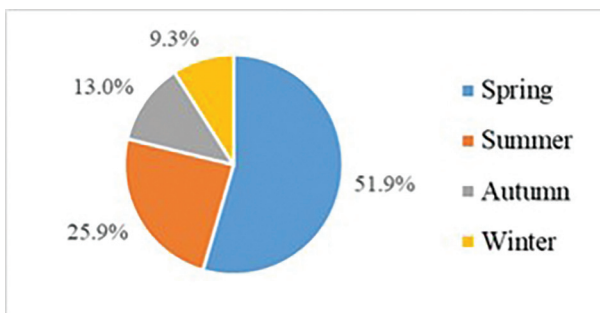
A wide spectrum of nine different fungal agents were detected. Regarding the dominant agents, 64.8% (35/54) of the dermatophytes were *M. canis*,

while 30.6% (33/108) of the saprophytes were *A. niger* (Table 4).

**Table 4.** Distribution of dermatophytes and saprophytes by host

Fungal agents	No. of isolates (%)				Total
	Cat	Dog	Cow	Total	
<i>M. canis</i>	21 (63.6)	14 (73.7)	0	35 (64.8)	
<i>T. mentagrophytes</i>	10 (30.3)	5 (26.3)	2 (100.0)	17 (31.5)	
<i>M. ferrugineum</i>	2 (6.1)	0	0	2 (3.7)	
<b>Total Dermatophytes</b>	<b>33 (100.0)</b>	<b>19 (100.0)</b>	<b>2 (100.0)</b>	<b>54 (100.0)</b>	
<i>A. niger</i>	15 (23.4)	18 (42.9)	0	33 (30.6)	
<i>A. fumigatus</i>	7 (10.9)	11 (26.2)	0	18 (16.7)	
<i>A. flavus</i>	4 (6.3)	0	0	4 (3.7)	
<i>Penicillium</i> spp.	21 (32.8)	8 (19.0)	2 (100.0)	31 (28.7)	
<i>Alternaria</i> spp.	12 (18.8)	5 (11.9)	0	17 (15.7)	
<i>Mucor</i> spp.	5 (7.8)	0	0	5 (4.6)	
<b>Total Saprophytes</b>	<b>64 (100.0)</b>	<b>42 (100.0)</b>	<b>2 (100.0)</b>	<b>108 (100.0)</b>	

Dermatophytes were most frequently isolated (51.9%) during spring (Figure 1), specifically 54.5% in cats, 42.1% in dogs, and 100.0% in cows.

**Figure 1.** Distribution of dermatophytes by season

## Discussion and Conclusion

According to the 'One Health' concept, animal health, public health, and the environment should be evaluated together to obtain optimal results (Atusing-wize et al. 2020). Domestic animals are important sources in the transmission of zoonoses to humans. Therefore, it is important for public health to monitor infectious agents in domestic animals (Moon et al. 2022). In this study, we detected the bacterial and fungal agents in skin of various domestic animals to evaluate the risk of transmission to humans.

Regarding bacteria, *S. pseudintermedius* was 35.4% of all bacterial isolates, and was the dominant agent in cats and dogs. *S. pseudintermedius* is defined as an opportunistic pathogen that is the primary cause of pyoderma in dogs (Markey et al. 2013; Nomoto et al. 2020). Moreover, it is common-

ly associated with pyoderma in humans (Somayaji et al. 2016). The transmission of *S. pseudintermedius* from dog to human was reported by Somayaji et al. (2016) and Nomoto et al. (2020). Somayaji et al. (2016) reported that the majority of human *S. pseudintermedius* clinical cases (91.7%) were caused by contact with dogs, and concluded that dogs are an important reservoir for transmission of *S. pseudintermedius*. Similar to our study, Ma et al. (2020) reported that *S. pseudintermedius* was the dominant agent (46.2%) in dogs, and second-most dominant agent (8.8%) in cats. Moon et al. (2022) also reported that *S. pseudintermedius* (12.5%) was one of the dominant agents in cats.

In our study, *P. aeruginosa* (23.2%) was the dominant Gram-negative bacteria in all isolates, which confirms previous findings regarding the high prevalence of this agent. For example, Petersen et al. (2002) reported that *P. aeruginosa* was the only agent isolated in 33.1% of dog skin samples while Hillier et al. (2006) found that 30% sampled of dogs had pseudomonal pyoderma. Nocera et al. (2021) reported that *P. aeruginosa* accounted for 36% of the Gram-negative bacteria isolated from the skin of cats and dogs.

We also isolated *S. aureus* from one rabbit sample and *P. aeruginosa* from one iguana sample. White et al. (2002) also reported that *S. aureus* was the most common secondary infectious agent isolated from rabbits, as well as *T. mentagrophytes*. They concluded that asymptomatic rabbits infected with dermatophytes, especially from pet stores, may pose risks to the health of other animals and humans. In contrast, we did not detect any dermatophytes in the rabbits in the present study. On the other hand, our isolation of *P. aeruginosa* from the iguana sample, is important because it is a dominant bacterial agent with zoonotic potential in cold-blooded animals. There have been few reports of bacteriological analysis of skin in iguanas. In a case report, Supic et al. (2021) described a fatal *P. aeruginosa* infection in a case of extensive dermatitis in an iguana. Hence, our finding adds to the limited number of studies on this species. Apart from *S. pseudintermedius* and *P. aeruginosa*, we isolated *S. aureus* (15.2%), *S. intermedius* (11.1%), *S. epidermidis* (4.0%), *Streptococcus* spp. (2.0%), *E. coli* (7.1%) and *Proteus mirabilis* (2.0%) from all samples. This finding is not unexpected given that previous studies also isolated these agents from skin infections of domestic animals (Chaudhary et al. 2019; Li et al. 2021; Nocera et al. 2021).

Our mycological analyses indicated that 20.5% of all samples were positive for dermatophytes. Previous studies have shown that dermatophyte prevalence varies widely (Maraki and Mavromanolaki 2016). For example, Moosavi et al. (2019) reported 14.5% prevalence in cats; Dworecka-Kaszak et al. (2020) reported 23.5% prevalence in various domestic animals; and Roshanzamir et al. (2016) reported 56% prevalence in cats and dogs. In our study, dermatophytes were more prevalent in cats (22.4%) than in dogs (18.6%), which is similar to previous studies. For example, Cafarchia et al. (2004) reported 28.2% and 20.5% positivity in cats and dogs, respectively; Seker and Dogan (2011) reported 20.1% and 18.7% positivity in cats and dogs, respectively; and Murmu et al. (2015) reported 55.5% and 37.8% positivity in cats and dogs, respectively.

At 64.8%, *M. canis* was the most prevalent dermatophyte. This finding is important, given that *M. canis* is also the dominant dermatophyte in humans (Aneke et al. 2022). Similarly, Cafarchia et al. (2004) reported that *M. canis* (77.7%) was the dominant dermatophyte in domestic animals. The second-most dominant dermatophyte isolated in our study was *T. mentagrophytes* (31.5%). Similarly, Nweze (2011) found that *M. canis* (37.4%) was the dominant dermatophyte in domestic animals, followed by *T. mentagrophytes* (22.9%). Seker and Dogan (2011) found that *M. canis* (57.1%) was the dominant dermatophyte in domestic animals, followed by *T. mentagrophytes* (20.0%). Murmu et al. (2015) reported that *M. canis* (60.0%) and *T. mentagrophytes* (15.8%) were the dominant dermatophytes in cats, dogs, and humans, while Dworecka-Kaszak et al. (2020) reported that they were also dominant (59.25% and 40.7%, respectively) in domestic animals. Consistent with these studies, our findings are important because *M. canis* and *T. mentagrophytes* are also responsible for dermatophytosis in humans.

Regarding other species, Moosavi et al. (2019) reported that *T. verrucosum* (86.66%) was the dominant dermatophyte, while Roshanzamir et al. (2016) reported that *M. gypseum* (27.5%) was dominant in cats and dogs. However, we did not isolate either species. On the other hand, we detected *M. ferrugineum* in 6.1% of cat samples. This finding is not surprising as the species is phylogenetically related to *M. canis*. Rezaei-Matehkolaei et al. (2012) noted that *M. ferrugineum* is rarely isolated in routine analysis due to its limited endemicity.

While we isolated *T. mentagrophytes* from cow samples, we did not isolate any bacteria. Dermatophytosis is an important risk for animal health due

to its high morbidity. In addition, infected cows can be reservoirs for humans and healthy animals (Papini et al. 2009). Various reports indicate that cows can spread infection and human dermatophytosis among workers on infected farms (Ming et al. 2006; Papini et al. 2009). Our finding is in line with those of Ranganathan et al. (1998), Yildirim et al. (2010), and Nweze (2011) in terms of isolating of *T. mentagrophytes* from cows. Dalis et al. (2018) and Mohamadifard et al. (2022) also found that *T. mentagrophytes* is one of the most common isolated dermatophytes from cows.

Considering saprophyte and dermatophyte isolation together, we detected saprophytes (41.1%) more frequently than dermatophytes (20.5%). High saprophytes prevalence is correlated with soil contamination. Such environmental contamination is considered an effective factor in isolating saprophytes (Moosavi et al. 2019; Dworecka-Kaszak et al. 2020). In our study, the detected saprophytes included *Aspergillus* spp. (50.9%), *Penicillium* spp (28.7%), *Alternaria* spp. (15.7%), and *Mucor* spp. (7.8%). Moosavi et al. (2019) reported that all cat samples were positive (100.0%) for saprophytes. Consistent with our findings, the dominant agents in their study were *Aspergillus* spp. (18.4%) followed by *Alternaria* spp. (17.4%), and *Penicillium* spp. (12.0%).

Research has produced different findings regarding the correlation between season and dermatophytosis prevalence in domestic animals. We correlated the high prevalence in samples collected during spring (51.9%) with rainy seasonal conditions in Turkey. Similarly, Murmu et al. (2015) found that the highest prevalence of dermatophytosis (74.5%) in cats and dogs was correlated with the rainy season, while Şahan Yapıcıer et al. (2017) also reported that dermatophytosis in both cats (57.1%) and dogs (86.9%) was more common in the spring.

**Ethical statement:** Ethical approval was not required for the study.

**Conflicts of interest:** The authors declare that they have no conflicts of interest.

**Financial Support:** This research received no grant from any funding agency/sector.

## References

Aneke CI, Cmokova A, Hubka V, Rhimi W, Otranto D, Cafarchia C. (2022) Subtyping Options for *Microsporium canis* Using Microsatellites and MLST: A Case Study from Southern Italy. *Pathogens*. 11, 1-12. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010004>

- Atusingwize E, Ndejjo R, Tumukunde G, Buregyeya E, Nsamba P, Tuhebwe D, Kato CD, Naigaga I, Musoke D, Kabasa JD, Bazeyo W. (2020) Application of one health approach in training at Makerere University: experiences from the one health workforce project in Uganda. *One Health Outlook*. 2, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s42522-020-00030-7>
- Ben-Ziony Y, Arzi B. (2000) Use of lufenuron for treating fungal infections of dogs and cats: 297 cases (1997-1999). *JAVMA*. 217, 1510-1513.
- Bister SI, Ford RB. (1995) Kirk and Bister's handbook of veterinary procedures & emergency treatment. Sixth edition. Philadelphia. WB Saunders Co:484-486.
- Cafarchia C, Romito D, Sasanelli M, Lia R, Capelli G, Otranto D. (2004) The epidemiology of canine and feline dermatophytoses in southern Italy. *Mycoses*. 47, 508-513.
- Chaudhary AK, Kumar A, Shrivastva M. (2019). Study on prevalence and resistance patterns of bacterial pathogens isolated from canine pyoderma. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 8, 2305-2311.
- CLSI. (2008) Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing : approved guideline. CLSI document MM18-A. Wayne, PA.
- Dalis JS, Kazeem HM, Kwaga JKP, Kwanashie CN, Yakubu B, Owolodun OA, Jambol AR. (2018) Molecular characterization of dermatophytes isolated from cattle in Plateau State, Nigeria. *Vet Microbiol*. 219, 212-218. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.022>
- Drancourt M, Roux V, Fournier PE, Raoult D. (2004) rpoB gene sequence-based identification of aerobic Gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. *J Clin Microbiol*. 42, 497-504.
- Dworecka-Kaszak B, Bieganska MJ, Dabrowska I. (2020) Occurrence of various pathogenic and opportunistic fungi in skin diseases of domestic animals: a retrospective study. *Bmc Vet Res*. 16, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02460-x>
- Hanselman BA, Kruth, SA, Rousseau J, Weese JS. (2009) Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. *Can Vet J*. 50, 954-958.
- Hillier A, Alcorn JR, Cole LK, Kowalski JJ. (2006) Pyoderma caused by *Pseudomonas aeruginosa* infection in dogs: 20 cases. *Vet Dermatol*. 17, 432-439.
- Li Y, Fernandez R, Duran I, Molina-Lopez RA, Darwich L. (2021) Antimicrobial resistance in bacteria isolated from cats and dogs from the Iberian Peninsula. *Front Microbiol*. 11, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.621597>
- Maraki S, Mavromanolaki VE. (2016) Epidemiology of dermatophytes in Crete, Greece: a 5-year Survey. *Med Mycol J* 57, 69-75.
- Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. (2013) *Clinical Veterinary Microbiology*. Second edition. Dublin, Ireland: Mosby Elsevier, p.105-270.
- Ming PX, Ti YLX, Bulmer GS. (2006) Outbreak of *Trichophyton verrucosum* in China transmitted from cows to humans. *Mycopathologia*. 161, 225-228. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0223-y>
- Mohamadifard H, Amini K, Bayat M, Hashemi SJ, Noorbakhsh F. (2022) Molecular study and antifungal susceptibility profile of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* strains isolated from lesions of humans and cattle. *Iran J Microbiol*. 14, 587-597.
- Moon DC, Choi JH, Boby N, Kim SJ, Song HJ, Park HS, Gil MC, Yoon SS, Lim SK. (2022) Prevalence of bacterial species in skin, urine, diarrheal stool, and respiratory samples in cats. *Pathogens*. 11, 1-12. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030324>

- Moosavi A, Ghazvini RD, Ahmadikia K, Hashemi SJ, Geramishoar M, Mohebbali M, Yekaninejad MS, Bakhshi H, Khodabakhsh M. (2019) The frequency of fungi isolated from the skin and hair of asymptomatic cats in rural area of Meshkin-shahr-Iran. *J Mycol Med.* 29, 14-18. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.01.004>
- Murmu S, Debnath C, Pramanik AK, Mitra T, Jana S, Dey S, Banerjee S, Batabyal K. (2015) Detection and characterization of zoonotic dermatophytes from dogs and cats in and around Kolkata. *Vet World.* 8, 1078-1082.
- Müştaş İB, Müştak HK, Sarçam S, Üstün T, Erdem AE. (2019) Frequency of *Staphylococcus pseudintermedius* in canine skin infections and antibiotic resistance profiles of the recovered isolates. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg.* 32, 127-132. <https://doi.org/10.35864/evmd.793494>
- Nocera FP, Ambrosio M, Fiorito F, Cortese L, De Martino L. (2021) On Gram-positive- and Gram-negative-bacteria-associated canine and feline skin infections: A 4-Year Retrospective study of the University Veterinary Microbiology Diagnostic Laboratory of Naples, Italy. *Animals.* 11, 1-16. <https://doi.org/10.3390/ani11061603>
- Nomoto H, Kutsuna S, Nakamura K, Nakamoto T, Shimomura A, Hirakawa T, Kinoshita N, Hayakawa K, Nagashima M, Ohmagari N. (2020) Totally implantable venous access port infection caused by *Staphylococcus pseudintermedius*: Possible transmission from a companion dog to a human. *J Infect Chemother.* 26, 1305-1308.
- Nweze EI. (2011) Dermatophytoses in domesticated animals. *Rev Inst Med Trop Sp.* 53, 95-99. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652011000200007>
- Papini R, Nardoni S, Fanelli A, Mancianti F. (2009) High infection rate of *Trichophyton verrucosum* in calves from Central Italy. *Zoonoses Public Hlth.* 56, 59-64. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01157.x>
- Petersen AD, Walker RD, Bowman MM, Schott II HC, Rosser EJ. (2002) Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus intermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine skin and ear samples over a 6-year period (1992-1997). *J Am Anim Hosp Assoc.* 38, 407-413.
- Ranganathan S, Balajee SAM, Raja SM. (1998) A survey of dermatophytosis in animals in Madras, India. *Mycopathologia.* 140, 137-140.
- Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, De Hoog GS, Shidfar MR, Satoh K, Najafzadeh MJ, Mirhendi H. (2012) Multilocus differentiation of the related dermatophytes *Microsporum canis*, *Microsporum ferrugineum* and *Microsporum audouinii*. *J Med Microbiol.* 61, 57-63. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.036541-0>
- Roshanzamir H, Naserli S, Ziaie B, Fakour M. (2016) Incidence of dermatophytes isolated from dogs and cats in the city of Baku, Azerbaijan. *Comp Clin Pathol.* 25, 327-329. <https://doi.org/10.1007/s00580-015-2185-x>
- Seker E, Dogan N. (2011) Isolation of dermatophytes from dogs and cats with suspected dermatophytosis in Western Turkey. *Prev Vet Med.* 98, 46-51. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.11.003>
- Somayaji R, Priyantha MAR, Rubin JE, Church D. (2016) Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagn Micr Infec Dis.* 85, 471-476. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.008>
- Supic J, Residbegovic E, Koro A, Hadziabdic S, Golob M, Skapur V, Alic A. (2021) Fatal Disseminated *Pseudomonas aeruginosa* infection in a captive green iguana (*Iguana iguana*). *Acta Vet Beograd.* 71, 361-370. <http://doi.org/10.2478/acve-2021-0031>
- Şahan Yapıcıer Ö, Şababoğlu E, Öztürk D, Pehlivanoğlu F, Kaya M, Türütoğlu H. (2017) Kedi ve köpeklerden dermatofitlerin izolasyonu. *MAE Vet Fak Derg.* 2, 125-130. <http://doi.org/10.24880/maeuvfd.359535>
- Walsh TH, Hayden RT, Larone DH. (2006) Larone's medically important fungi. Sixth edition. Washington DC: ASM Press, p.189-309.
- White SD, Bourdeau PJ, Meredith A. (2002) Dermatologic problems of rabbits. *Sem Avian Exo Pet Med.* 11, 141-150.
- Yıldırım M, Cinar M, Ocal N, Yagci BB, Askar S. 2010. Prevalence of clinical dermatophytosis and oxidative stress in cattle. *J Anim Vet Adv* 9, 1978-1982.





# Resistance to antimicrobials of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from turkeys in a slaughterhouse

Özlem Kardoğan<sup>1</sup> , İnci Başak Müştak<sup>2\*</sup> 

<sup>1</sup> Veterinary Control Central Research Institute, Poultry Disease Diagnosis and Research Laboratory, Ankara, Türkiye  
<sup>2</sup> Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 02.11.2023, Kabul Tarihi / Accepted: 16.11.2023

**Abstract:** This study measured the percentage of thermotolerant *Campylobacter* (*C. jejuni* and *C. coli*) from samples obtained from a turkey slaughterhouse in Turkey and investigated their antimicrobial resistance to selected antimicrobials by disc diffusion method. Of 28 samples analyzed, 75% were positive for *Campylobacter*. Positivity in turkey cecum samples was 28.5% for *C. coli* and 71.4% for *C. jejuni*. Very high antimicrobial resistance rates were detected for ciprofloxacin and nalidixic acid while resistance to tetracycline was 100% for *C. jejuni* strains. No isolates showed multidrug resistance, or resistance to gentamicin or erythromycin. These results can provide information about the status of *C. coli* and *C. jejuni* resistant to fluoroquinolones, macrolides, aminoglycosides and tetracycline isolated from food animals in Turkey.

**Keywords:** antimicrobial resistance, *Campylobacter*, Türkiye

## Bir mezbahada hindilerden izole edilen *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli*'nin antimikrobiyallere direnci

**Özet:** Bu çalışmada, Türkiye'deki bir hindi mezbahasından alınan numunelerde termofilik *Campylobacter*'lerin (*C. jejuni* ve *C. coli*) yüzdesi ölçülmüş ve disk difüzyon yöntemiyle seçilen antimikrobiyallere karşı dirençleri araştırılmıştır. Analiz edilen 28 örneğin %75'i *Campylobacter* yönünden pozitif. Hindi sekum örneklerinde %28,5 *C. coli*, %71,4 *C. jejuni* belirlendi. Siprofloksasin ve nalidiksik asite karşı yüksek oranda antimikrobiyal direnç tespit edilirken, *C. jejuni* suşlarında tetrasiklin direnci %100 olarak tespit edildi. Hiçbir izolatta çoklu ilaç direnci, gentamisin veya eritromisine direnç saptanmadı. Bu sonuçlar, Türkiye'de gıda amaçlı kullanılan hayvanlardan izole edilen *C. coli* ve *C. jejuni*'nin florokinolonlara, makrolidlere, aminoglikozidlere ve tetrasikline direnç durumu hakkında bilgi sağlamaktadır.

**Anahtar kelimeler:** antimikrobiyel direnç, *Campylobacter*, Türkiye

## Introduction

The most commonly reported foodborne gastrointestinal infection in humans has been Campylobacteriosis since 2007 (EFSA, 2022). The majority of Campylobacteriosis cases are caused by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, which cause acute gastroenteritis (Tauxe, 1992; Gillespie et al., 2002; Giacomelli et al., 2014) and, rarely, bacteremia, hepatitis, pancreatitis, and Guillain-Barré syndrome in humans (Butzler, 2004; Louwen et al., 2012). The main reservoir of these *Campylobacter* species is domestic poultry. Campylobacters colonize the cecum of chickens and turkeys (Beery et al., 1988; Sylte et al., 2018; Sylte et al., 2019). Although *Campylobacter* infection often causes gastroenteritis in humans, birds are usually asymptomatic (Wagenaar et al., 2013). Campylobacters are shed in large numbers in poultry feces, which is a major transmission vehicle

for *Campylobacter* (Herman et al., 2003). In addition to contaminated food, environmental exposure and direct contact with poultry are associated with infection (Domingues et al., 2012).

Severe and prolonged campylobacteriosis can be treated with antibiotics, with macrolides being the preferred primary antibiotics, although fluoroquinolones, tetracyclines, and gentamycin are also recommended (Aarestrup and Engberg, 2001; Moore et al., 2006; Aarestrup et al., 2008). In serious cases, aminoglycosides are also considered (Aarestrup and Engberg, 2001; Aarestrup et al., 2008; Blaser and Engberg, 2008). However, increased rate of resistance to these antibiotics is a significant public health concern (Blaser and Engberg, 2008), with a report from the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) listing drug-resistant *Campylobacter* under "microorganisms with a threat level of

serious" (Shen et al., 2018). Furthermore, multidrug-resistant strains of *C. jejuni* and *C. coli* from various sources and human infections have also been described (Payot et al., 2004; Luangtongkum et al., 2009; Wieczorek and Osek, 2013; Haldenby et al., 2020). Therefore, especially in the European Union, controlling and monitoring antibiotic resistance in zoonotic pathogens has become mandatory (EFSA, 2020).

In Turkey, no studies have reported the antimicrobial profile of *C. jejuni* and *C. coli* strains isolated from turkeys. Therefore, we used phenotypic methods to investigate the resistance of isolates to fluoroquinolones, macrolides, aminoglycosides and tetracycline.

## Materials and methods

### *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates

In the current study, 28 turkey cecum samples were analyzed, obtained from slaughterhouses which send samples to our laboratory.

### Bacterial culture and DNA extraction

Bacteria isolation was performed according to the ISO 10272-1 (2017) guideline (ISO, 2017).

DNA extraction was performed from bacterial culture on blood agar plates using High Pure PCR Template Preparation Kits (Roche Diagnostics GmbH, Germany) in accordance with manufacturer's instructions.

### qPCR Analysis

After cultivation of the bacteria, the plates containing the colonies were stored at 4°C prior to testing their identity with qPCR, which was performed first to determine whether the recovered colonies were *C. jejuni* or *C. coli* using the *Campylobacter coli-jejuni-lari* DNA Test Kit (BioCheck, USA). The qPCR assay was performed using a Rotor-Gene Q (Qiagen Sciences, Germantown, MD) instrument. The qPCR conditions were as follows: 95°C for 3 min followed by 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 60 s. Amplification of targets was observed in the FAM, Texas red, Cy-5, and HEX channels for *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and internal control, respectively.

A total of 12.5 µL of Mastermix (Bioeksen R&D Technologies Ltd, Turkey), 7.5 µL primer/probe mix with internal control, and 5 µL of template nucleic acid were used.

### Antimicrobial susceptibility testing

The antibiotic susceptibilities of the *C. jejuni* and *C. coli* isolates to gentamicin (CN, 10 µg), erythromycin (EM, 15 µg), nalidixic acid (NA, 30 µg), enrofloxacin (EF, 5 µg), ciprofloxacin (CI, 5 µg), and tetracycline (TE, 30 µg) were determined using the disk diffusion test (Bauer et al., 1966). The test results were evaluated using the criteria published by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2022). Briefly, 0.5 McFarland of the bacterial cultures was prepared then inoculated on Mueller Hinton agar (MHA) (Merck, Germany) supplemented with 5% defibrinated sheep blood. The strains were considered multidrug resistant showing resistance to three or more antimicrobial classes (Giacomelli et al., 2014). The reference strains ATCC 33291 and ATCC 33559 were used as test controls for *C. jejuni* and *C. coli*, respectively.

## Results

### Identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates

*Campylobacter* spp. were isolated from the cecum samples of all 28 turkeys. The samples revealed that 21 birds were *Campylobacter* positive. Of the 21 *Campylobacter* isolates, 6 (28.5%) isolates were identified as *C. coli* and 15 (71.4%) as *C. jejuni*.

All isolates were also identified using qPCR. The results confirmed the qPCR data, recognizing 15 strains as *C. jejuni* and 6 strains as *C. coli*.

### Antimicrobial resistance of isolates

Table, which presents the number of isolates showing susceptibility to each antimicrobial drug, shows firstly that all the investigated strains were susceptible to erythromycin and gentamicin, whereas all the strains were resistant to ciprofloxacin and nalidixic acid. Secondly, all *C. jejuni* isolates were resistant to tetracycline, whereas only 16% of *C. coli* isolates were. Thirdly, all *C. coli* and 93% *C. jejuni* isolates were resistant to enrofloxacin. Finally, none of the strains showed multidrug resistance to three or more classes of antimicrobial drugs.

**Table. Results** of antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from turkeys

Antimicrobial drugs	<i>C. jejuni</i> (no. of isolates/total)			<i>C. coli</i> (no. of isolates/total)		
	S	I	R	S	I	R
Erythromycin	15/15	0/15	0/15	6/6	0/6	0/6
Gentamicin	15/15	0/15	0/15	6/6	0/6	0/6
Nalidixic acid	0/15	0/15	15/15	0/6	0/6	6/6
Enrofloxacin	1/15	0/15	14/15	0/6	0/6	6/6
Ciprofloxacin	0/15	0/15	15/15	0/6	0/6	6/6
Tetracycline	0/15	0/15	15/15	5/6	0/6	1/6

## Discussion and Conclusion

This study investigated the presence in turkey cecum samples from a slaughterhouse in Turkey of microbial resistance in thermotolerant *Campylobacter*. Domestic poultry are frequently infected with this species, primarily *C. jejuni* and *C. coli* (Sahin et al., 2002; Corry and Atabay, 2001), with *C. jejuni* being generally the most prevalent species of thermotolerant *Campylobacter* isolated from poultry (Rossler et al., 2019). In the present study, *C. jejuni* (15/21) was more prevalent than *C. coli* (6/21) in turkey cecum samples. Similar results have been reported from Turkey and other countries, where *C. jejuni* was the predominant *Campylobacter* species in broiler intestinal tracts, poultry meats, and at the end of slaughter lines (Yucel and Erguler, 2008; Bostan et al., 2009; Giacomelli et al., 2014; Ozbey and Tasdemi, 2014; Schreyer et al., 2022).

The development of antimicrobial resistance in thermotolerant *Campylobacter*, possibly due to widespread and overuse of antibiotics in animal husbandry, is a matter of great concern (Tadesse et al., 2011; Haldenby et al., 2020). Regardless of the source of *Campylobacter* spp., previous studies have shown that *C. coli* isolates have a higher prevalence of antimicrobial resistance to most antimicrobials than *C. jejuni* (Signorini et al., 2018; Schreyer et al., 2022). In the present study, *C. jejuni* and *C. coli* isolates were equally resistant to nalidixic acid and ciprofloxacin. However, *C. jejuni* isolates were more resistant to tetracycline, whereas *C. coli* isolates were more resistant to enrofloxacin (Table).

In Turkey, ciprofloxacin resistance has been reported in 25% (Yucel and Erguler, 2008) and 74.2% (Cokal et al., 2009) of *C. jejuni* isolates, and in 65.5% (Cokal et al., 2009) and 78.1% (Savasan et al., 2004) of *C. coli* isolates. According to the EFSA and CDC re-

port for 2019–2020, high resistance rates to ciprofloxacin of *C. jejuni* and *C. coli* (52.4–80.0%) isolated from different sources presented (EFSA, 2002). We found almost 100% ciprofloxacin resistance in both *C. jejuni* and *C. coli*, which is one of the highest percentages reported in Turkey or Europe.

We also found 100% resistance to nalidixic acid in both *C. jejuni* and *C. coli* isolates. Other studies in various countries have also reported high levels of resistance of *Campylobacter* isolates to fluoroquinolones (Maesaar et al., 2016; Raeisi et al., 2017). In addition, EFSA reported that nalidixic acid resistance is common among *Campylobacter* isolates in many European Union countries (EFSA, 2023).

Previous studies of tetracycline resistance in *C. jejuni* and *C. coli* isolates from broilers in Turkey have reported prevalences of 42%–76.3% (Yildirim et al., 2005; Cokal et al., 2009) and 58.1%–55.2% (Yildirim et al., 2005; Cokal et al., 2009), although Erdeger and Diker (1995) found lower resistance rates of 15.3% and 24.2% for *C. jejuni* and *C. coli*, respectively. They also found tetracycline resistance rates in *C. jejuni* and *C. coli* of 100% and 16%, respectively.

All the *Campylobacter* isolates in the present study were susceptible to erythromycin and gentamicin, probably because these antimicrobials are not used in Turkish poultry production. Other studies have reported similar results in Turkey and other countries (Yucel and Erguler, 2008; Abay et al., 2014; Giacomelli et al., 2014; Raeisi et al., 2017; Wozniak-Biel et al., 2018; Schreyer et al., 2022), with all isolates being susceptible to gentamicin and fewer than 5% of strains being resistant to erythromycin.

Several studies have reported multidrug resistance in *Campylobacter* species (Qin et al., 2023). Zhao et al. (2016) identified 13 multidrug resistance profiles in *C. jejuni* and *C. coli* isolates from different

types of samples (e.g., humans, chicken and turkey), while Schreyer et al. (2022) reported multidrug resistance in 72% of *C. coli* isolates and 69% of *C. jejuni* isolates. In the present study, however, we did not find multidrug resistance in *C. coli* and *C. jejuni* isolates from turkey samples.

Although the samples size was limited and obtained from a single slaughterhouse, this study showed that the sampled slaughter process line is often contaminated with thermotolerant *Campylobacter*. This represents a risk of infection to humans through inappropriate preparation of poultry meat. Our finding of high resistance rates to fluoroquinolones is also alarming because they are used for treating campylobacteriosis in human medicine. In addition, given our finding of a high prevalence of tetracycline resistance in *C. jejuni*, it is also essential to monitor for tetracycline-resistant *C. coli* because tetracycline is a second-line therapeutic agent in therapy of human campylobacteriosis. Since macrolides are not used in veterinary medicine in Turkey, we found very low resistance rates to these antibiotics. In short, to decrease antibiotic resistance prevalence in Turkey, it is essential to monitor antimicrobial resistance in *Campylobacter* species and ensure appropriate use of antimicrobials in animal-food production.

**Author Contribution:** The authors confirm contribution to the paper as follows: study conception and design: OK and IBM; data collection: OK; analysis and interpretation of results: OK and IBM; draft manuscript preparation: IBM. Both authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

**Conflict of interest:** None

**Funding:** None

## References

- Aarestrup FM, Engberg J. (2001). Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Vet Res.*32(3-4), 311-21. 10.1051/vetres:2001127
- Aarestrup FM, McDermott PF, Wegener HC. (2008). Transmission of Antibiotic Resistance from Food Animals to Humans. *Campylobacter, 3rd Edition*. 645-65. <https://doi.org/10.1128/9781555815554.ch36>
- Abay S, Kayman T, Otlu B, Hizlisoy H, Aydin F, Ertas N. (2014). Genetic diversity and antibiotic resistance profiles of *Campylobacter jejuni* isolates from poultry and humans in Turkey. *Int J Food Microbiol.* 178, 29-38. 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.003
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 45(4), 493-6.
- Beery JT, Hugdahl MB, Doyle MP. (1988). Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol.* 54(10), 2365-70. 10.1128/aem.54.10.2365-2370.1988
- Blaser MJ, Engberg J. (2008). Clinical Aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Infections. *Campylobacter, 3rd Edition*. 99-121. <https://doi.org/10.1128/9781555815554.ch6>
- Bostan K, Aydin A, Ang MK. (2009). Prevalence and antibiotic susceptibility of thermophilic *Campylobacter* species on beef, mutton, and chicken carcasses in Istanbul, Turkey. *Microbial Drug Res.* 15(2), 143-9. 10.1089/mdr.2009.0894
- Butzler JP. (2004). *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect.* 10(10), 868-76. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00983.x>
- CLSI. (2022). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 32nd ed CLSI supplement M100, USA.
- Cokal Y, Caner V, Sen A, Cetin C, Karagenc N. (2009). *Campylobacter* spp. and their Antimicrobial Resistance Patterns in Poultry: An Epidemiological Survey Study in Turkey. *Zoonose Public Health.* 56(3), 105-10. 10.1111/j.1863-2378.2008.01155.x
- Corry JEL, Atabay HI. (2001). Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *J Appl Microbiol.* 90, 96-114. 10.1046/j.1365-2672.2001.01358.x
- Domingues AR, Pires SM, Halasa T, Hald T. (2012). Source attribution of human campylobacteriosis using a meta-analysis of case-control studies of sporadic infections. *Epidemiol Infect.* 140(6), 970-81. 10.1017/S0950268811002676
- Erdeger J, Diker KS. (1995). Multiple antibiotic resistance in poultry isolates of *Campylobacter*. *Ankara Univ Vet Fak Derg.* 42, 543-6. [https://doi.org/10.1501/Vetfak\\_0000000749](https://doi.org/10.1501/Vetfak_0000000749)
- European Food Safety A, European Centre for Disease P Control. (2002). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA J.* 20(12), e07666. 10.2903/j.efsa.2022.7666
- European Food Safety A, European Centre for Disease P, Control. (2020). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA J.* 18(3), e06007. 10.2903/j.efsa.2020.6007
- European Food Safety Authority, Control ECfDP. (2022). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019-2020. *EFSA J.* 20(3), e07209. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7209>
- European Food Safety Authority, Control ECfDP. (2023). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021. *EFSA J.* 21(3), e07867. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7209>
- Giacomelli M, Salata C, Martini M, Montesissa C, Piccirillo A. (2014). Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry in Italy. *Microb Drug Resist.* 20(2), 181-8. <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0110>
- Gillespie IA, O'Brien SJ, Frost JA, Adak GK, Horby P, Swan AV, Painter MJ, Neal KR. (2002). A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypotheses. *Emerg Infect Dis.* 8(9), 937-42. 10.3201/eid0809.10.3201/eid0809.010187
- Haldenby S, Bronowski C, Nelson C, Kenny J, Martinez-Rodriguez C, Chaudhuri R, Williams NJ, Forbes K, Strachan NJ, Pulman J, Winstanley IN, Corless CE, Humphrey TJ, Bolton FJ, O'Brien SJ, Hall N, Hertz-Fowler C, Winstanley C. (2020). Increasing prevalence of a fluoroquinolone resistance mutation amongst *Campylobacter jejuni* isolates from four human infectious intestinal disease studies in the United Kingdom. *Plos One.*15(1), e0227535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227535>

- Herman L, Heyndrickx M, Grijspeerdt K, Vandekerchove D, Rollier I, Zutter LD. (2003). Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiol Infect.* 131(3), 1169-80. 10.1017/S0950268803001183
- ISO. (2017). Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Detection method. ISO 10272-1: 20170222.
- Louwen R, van Baarlen P, van Vliet AH, van Belkum A, Hays JP, Endtz HP. (2012). *Campylobacter* bacteremia: a rare and under-reported event? *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2(1), 76-87. 10.1556/EuJMI.2.2012.1.11
- Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q. (2009). Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiol.* 4(2), 189-200. 10.2217/17460913.4.2.189
- Maesaar M, Kramarenko T, Meremae K, Sogel J, Lillenberg M, Hakkinen L, Ivanova M, Kovalenko K, Hörman A, Hanninen ML, Roasto M. (2016). Antimicrobial Resistance Profiles of *Campylobacter* spp. Isolated from Broiler Chicken Meat of Estonian, Latvian and Lithuanian Origin at Estonian Retail Level and from Patients with Severe Enteric Infections in Estonia. *Zoonoses Public Health.* 63(2), 89-96. 10.1111/zph.12208
- Moore JE, Barton MD, Blair IS, Corcoran D, Dooley JSG, Fanning S, Kempf I, Lastovica AJ, Lowery CJ, Matsuda M, McDowell AD, McMahon A, Millar BC, Rao, JR, Rooney PJ, Seal BS, Snelling WJ, Tolba O. (2006). The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes Infect.* 8(7), 1955-66. 10.1016/j.micinf.2005.12.030
- Ozbey G, Tasdemi B. (2014). Seasonality and antibiotic resistance of *Campylobacter* in Turkish chicken meat. *Vet Ital.* 50(4), 277-83. 10.12834/VetIt.170.2543.1
- Payot S, Dridi S, Laroche M, Federighi M, Magras C. (2004). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated from fattening pigs in France. *Vet Microbiol.* 101(2), 91-9. 10.1016/j.vetmic.2004.03.014
- Qin X, Wang X, Shen Z. (2023). The rise of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Curr Opin Gastroenterol.* 39(1), 9-15. 10.1097/MOG.0000000000000901
- Raeisi M, Khoshbakht R, Ghaemi EA, Bayani M, Seyedghasemi NS, Shirzas-Aski H. (2017). Antimicrobial Resistance and Virulence-Associated Genes of *Campylobacter* spp. Isolated from Raw Milk, Fish, Poultry, and Red Meat. *Microb Drug Res.* 23(7), 925-33. 10.1089/mdr.2016.0183
- Rosler E, Signorini ML, Romero-Scharpen A, Soto LP, Berisvil A, Zimmermann JA, Fusari ML, Olivero C, Zbrun MV, Frizzo LS. (2019). Meta-analysis of the prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in food-producing animals worldwide. *Zoonoses Public Health.* 66(4), 359-69. 10.1111/zph.12558
- Sahin O, Morishita TY, Zhang Q. (2002). *Campylobacter* colonization in poultry: sources of infection and modes of transmission. *Anim Health Res Rev.* 3(2), 95-105. 10.1079/ahrr200244
- Savasan S, Ciftci A, Diker KS. (2004). Emergence of quinolone resistance among chicken isolates of *Campylobacter* in Turkey. *Turkish J Vet Anim Sci.* 28(2), 391-7.
- Schreyer ME, Olivero CR, Rosler E, Soto LP, Frizzo LS, Zimmermann JA, Signorini ML, Virginia ZM. (2022). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* identified in a slaughterhouse in Argentina. *Curr Res Food Sci.* 5, 590-7. 10.1016/j.crfs.2022.03.005
- Shen ZQ, Wang Y, Zhang QJ, Shen JZ. (2018). Antimicrobial Resistance in *Campylobacter* spp. *Microbiol Spect.* 6(2). 10.1128/microbiolspec.ARBA-0013-2017
- Signorini ML, Rosler E, Diaz David DC, Olivero CR, Romero-Scharpen A, Sptp LP, Astesana DM, Berisvil AP, Zimmermann JA, Fusari ML, Frizzo LS, Zbrun MV. (2018). Antimicrobial Resistance of Thermotolerant *Campylobacter* Species Isolated from Humans, Food-Producing Animals, and Products of Animal Origin: A Worldwide Meta-Analysis. *Microb Drug Res.* 24(8), 1174-90. 10.1089/mdr.2017.0310
- Sylte MJ, Inbody MH, Johnson TA, Looft T, Line JE. (2018). Evaluation of different *Campylobacter jejuni* isolates to colonize the intestinal tract of commercial turkey poults and selective media for enumeration. *Poult Sci.* 97(5), 1689-98. <https://doi.org/10.3382/ps/pex384>
- Sylte MJ, Johnson TA, Meyer EL, Inbody MH, Trachsel J, Looft T, Susta L, Wu Z, Zhang Q. (2019). Intestinal colonization and acute immune response in commercial turkeys following inoculation with *Campylobacter jejuni* constructs encoding antibiotic-resistance markers. *Vet Immunol Immunopathol.* 210, 6-14. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.02.003>
- Tadesse DA, Bahnson PB, Funk JA, Thakur S, Morrow WE, Wittum T, DeGravas F, Rajala-Schultz P, Gebreyes WA. (2011). Prevalence and antimicrobial resistance profile of *Campylobacter* spp. isolated from conventional and antimicrobial-free swine production systems from different U.S. regions. *Foodborne Pathog Dis.* 8(3), 367-74. 10.1089/fpd.2010.0665
- Tauxe RV. (1992). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Infection in the United States and Other Industrialized Nations. Nac-hamkin I, Blaser MJ, Tompkins LS. Eds. *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*. Washington DC, USA. p.9-19.
- Wagenaar JA, French NP, Havelaar AH. (2013). Preventing *Campylobacter* at the Source: Why Is It So Difficult? *Clin Infect Dis.* 57(11), 1600-6. <https://doi.org/10.1093/cid/cit555>
- Wieczorek K, Osek J. (2013). Antimicrobial Resistance Mechanisms among *Campylobacter*. *BioMed Res Int.* 340605. 10.1155/2013/340605
- Wozniak-Biel A, Bugla-Ploskonska G, Kielsznia A, Korzekwa K, Tobiasz A, Korzeniowska-Kowal A, Wieliczko A. (2018). High Prevalence of Resistance to Fluoroquinolones and Tetracycline *Campylobacter* Spp. Isolated from Poultry in Poland. *Microb Drug Res.* 24(3), 314-22. 10.1089/mdr.2016.0249
- Yildirim M, Istanbuluoglu E, Ayvali B. (2005). Prevalence and antibiotic susceptibility of thermophilic *Campylobacter* species in broiler chickens. *Turkish J Vet Anim Sci.* 29(3), 655-60.
- Yucel N, Erguler O. (2008). Prevalence and resistance to antibiotics of *Campylobacter* spp. isolated from chicken meat in the central area of Turkey. *Archiv für Lebensmittelhygiene.* 59(5), 170-4.
- Zhao S, Tyson GH, Chen Y, Li C, Mukherjee S, Young S, Lam C, Folster JP, Whichard JM, McDermott PF. (2016). Whole-Genome Sequencing Analysis Accurately Predicts Antimicrobial Resistance Phenotypes in *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol.* 82(2), 459-66. 10.1128/AEM.02873-15



## Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in shelter cats in Erzurum province of Türkiye

Başak Hanedan<sup>1\*</sup>, Cahit Babür<sup>2</sup>, Muhammed Sertaç Eroğlu<sup>3</sup>,  
Selin Sinem Sümbül<sup>4</sup>, Ömer Alkan<sup>5</sup>

<sup>1,3,4</sup> Atatürk University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Internal Medicine, Erzurum, Türkiye  
<sup>2</sup> Department of National Parasitology Reference Laboratory, Public Health General Directorate of Turkey, Ankara, Türkiye  
<sup>5</sup> Atatürk University Faculty of Economics and Administrative Sciences, Department of Econometrics, Erzurum, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 04.10.2023, Kabul Tarihi / Accepted: 06.12.2023

**Abstract:** This study was aimed to evaluate the seroprevalence and risk factors of the infection of *Toxoplasma gondii* in cats kept in Animal Shelter and Rehabilitation Center of Erzurum Municipality in Erzurum that collected from stray. Total 70 blood samples were collected from apparently healthy cats and diseased cats such as diarrhea, and ocular and nasal discharge. Sera samples were stored in screw-capped sterile tubes at -20 °C until analysis. In sera samples, IgG antibodies against *T. gondii* were analyzed by Sabin-Feldman Dye test. Of 70 cats, 25 (35.7%) was negative and 45 (64.3%) positive for *T. gondii* infection. An important association was not found between young and adult, female and male, and apparently healthy and diseased cats with *T. gondii* seropositivity. In this study, *T. gondii* seroprevalence was determined at high rates in cats kept in shelter in Erzurum province of Turkey. The prevention measures against *T. gondii* infection in cats should be implemented for animal and public health concerns.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, risk factors, seroprevalence, cat

### Türkiye'nin Erzurum ilinde barınak kedilerinde *Toxoplasma gondii* enfeksiyonu için seroprevalans ve risk faktörleri

**Özet:** Bu çalışmada Erzurum ilinde sokaktan toplanan Erzurum Büyükşehir Belediye'sine ait Hayvan Bakımevi ve Rehabilitasyon Merkezi'nde bakılan kedilerde *Toxoplasma gondii* enfeksiyonunun seroprevalansı ve risk faktörlerinin araştırılması amaçlandı. İshal ve göz ve burun akıntısı gibi hastalıklı kediler ve görünüşte sağlıklı kedilerden toplam 70 kan örneği toplandı. Serum örnekleri vida kapaklı steril tüplerde analize kadar -20 °C'de saklandı. Serum örneklerinde *T. gondii*'ye karşı IgG antikorları Sabin-Feldman Dye testi ile analiz edildi. *T. gondii* enfeksiyonu için 70 kedinin 25'i (%35,7) negatif ve 45'i (%64,3) pozitif idi. *T. gondii* seropozitifliğiyle genç ve erişkin, dişi ve erkek ve görünüşte sağlıklı ve hasta kediler arasında önemli bir ilişki belirlenmedi. Bu çalışmada Türkiye'nin Erzurum ilinde barınakta bakılan kedilerde *T. gondii* seroprevalansı yüksek oranlarda belirlendi. Kedilerde *T. gondii* enfeksiyonuna karşı korunma önlemlerinin hayvan ve halk sağlığı sorunları bakımından uygulanması gerekmektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Toxoplasma gondii*, risk faktörleri, seroprevalans, kedi

## Introduction

Toxoplasmosis is a protozoan disease occurring in animals and humans all over the world. *Toxoplasma (T.) gondii* is a coccidian parasite that can infect almost all animals. Oocysts are shed in cat feces. Oocysts are sporulated 1-5 days after they are shed with feces (Datz and Evason 2020). They can survive in the environment for months or even years. The soil contamination with oocysts indicates ongoing contamination (Awobode et al., 2020).

Toxoplasmosis is widespread throughout the world, is more common in temperate and tropical climates and less common in dry and cold climates

(Datz and Evason 2020). Cats infected with *T. gondii* are likely to have lifelong tissue cysts. Therefore, the presence of serum antibodies is likely to indicate the current infection. Since the risk of exposure increases over time, the increase in seroprevalence is correlated with advancing age (Lappin 2014).

Common clinical findings are anorexia, weakness, fever, respiratory distress, diarrhea, gastritis and neurological disorders (Lappin 2014; Datz and Evason 2020). In addition, lethal toxoplasmosis occurs when the liver, lung, central nervous system and pancreatic tissues are affected (Lappin 2014).

**Yazışma adresi / Correspondence:** Başak Hanedan, Atatürk University Campus Veterinary Faculty, Yakutiye, Erzurum, Türkiye  
e-mail: [basak.hanedan@atauni.edu.tr](mailto:basak.hanedan@atauni.edu.tr)

**ORCID IDs of the authors:** <sup>1</sup>0000-0003-3873-0124 • <sup>2</sup>0000-0002-6524-3260 • <sup>3</sup>0000-0003-1061-8421 • <sup>4</sup>0000-0002-8680-5402  
<sup>5</sup>0000-0002-3814-3539

Toxoplasmosis in humans is caused by exposure to the contaminated meat or infected cat feces (Dijurkovic-Djakovic et al., 2019), as well as by drinking contaminated water, eating fruits and vegetables contaminated with spore-forming oocysts (Dubey 2009). Especially, the feces of infected cats are an important source of contamination (Montazeri et al., 2020). After transplacental infection in humans, it poses a significant risk in the fetuses and immunocompromised patients. Most people become infected by eating spore-forming oocysts or tissue cysts or transplacentally (Lappin 2014).

*T. gondii* seroprevalence was reported to be 5.6%-6.7% in shelter cats in different years in Japan (Oi et al., 2015), 64.48% in stray cats in Iran (Tehrani-Sharif et al., 2015), 19.2% in shelter cats in Scotland (Bennett et al., 2011), 44.1% in cats with free-roaming and indoor in Kars, Turkey (Erkılıç et al., 2016), 41.0% in pet cats in Norway (Saevik et al., 2015), 52.8% in stray cats in Ankara, Turkey (Özkan et al., 2008), 76.4% in stray cats in Niğde (Karatepe et al., 2008), 32.11% in domestic and feral cats in South Africa (Tagwireyi et al., 2019), 14.1% in stray cats in Korea (Par et al., 2020), 86.7% in stray cats in Nigeria (Awobode et al., 2020), and 35% and %59 in domestic and feral cats globally, respectively (Montazeri et al., 2020).

An important risk factor in cats is hunting behavior and ingestion of prey. Eating raw or undercooked meat is also a common mode of transmission. Seroprevalence is higher in adult cats, in free-roaming cats, and in shelter cats (Datz and Evason 2020).

Exposure to cats and litter boxes is thought to be an important risk factor for humans (Datz and Evason 2020). Since cats are in close contact with humans, cats are potential sources of *T. gondii* (Oi et al., 2015). Toxoplasmosis is a zoonotic parasitic disease that is common in animals and humans around the world (Bilgili and Hanedan 2019). It has been reported that more than 1 billion people in the world are infected with *T. gondii* (Hoffmann et al., 2012). Therefore, in order to protect human and animal health, there is a need to know the current situation of toxoplasmosis in cats in our country and to implement ways to prevent this disease.

In Turkey, less studies on the seroprevalence of *T. gondii* in cats are carried out and one study on risk factors is observed (Yücesan et al., 2019). In this study, it was aimed to investigate the seroprevalence and risk factors of *T. gondii* infection in shelter cats in Erzurum, Turkey.

## Materials and methods

### Animal material

This study was funded by Atatürk University Scientific Research Projects Coordination Unit on 30.09.2021 with the code TKP-2021-9600. In addition, this study was approved by Atatürk University Animal Experiments Local Ethics Committee (27.05.2021/119). In this study, blood samples were collected from 70 cats living in Animal Shelter and Rehabilitation Center of Erzurum Municipality in Erzurum, Turkey, were centrifuged, and sera samples were stored in screw-capped sterile tubes at -20°C until analysis. In the sera samples, IgG antibodies against *T. gondii* were analyzed by Sabin-Feldman Dye test. Young or adult, gender, breed, feeding regimens, place where they were brought, and apparently healthy or diseased conditions for each animal were noted. They were crossbreed and stray cats.

### Sabin-Feldman Dye test

The seropositivity of *T. gondii* in cats was analyzed by the Sabin-Feldman Dye Test (SFDT) (Sabin and Feldman 1948; Katsube et al., 1972). In the analysis, the dilutions of positive and negative controls and the test sera were performed using 0.9% saline in a 4-fold serial dilutions (1:4-1:1,024). After diluted, 25 µl was transferred to a tube and an equal volume of activator serum rich in C2, C3, C4 and properdin was added. After 48 hours, tachyzoites (creating a density of approximately 25 tachyzoites per 400x microscope field) were added to each tube. The incubation of tubes were carried out at 37°C for 50 min. Afterwards, an additional 10 min incubation at 37°C was performed in the presence of 25 µl of alkaline methylene blue (pH 11). After incubation, 20 µl of each sample was examined at a 40x objective. If more than 50% of the observed *T. gondii* tachyzoites remained unstained, dilutions were considered positive.

### Statistical analysis

Frequency analyzes related to the seropositivity status of cats were calculated. Chi-square independence test was used to investigate the association between risk factors and seropositivity status.

## Results

Of 70 cats, 25 (35.7%) were negative and 45 (64.3%) were positive for *T. gondii* seropositivity. The frequency and percentage distributions of cats according to *T. gondii* seropositivity titers are given in Table 1.

The associations between cats' *T. gondii* seropositivity status and risk factors were given in Table 2. Cats were classified according to age as young and adult. Of the youngs, 19 were positive, 14 were negative, and 26 of the adult cats were positive and 11 were negative. 21 of the female cats were positive, 14 were negative. 24 of the male cats were positive and 11 were negative. Of the ill cats, 20 were positive and 11 were negative, and 25 of the apparently healthy cats were positive and 14 were negative. It was determined that there was no significant relationship between *T. gondii* seropositivity and age, gender and health status.

**Table 1.** Frequency and percentage distributions of cats according to *T. gondii* seropositivity titers

Titer	Frequency	Percent (%)
1/16	35	50
1/64	7	10
1/256	3	4.3
Negative	25	35.7

**Table 2.** Results of associations between *T. gondii* seropositivity and risk factors

Variable	Category	Positive	Negative	Total	Prevalence (%)
Age	Young	19	14	33	57.6
	Adult	26	11	37	70.3
P = 0.26; df = 1; chi square value = 1.224					
Gender	Female	21	14	35	60.0
	Male	24	11	35	68.6
P = 0.45; df = 1; chi square value = 0.560					
Status of health	Apparently healthy	25	14	39	64.1
	ill	20	11	31	64.5
P = 0.97; df = 1; chi square value = 0.001					

## Discussion and Conclusion

This study was first on *T. gondii* seropositivity and risk factors in shelter cats in Erzurum, Turkey. The seroprevalence of *T. gondii* in shelter cats in Erzurum, Turkey was determined to be 64.3%. The seroprevalence rate in shelter cats in this study was higher than 44.1% in cats with outdoor access in Kars city (Erkiliç et al., 2016), 52.8% in stray cats in Ankara city (Özkan et al., 2008), 42-48% in 1021 apparently healthy stray cats and 37.84% in stray cats in İzmir city (Can et al., 2014; Karakavuk et al., 2021), but was lower than 76.4% in stray cats in Nigde city (Karatepe et al., 2008).

In the studies investigating the seropositivity of *T. gondii* in cats around the world, the seroprevalences of infection have been reported to be 64.48% in stray cats in Iran (Tehrani-Sharif et al., 2015), 86.7% in stray cats in Nigeria (Awobode et al., 2020), 82% in feral cats in Qatar (Boughattas et al., 2017), 57.1% in shelter cats in Estonia (Must et al., 2015), 22.3% in stray cats in Greece (Kokkinaki et al., 2023), 20.9% in stray cats in China (Xia et al., 2022), and 14.1% in stray cats in Korea (Park et al., 2020). In addition, globally, the seroprevalence of *T. gondii* has been

determined to be 4.8% to 97.4% in domestic cats (Jittapalapong et al., 2010; Al-Kappany et al., 2010).

Accordingly, *T. gondii* seropositivity is appeared to be high in stray cats in Turkey and in many countries in the world. In this study, when the positivity titers of infected cats were examined, it was determined that there were 35 cats with 1/16 titer, 7 cats with 1/64 titer and 3 cats with 1/256 titer. High-titer antibody responses do not always require cats to have been recently infected (Afonso et al., 2007).

Cat species are highly susceptible to *T. gondii* infection and a single tissue cyst bradyzoite can cause infection (Dubey 2009). Raw or undercooked food and hunting rodents and birds are the important risk factors (Saevik et al., 2015).

In this study, no significant association was found between *T. gondii* seropositivity and gender in cats consistent with the study by Boughattas et al. (2017) in stray cats in Qatar. However, Saevik et al. (2015) have reported a significant association with seropositivity in male cats compared to female cats. Finding different results between infection positivity and gender in different studies may be due to the geographical region studied, study population, and



statistical methods (Jittapalapong et al., 2007; Saevik et al., 2015), as well as male cats hunting more and exposure to infection more (Afonso et al., 2007).

In this study, no significant association was found between *T. gondii* infection positivity and age consistent with the study implemented in stray cats by Matsuu et al. (2017) in Japan. However, in other studies, it has been reported that infection positivity increases significantly in adult cats (Tehrani-Sharif et al., 2015; Must et al., 2015; Bawm et al., 2020). In this study no significance between age and seropositivity might be attributed to similar exposure of *T. gondii* via ingesting oocysts and/or tissue cysts in youngs and adults living outdoors or IgG positivity of *T. gondii* in youngs until 12 weeks of age might be derived from colostral IgG transfer (Gauss et al., 2003; Kokkinaki et al., 2023) or transplacental infection (Xia et al., 2022).

It can be expected that aging, free-roaming and hunting behavior in cats would increase infection rates. Similarly, Brennan et al. (2020) have found the risk factors for *T. gondii* infection in cats as older than 1 year, eating raw meat, and hunting behaviors. Eating cystic meat containing *T. gondii* bradyzoites causes an increase in the infection rates (Salman et al., 2018).

In this study, no significant association was found between the health status of cats and *T. gondii* positivity. Consistent with this study, Saevik et al. (2015) have reported that they do not detect a significant relationship between *T. gondii* positivity and health status in cats. The rates of seropositivity prevalence in apparently healthy and diseased cats (diarrhea and/or respiratory problems) were highly increased as 64.1% and 64.5%, respectively.

As the infected cats shed *T. gondii* oocysts with feces, they cause contamination of soil and water and health problems in animals and humans (Bawm et al., 2020). Cats develop antibodies against *T. gondii* 1-2 weeks after infection (Dubey and Lappin 2012). Therefore, it is important to investigate the presence of *T. gondii* in feces, body fluids, tissue samples and antibodies in serum together in the evaluation of *T. gondii* infections in cats. Investigation of *T. gondii* oocysts in the feces of cats with high-sensitivity techniques such as PCR, colorimetric loop-mediated isothermal magnification analysis (Karakavuk et al., 2022) and making the necessary treatments of positive cases are important in protecting other vertebrate animals and humans against *T. gondii* infections.

In this study, *T. gondii* seroprevalence was determined at high levels in cats living in shelter in Erzurum, Turkey. This suggests that the distribution of *T. gondii* oocysts is prevalent in the environment. The prevention measures against *T. gondii* infection in cats should be implemented.

**Acknowledgments:** The authors thank Atatürk University Scientific Research Projects Coordination Unit that funded this study.

**Conflict of Interest:** This study authors have no conflicts of interest.

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by Atatürk University Animal Experiments Local Ethics Committee (27.05.2021/119).

## References

- Afonso E, Thulliez P, Pontier D, Gilot-Fromont E. (2007) Toxoplasmosis in prey species and consequences for prevalence in feral cats: not all prey species are equal. *Parasitology* 2007, 134(Pt.14), 1963-1971.
- Al-Kappany YM, Rajendran C, Ferreira LR, Kwok OCH, Abu-Elwafa SA, Hilali M, Dubey JP. (2010) High prevalence of toxoplasmosis in cats from Egypt: isolation of viable *Toxoplasma gondii*, tissue distribution, and isolate designation. *J Parasitol.* 96(6), 1115-1118.
- Awobode HO, Ohiolele JA, Adekeye TA, Adeyi AO, Anumudu CI. (2020) Shedding proportion of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in feral cats and soil contamination in Oyo State, Nigeria. *Parasite Epidemiol Control* 11, e00181.
- Bennett AD, Gunn-Moore DA, Brewer M, Lappin MR. (2011) Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasmas and *Toxoplasma gondii* in cats in Scotland. *J Feline Med Surg.* 13(8), 553-557.
- Bilgili A, Hanedan B. (2019) Importance of toxoplasmosis for human and animal health, present condition, problems and solution proposals in Turkey and the world. *WJARR.* 4, 61-74.
- Bawm S, Phyu AZ, Chel HM, Htun LL, Nakao R, Katakura K. (2020) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in household cats in Myanmar and molecular identification of parasites using feline faecal oocysts. *Food Waterborne Parasitol.* 20, e00094.
- Boughattas S, Behnke J, Sharma A, Abu-Madi M. (2017) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in feral cats in Qatar. *BMC Vet Res.* 13, 26.
- Brennan A, Hawley J, Dhand N, Boland L, Beatty JA, Lappin MR, Barrs VR. (2020) Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in owned domestic cats in Australia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 20 (4), 275-280.
- Can H, Döşkaya M, Ajzenberg D, Özdemir HG, Caner A, İz SG, Döşkaya AD, Atalay E, Çetinkaya Ç, Ürgen S, Karaçalı S, Ün C, Darde M-L, Gürüz Y. (2014) Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates and toxoplasmosis seroprevalence in stray cats of Izmir, Turkey. *PLoS One* 9(8), e104930.
- Datz C, Evason M. (2020) *Toxoplasma gondii* (Toxoplasmosis). In: Weese JS, Evason M. (eds). *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* 1st ed. CRC Press, Taylor and Francis Group, p. 282-286.
- Dijurkovic-Djakovic O, Dupouy-Camet J, Van der Giessen J, Dubey JP. (2019) Toxoplasmosis: overview from a One Health perspective. *Food Waterborne Parasitol.* 15, e00054.
- Dubey JP. (2009) History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 39, 877-882.

- Dubey JP, Lappin MR. (2012) Chapter 79. Toxoplasmosis and neosporosis. In: Greene CE (ed.). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th ed. Elsevier Saunders, USA, p. 806-821.
- Erkiliç EE, Mor N, Babür C, Kirmızıgül AH, Beyhan YE. (2016) The seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from the Kars Region, Turkey. *IJVM*. 71, 31-35.
- Gauss CBL, Almería S, Ortuño A, Garcia F, Dubey JP. (2003) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from Barcelona, Spain. *J Parasitol*. 89(5), 1067-1068.
- Gilot-Fromont E, Lélou M, Dardé ML, Richomme C, Aubert D, Afonso E., Mercier A, Gotteland C, Villena I. (2012). The life cycle of *Toxoplasma gondii* in the natural environment. *Toxoplasmosis-Recent Advances* 10, 10-34.
- Hoffmann S, Batz MB, Morris JG Jr. (2012) Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *J Food Prot*. 75, 1292-1302.
- Jittapalabong S, Nimsupan B, Pinyopanuwat N, Chimnoi W, Kabeya H, Maruyama S. (2007) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in stray cats and dogs in the Bangkok metropolitan area, Thailand. *Vet Parasitol*. 145 (1-2), 138-141.
- Jittapalabong S, Inpankaew T, Pinyopanuwat N, Chimnoi W, Kengradomkij C, Wongnarkpet S, Maruyama S, Lekkla A, Sukthana Y. (2010) Epidemiology of *Toxoplasma gondii* infection of stray cats in Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 41(1), 13-18.
- Karakavuk M, Can H, Selim N, Yeşilsiraz B, Atlı E, Şahar EA, Demir F, Gül A, Özdemir HG, Alan N, Yalçın M, Özkurt O, Aras M, Çelik T, Can Ş, Döşkaya AD, Gürüz AY, Döşkaya, M. (2021) Investigation of the role of stray cats for transmission of toxoplasmosis to humans and animals living in Izmir, Turkey. *J Infect Dev Ctries*. 15 (1), 155-162.
- Karakavuk M, Can H, Karakavuk T, Gül A, Alak SE, Gül C, Ün C, Gürüz AY, Döşkaya M, Döşkaya AD. (2022) Rapid detection of *Toxoplasma gondii* DNA in cat feces using colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays targeting RE and B1 genes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 81, 101745.
- Karatepe B, Babür C, Karatepe M, Kiliç S, Dündar B. (2008) Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies and intestinal parasites in stray cats from Niğde, Turkey. *Ital J Anim Sci*. 7, 113-118.
- Katsube Y, Hagivara T, Imaizumi K. (1972) Reliability of the dye and modified hemagglutination test for the latent infection of *Toxoplasma*. *Nihon Juigaku Zasshi*. 34(3), 123-133.
- Kokkinaki KCG, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Xenoulis PG. (2023) Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* Infection in cats from Greece. *Animals*, 13(7), 1173.
- Lappin MR. (2014) Chapter 72: Toxoplasmosis. In: Sykes JE (ed.). *Canine and Feline Infectious Diseases*. 1st ed. Elsevier, Saunders, p. 693-703.
- Matsuu A, Yokota SI, Ito K, Masatani T. (2017) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free-ranging and feral cats on Amami Oshima Island, Japan. *J Vet Med Sci*. 79(11), 1853-1856.
- Montazeri M, Mikaeili Galeh T, Moosazadeh M, Sarvi S, Dodangeh S, Javidnia J, Sharif M, Daryani A. (2020) The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in felids during the last five decades (1967-2017): a systematic review and meta analysis. *Parasit Vectors*. 13, 82.
- Must K, Lassen B, Jokelainen P. (2015) Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in cats in Estonia. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 15(10): 597-601.
- Oi M, Yoshikawa S, Maruyama S, Nogami S. (2015) Comparison of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in shelter cats and dogs during 1999-2001 and 2009-2011 in Tokyo, Japan. *PLoS One* 10:e0135956.
- Özkan AT, Çelebi B, Babür C, Lucio-Forster A, Bowman DD, Lindsay DS. (2008) Investigation of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cats of the Ankara region of Turkey using the Sabin-Feldman Dye test and an indirect fluorescent antibody test. *J Parasitol*. 94, 817-820.
- Park Y, Noh J, Seo HJ, Kim KH, Min S, Yoo MS, Yun BR, Kim JH, Choi EJ, Cheon DS, Hong SJ, Yoon SS, Cho YS. (2020) Seroprevalence and B1 gene phylogeny of *Toxoplasma gondii* of dogs and cats in Republic of Korea. *Korean J Parasitol*. 58(3), 257-265.
- Sabin AB, Feldman A. (1948) Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science* 108(2815), 660-663.
- Saevik BK, Krontveit RI, Eggen KP, Malmberg N, Thoresen SI, Prestrud KW. (2015) *Toxoplasma gondii* seroprevalence in pet cats in Norway and risk factors for seropositivity. *J Feline Med Surg*. 17, 1049-1056.
- Salman D, Pumidonming W, Oohashi E, Igarashi M. (2018) Prevalence of *Toxoplasma gondii* and other intestinal parasites in cats in Tokachi sub-prefecture, Japan. *J Vet Med Sci*. 80(6), 960-967.
- Tagwireyi WM, Etter E, Neves L. (2019) Seroprevalence and associated risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in domestic animals in southeastern South Africa. *Onderstepoort J Vet Res*. 86, e1-e6.
- Tehrani-Sharif M, Jahan S, Alavi SM, Hodami M. (2015) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies of stray cats in Garmsar, Iran. *J Parasit Dis*. 39, 306-308.
- Xia N, Ji N, Li L, Huang Y, Yang C, Guo X, Guo Q, Shen B, Xiao L, Feng Y. (2022) Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* in urban cats from China. *BMC Vet Res*. 18(1), 331.
- Yücesan B, Babür C, Koç N, Sezen F, Kılıç S, Gürüz Y. (2019). Ankara yöresindeki kedilerde 2016 yılında Sabin-Feldman Dye testi (SFDT) ile anti-*Toxoplasma gondii* antikorlarının araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg*. 43(1), 5.



## Microbiological quality of some artisanal Italian cheeses retailed in the Turkish market

Tahsin Onur Kevenk<sup>1\*</sup>, Ahmet Koluman<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Aksaray, Türkiye  
<sup>2</sup>Pamukkale University, Faculty of Technology, Department of Biomedical Engineering, Denizli, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 08.09.2023, Kabul Tarihi / Accepted: 07.11.2023

**Abstract:** Three types of imported Italian cheeses (mozzarella, Parmigiano, and robiola) were evaluated for microbiological qualities in this study with the methods offered by ISO. The existence of *S. aureus*, *L. monocytogenes*, Coliform bacteria, *E. coli*, *C. perfringens*, *Salmonella*, Yeast, Mold, and *Staphylococcal* enterotoxins was investigated in 120 (40 each) samples. *L. monocytogenes* and *Salmonella* were not detected. The VIDAS SET2 technique searched *Staphylococcal* enterotoxins, and no toxin was spotted. The count of *S. aureus*, Coliform bacteria, *E. coli*, *C. perfringens*, Yeast, and Mold was found under the toleration limits in all 120 samples ( $P < 0.001$ ). The use of good quality raw materials, low bacterial load at the beginning of production and respect for the principles of good manufacturing practices are known as essential steps to obtain quality products in every respect. The samples we analysed in our study were found to be valuable in terms of public health.

**Keywords:** Food-borne Pathogens, Mozzarella, Parmigiano, Public Health, Robiola

### Türkiye’de perakende olarak satışa sunulan bazı el yapımı İtalyan peynirlerinin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi

**Özet:** Bu çalışmada, ülkemizde satışa sunulan ve en çok tüketilen üç tip İtalyan peynirinin (mozzarella, Parmesan ve robiola) mikrobiyolojik kalitesi ISO (International Organization for Standardization) tarafından belirlenmiş standartlarla değerlendirilmiştir. Her biri 40’ar adet olmak üzere toplam 120 örnekte *S. aureus*, *L. monocytogenes*, Koliform bakterileri, *E. coli*, *C. perfringens*, *Salmonella*, Maya, Küf ve Stafilokokal enterotoksinlerin varlığı araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, numunelerde *L. monocytogenes* ve *Salmonella* tespit edilmemiştir. Stafilokokal enterotoksinler, VIDAS SET2 tekniği araştırılmış ve benzer şekilde toksin varlığı tespit edilememiştir. 120 örneğin tamamında ise *S. aureus*, Koliform bakterileri, *E. coli*, *C. perfringens*, Maya ve Küf sayıları yasal tolerans sınırlarının altında bulunmuştur ( $P < 0,001$ ). Kaliteli hammadde kullanımı, üretimin başlangıcında düşük bakteri yükü ve iyi üretim uygulamaları ilkelerine uyulması, her açıdan kaliteli ürün elde etmenin vazgeçilmez adımları olarak bilinmektedir. Çalışmamızda analiz ettiğimiz örneklerin halk sağlığı açısından risk oluşturmadığı ve hijyenik olarak değerli olduğu görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Gıda Kaynaklı Patojenler, Halk Sağlığı, Mozzarella, Parmesan, Robiola

### Introduction

Cheese is defined as a dairy-based fermented food and is known as a highly nutritious dairy product with thousands of varieties according to the region of production, production technique, type of milk, ethnic and social characteristics. At the same time, another reason for this variousness has been reported as having different physical, chemical, and sensory qualities thanks to the rich bacterial flora it contains. This rich bacterial flora is a significant supporter of the scented sensory attributes of the various cheese types owing to their complicated interaction with milk proteins, carbohydrates and fats that mainly appear in an essential technologi-

cal procedure in cheese production, understood as “ripening” (Forde ve Fitzgerald, 2000; Gülhan, 2023a; Khattab et al., 2019).

Ripening is known as one of the critical stages in cheese production technology in terms of providing variety and developing various savours. At this stage, cheese types with different textural properties are obtained thanks to the flavouring substances produced as a result of the biochemical and microbiological reactions carried out by the starter cultures (Akarca et al., 2015; Fox, McSweeney and Paul, 1998; Gülhan, 2023b). Briefly, it has been reported that macromolecules in milk are fragmented by the proteolytic and lipolytic enzymes contained by the

starter bacteria, and aromatic components materialise after these enzymatic reactions (Forde and Fitzgerald, 2000). The outline of some cheese kinds and their associated microbial flora is displayed in Table 1 (Khattab et al., 2019).

**Table 1.** Different cheese types, their microflora, and aromatic properties (Khattab et al., 2019)

Cheese Kind	Starter Cultures	Sensory Characteristics
Camembert	<i>Streptococcus cremoris</i> <i>Penicillium camemberti</i> <i>Geotrichum candidum</i>	Mushroomy, soft
Roquefort	<i>Streptococcus cremoris</i> <i>Penicillium roqueforti</i>	Pepery
Mozzarella	<i>Streptococcus cremoris</i>	Delicate
Provolone	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Smoky
Feta	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Light colour
Cheddar	<i>Streptococcus cremoris</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	Sharp

It has been reported that significant economic losses result from microbial contamination of foods. Similarly, milk and dairy products are known as a good breeding environment for bacteria, thanks to the macromolecules they contain. For this reason, the usage of quality raw materials, hygienic milking, production, transportation, and storage conditions are among the critical aspects affecting milk and dairy products' microbial quality and shelf life (Losito et al., 2014; Ruegg, 2003).

The European authorities license traditional dairy productions of the European countries by giving the 'Protected Designation of Origin' (PDO) status, which fixes the requisites of genuineness for products from specified geographical provinces (Giammanco et al., 2011).

The Mediterranean coast and its surroundings are known as a region rich in biodiversity. The diversity of animal and plant resources and cultural richness have also been positively reflected in the variety of foods produced in the territory. For this reason, the Mediterranean region is known as a wealthy area, especially regarding dairy product multiplicity. Italy has a significant place in terms of cheese culture and variousness in the Mediterranean region (Di Trana et al., 2022).

Mozzarella is white, unripened, soft, elastic, and smooth textured cheese in the "pasta filata" family. Thanks to its melting and elastic characteristics, it is highly preferred in pizza recipes. Both bovine and buffalo milk can be used to produce mozzarella. The physical and sensory quality of Mozzarella cheeses

produced from either bovine or buffalo milk looked similar. However, it was determined that mozzarella cheeses produced from buffalo milk contain more fat, protein, and mineral essences than mozzarella derived from bovine's milk (Jana, 2001; Jana and Tagalpallewar, 2017).

Parmigiano-Reggiano is a hard and cooked cheese with a high level of proteolytic ripening, which began to be produced approximately 2000 years ago in Parma, Italy (Erbay et al., 2017). It is an additive-free and nutritious cheese in thermophilic cultures used during its production and has a long ripening period of about 12 months (Tedeschi et al., 2022).

Roccamerano is a commune in the province of Asti, located in northwest Italy. Moreover, it has been reported that many important cheese varieties, especially Robiola, emerged in this environment. This PDO-type fresh cheese has five days of the ripening period, produced from Roccamerano-originated raw goat, sheep, and cow kinds of milk. However, it has been reported that it is obligatory not to use thermalization and to use 50 percent goat's milk to adhere to traditional methods in the production process of Robiola cheese (Biolcati et al., 2019; Biolcati et al., 2021).

Since the Anatolian region is wealthy in cheese diversity, it is also known as the land where these products are consumed in elevated quantities. For this reason, it is essential to determine the microbiological quality of imported cheeses that have just joined our country's market. This study aimed to analyse the PDO-type Italian cheeses marketed in our country regarding critical foodborne pathogens.

## Material and Method

### Material

This study examined a total of 120 PDO-type Italian kinds of cheese (40 mozzarellas, 40 Parmigiano, and 40 Robiola) with different lot numbers between January 2022 – September 2022. The existence of *S. aureus*, *L. monocytogenes*, Coliform bacteria, *E. coli*, *C. perfringens*, *Salmonella*, Yeast, Mold, and *Staphylococcal* enterotoxins was analysed to understand the microbiological quality of samples. After the samples were purchased from different sales points, they were carried to the laboratory under the cold chain and analysed instantly.

### Method

In this investigation, the identification methods suggested by ISO for determining foodborne bac-

teria were used as a reference. For this attempt, ISO 6888-1, ISO 11290-1, ISO 4832, ISO 7937, ISO 6579, ISO 21527 and VIDAS® Staphylococcal Enterotoxins (SET2) techniques were used for the detection of *S. aureus*, *L. monocytogenes*, Coliform bacteria, *E. coli*, *C. perfringens*, *Salmonella*, Yeast, Mold, and Staphylococcal enterotoxins, respectively (ISO 2004, 2006, 2008, 2017a, 2017b, 2021). For the analyses of Coliform bacteria, *E. coli*, *S. aureus*, *C. perfringens*, Yeast, and Mold, 10 grams of each sample were diluted in 90 ml Maximum Recovery Diluent (Merck 112535) under aseptic conditions then homogenized with a stomacher (Interscience Bagmiser 400) for 1 minute and the mixture was plated on to bacteria/pathogen specific media or enrichment. For *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* analysis, 25 grams of each sample were weighed and inoculated on specific selective media or enrichment, adhering to the methods recommended by ISO. Identification of pathogen suspected colonies were done with specific biochemical tests. Finally, all inoculated media/enrichment were incubated at the specific temperatures advised in ISO methods. Furthermore, eventually for the detection of Staphylococcal enterotoxins,

VIDAS SET2 (rapid automated detection of Staphylococcal Enterotoxins) strips were used according to the manufacturer's recommendations.

## Results

The present study examined 120 PDO-type Italian kinds of cheese (40 mozzarella, 40 parmigiano, and 40 robiola) with different lot numbers between January 2022 – 2023. *S. aureus*, *L. monocytogenes*, Coliform bacteria, *E. coli*, *C. perfringens*, *Salmonella*, Yeast, Mold, and Staphylococcal enterotoxins were determined in the samples with ISO and VIDAS-based methods. In our research, the analyses were repeated twice, and the average of the results was taken as the basis. The results obtained were evaluated within the limits of PDO and the Turkish Food Codex (TFC, 2011). Study findings are presented in Table 2. According to the data we obtained from the study, none of the analysed samples exceeded the legal limits. In other words, imported Italian cheeses in Turkey which we examined in our study were found to be both hygienic and safe in terms of food-borne pathogens and public health.

**Table 2.** Microbiological quality of Artisanal Italian Cheese Samples

Cheese Type	<i>S. aureus</i> (cfu/g)	Staphylococcal Enterotoxins	<i>L. mono-cytogenes</i>	Coliform Bacteria (MPN)	<i>E. coli</i> (MPN)	<i>C. perfringens</i>	<i>Salmonella</i> spp.	Yeast	Mold
Mozzarella (n: 40)	<1.0x10 <sup>1</sup>	ND	ND	$\bar{x}$ < 3,6	$\bar{x}$ < 3	<1.0x10 <sup>1</sup>	ND	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>
Parmigiano Reggiano (n: 40)	<1.0x10 <sup>1</sup>	ND	ND	$\bar{x}$ < 3,6	$\bar{x}$ < 3	<1.0x10 <sup>1</sup>	ND	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>
Robiola di Roccaverano (n: 40)	<1.0x10 <sup>1</sup>	ND	ND	$\bar{x}$ < 3,6	$\bar{x}$ < 3	<1.0x10 <sup>1</sup>	ND	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>

## Discussion

This study displayed that the microbiological properties of imported Italian cheese in the Turkish market were quite good. The results of our study showed that the hygienic quality of the samples we examined was high and did not pose any risk to public health.

Contamination levels of mozzarella samples are widely ranged. In research conducted in Egypt, 120 soft cheese samples (Kareish and Mozzarella) were investigated in terms of the presence of *Staphylococcus aureus*, coliforms, *E. coli*, mould, and yeast. The study's data showed that the prevalence of *Staphylococcus aureus*, coliforms, *E. coli*, mould, and yeast was 23%, 40%, 16.6%, 14%, and 10%, respec-

tively (Mohamed et al., 2019). In another study, the presence of coliforms, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* were investigated in mozzarella cheese samples. According to the research data, 12.5%, 10%, 2.5%, and 2.5% of samples harbour coliforms, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes*, respectively (Marinheiro et al., 2015). Similarly, Garbaj et al. (2007) studied coliforms, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* in traditionally made and imported mozzarella cheese in Tripoli city. As a result of the study, it was determined that the samples produced by the traditional method included higher rates of coliforms, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* than the imported ones. In addition, it was specified that the imported samples had 13%

coliform and 26% *Staphylococcus aureus*. However, similarly to our work *Salmonella* spp. Was not detected in samples. A study conducted for the microbiological evaluation of mozzarella cheeses sold in Cameroon was aimed to determine the levels of coliform bacteria, *S. aureus*, and *E. coli*. According to the study results, different coliform levels, *S. aureus*, and *E. coli* were detected in mozzarella cheese samples. However, it has been documented that the determined values are below the permitted limitations (Belli et al., 2013). The fact that the findings acquired with the research were more elevated than the findings of our study can be attributed to the low hygienic conditions and the usage of different technologies in the dairy production process, and other inefficient conditions during storage and at sale points. Furthermore, climate conditions, transport temperature, and staying time of cheese on market shelves can be thought that they are effective in growing the bacterial load. Tirloni et al. (2014) investigated the presence of *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, Coagulase positive *S. aureus*, yeasts, and moulds in Italian cheeses such as Crescenza, Robiola, Primo sale, Formaggella, Mozzarella, and Burrata. According to their study data, the level of *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, Coagulase positive *S. aureus*, yeasts, and moulds in Robiola was 5.9-7.1, 2.7-7.0, 2.6-5.5, 4.3-7.4, and <2.0 cfu/g respectively. Similarly, the level of *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, Coagulase positive *S. aureus*, yeasts, and moulds in mozzarella was detected at 3.2-6.0, 2.0-6.0, <2.0-3.0, <2.0-4.7, and <2.0 cfu/g respectively. Öksüz et al. (2004) found Coliform group bacteria and *E. coli* in white pickled cheese <4 cfu/g. The similarity of the study results can be attributed to the suppressive effect of the high acidity of cheeses on bacteria. However, in another study, *L. monocytogenes* was detected in 11% of some dairy products in Turkey (Kevenk and Koluman, 2022). Alike, *L. monocytogenes* was found in 8.1% of traditionally produced cheese types in the Black Sea Region of Turkey (Kevenk and Terzi Gulel, 2016). This situation may be attributed to *L. monocytogenes*, an acid-resistant agent that can survive in severe conditions such as acidic environments or lower temperatures. Future studies are planned to reveal the hygienic quality of different imported foods.

## Conclusion

With the rapid increase in the circulation of communication, transportation, knowledge, and people in the world, the interest in different cultures is increasing at the same rate. The sense of curiosity that

arises primarily in the cultural field brings an interest in various types of foods.

It is a fact that should be noted that we live in a world where favorite foodstuffs from different countries can be found even in very distant countries. While this situation has good aspects, it can also have adverse effects that may threaten public health due to low quality. Although the regulations of importing countries protect public health, food-borne infections and intoxications cannot be controlled entirely.

For this purpose, the imported and most consumed Italian cheeses in Turkey were analyzed, and their hygienic quality was tried to be determined in our investigation.

In a world that shrinks in parallel with the developing technology within the scope of safe food concept from farm to fork, studies like this need to be increased not to raise the rate of food-borne infections and intoxications and to protect public health better.

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

## References

- Akarca, G., Tomar, O., Gök, V. (2015). Effect of Different Packaging Methods on the Quality of Stuffed and Sliced Mozzarella Cheese during Storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 2912-2918. doi:<https://doi.org/10.1111/jfpp.12542>
- Belli, P., Cantafora, A. F. A., Stella, S., Barbieri, S., Crimella, C. (2013). Microbiological survey of milk and dairy products from a small scale dairy processing unit in Maroua (Cameroon). *Food Control*, 32(2), 366-370. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.021>
- Biolcati, F., Bottero, M. T., Dalmasso, A. (2019). Microbiological analysis of the Robiola di Roccaverano cheese by means of traditional culturing methods. *Ital J Food Saf*, 8(4), 8574. doi:10.4081/ijfs.2019.8574
- Biolcati, F., Ferrocino, I., Bottero, M. T., Dalmasso, A. (2021). Mycobiota Composition of Robiola di Roccaverano Cheese along the Production Chain. *Foods*, 10(8), 1859. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/8/1859>
- Di Trana, A., Di Rosa, A. R., Addis, M., Fiori, M., Di Grigoli, A., Morittu, V. M., Todaro, M. (2022). The Quality of Five Natural, Historical Italian Cheeses Produced in Different Months: Gross Composition, Fat-Soluble Vitamins, Fatty Acids, Total Phenols, Antioxidant Capacity, and Health Index. *Animals*, 12(2), 199. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2076-2615/12/2/199>
- Erbay, Z., Salum, P., Govce, G. (2017). Investigation of lipolytic and proteolytic ripening degrees of enzyme-modified dairy products manufactured in Turkey. *Pamukkale university journal of engineering sciences-pamukkale universitesi mühendislik bilimleri dergisi*, 23(7).
- Forde, A., Fitzgerald, G. F. (2000). Biotechnological approaches to the understanding and improvement of mature cheese

- flavour. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(5), 484-489. doi:[https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00130-0](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00130-0)
- Fox, P. F., McSweeney, P. L., Paul, L. (1998). Dairy chemistry and biochemistry.
- Garbaj, A., Naas, H., Gammoudi, F., & Moawad, A. (2007). Bacteriological quality of Mozzarella cheese sold in Tripoli Governorate. *Journal of Veterinary Medical Research*, 17(1), 99-104.
- Giammanco, G. M., Pepe, A., Aleo, A., D'Agostino, V., Milone, S., Mammìna, C. (2011). Microbiological quality of Pecorino Siciliano "primosale" cheese on retail sale in the street markets of Palermo, Italy. *New Microbiologica*, 34(2), 179-185.
- Gülhan, A. (2023a). Physicochemical, Microbiological and Sensory Analyses of Functional Detox Juices Fermented With Water Kefir Grains. *Gıda*, 48(4), 715-727.
- Gülhan, A. (2023b). Usability of Carbon Sources as Sucrose, Honey and Agave Syrup in Fermentation of Lemonade with Water Kefir Grains. *Sugar Tech*. doi:10.1007/s12355-023-01301-z
- Jana, A. (2001). Mozzarella cheese and pizza—the compatible partners. *Beverage Food World*, 28(10), 14-19.
- Jana, A., Tagalpallewar, G. (2017). Functional properties of Mozzarella cheese for its end use application. *Journal of Food Science and Technology*, 54(12), 3766-3778. doi:10.1007/s13197-017-2886-z
- Kevenk, T., Koluman, A. (2022). Seasonal effect on L. monocytogenes prevalence in meat and dairy products assessed by VIDAS LMO2 and ISO 11290: 1 methods. *International Food Research Journal*, 29(4).
- Kevenk, T. O., Terzi Gulel, G. (2016). Prevalence, Antimicrobial Resistance and Serotype Distribution of Listeria monocytogenes Isolated from Raw Milk and Dairy Products. *Journal of Food Safety*, 36(1), 11-18. doi:<https://doi.org/10.1111/jfs.12208>
- Khattab, A. R., Guirguis, H. A., Tawfik, S. M., Farag, M. A. (2019). Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 343-360. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.009>
- Losito, F., Arienzo, A., Bottini, G., Priolisi, F. R., Mari, A., Antonini, G. (2014). Microbiological safety and quality of Mozzarella cheese assessed by the microbiological survey method. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 46-55. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2013-7026>
- Marinheiro, M., Ghizzi, L., Cereser, N., de Lima, H., Timm, C. (2015). Microbiological quality of sliced and block mozzarella cheese. *Semina: Ciências Agrárias (Londrina)*, 36(3), 1329-1334.
- Mohamed, S. M. A., Abdou, M. A., Elbarbary, A. H., Elbaba, H. A. (2019). Assessment of microbiological quality in some cheese varieties in Egypt. *Benha Veterinary Medical Journal*, 36(1), 164-174. doi:10.21608/bvmj.2019.103408
- Öksüz, Ö., Arici, M., Kurultay, S., Gümüş, T. (2004). Incidence of Escherichia coli O157 in raw milk and white pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey. *Food Control*, 15(6), 453-456. doi:[https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(03\)00121-X](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00121-X)
- Ruegg, P. L. (2003). Practical Food Safety Interventions for Dairy Production. *Journal of Dairy Science*, 86, E1-E9. doi:[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74034-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74034-X)
- Tedeschi, T., Prandi, B., Lolli, V., Gasparini, A., Leni, G., Caligiani, A. (2022). A novel approach based on enzymatic hydrolysis for the valorisation of edible Parmigiano Reggiano cheese rinds. *International Dairy Journal*, 134, 105454. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105454>
- Tirloni, E., Stella, S., Bernardi, C. (2014). Concerns about the microbiological quality of traditional raw milk cheeses: a worldwide issue. *International Journal of Health, Animal Science and Food Safety*, 1(2).
- International Organization for Standardization 7937 (ISO, 2004) Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of Clostridium perfringens.
- International Organization for Standardization 4832 (ISO, 2006) Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coliforms - Colony-count technique.
- International Organization for Standardization 21527-1 (ISO, 2008) Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds.
- International Organization for Standardization 11290-1 (ISO, 2017a) Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes.
- International Organization for Standardization 6579-1 (ISO, 2017b) Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella.
- International Organization for Standardization 6888-1 (ISO, 2021) Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species).
- Turkish Food Codex (TFC, 2011) Official Newspaper Regulation for Microbiological Criteria Issue: 28157.



## Effects of night lighting with red light on melatonin and milk quality parameters in holstein cows

Rukiye Garip<sup>1</sup>, Nuri Başpınar<sup>2</sup>, Beyza Suvarıklı Alan<sup>3\*</sup>, Mustafa Garip<sup>4</sup>,  
Pınar Coşkun<sup>5</sup>, Emre Arslan<sup>6</sup>

<sup>1,2,3</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Selcuk University, Konya, Türkiye

<sup>4,6</sup> Department of Animal Science, Faculty of Veterinary Medicine, Selcuk University, Konya, Türkiye

<sup>5</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Hatay Mustafa Kemal University, Hatay, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 13.10.2023, Kabul Tarihi / Accepted: 13.12.2023

**Abstract:** In this study, it was aimed to investigate the effects of red lighting on blood and milk melatonin (MLT) levels, and milk quality. The experiment was carried out on 6 lactating Holstein Dairy cows, which were being reared at the Hümevra Özgen Research and Application Farm, affiliated to Selcuk University Faculty of Veterinary Medicine. After a control period of 15 days in which night lighting was not applied (control group), night lighting was provided by LED bulbs emitting red light with a wavelength of 652 nm during the following 15-day trial period (experimental group). On days 5th, 10th and 15th days of the control and experimental groups, milk and blood samples were taken at the 06:00 am and at 06:00 pm. Serum and milk melatonin concentrations in the morning of the control, on days 5th, 10th and 15th; were 8.64±1.4, 7.02±0.97, 8.71±2.3, and 5.01±0.92, 5.23±0.35, 3.93±0.81 pg/ml, respectively while control evening group were respectively 8.59±1.8, 7.53±2.14, 8.35±0.94, 6.91±1.73, 6.8±1.27. It was obtained as 3.67±0.97 pg/ml. Serum and milk melatonin levels in the trial morning group were 10.93±2.06, respectively, on the same days; 15.37±2.6; 11.25±1.71 and 2.97±0.64; 5.7±1.06; While it was measured as 3.33±0.73 pg/ml, it was 14.83±3.11 in the trial evening group; 14.5±3.57; 12.95±4.09 and 4.42±0.61; 2.51±0.56; It was obtained as 2.48±0.79 pg/ml. As a result, it was observed that serum and milk melatonin levels and milk parameters were not adversely affected in the use of red LED lamps (652 nm) at night for 12h, it was thought that there was no inconvenience in using them in indoor shelter lighting at night.

**Keywords:** Darkness, Holstein, Melatonin, Milk quality, Red light

### Holştayn ineklerde kırmızı ışıkla gece aydınlatmasının melatonin ve süt kalite parametrelerine etkileri

**Özet:** Bu çalışmada kırmızı ışıkla aydınlatmanın, kan-süt melatonin düzeyleri ile süt kalitesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Deneme Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne bağlı Hümevra Özgen Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde yetiştirilmekte olan laktasyondaki 6 Holştayn ırkı sağmal inek üzerinde gerçekleştirildi. Hayvanlarda 15 gün, gece aydınlatması uygulanmayan kontrol döneminden sonra (kontrol grubu) 15 gün boyunca gece aydınlatması (deneme grubu) 652 nm dalga boylu kırmızı ışık yayan LED ampüllerle sağlandı. Çalışma boyunca 5., 10., ve 15. günlerde, 06:00 ve 18:00'da kan ve süt örnekleri alındı. Kontrol sabah grubunda serum ve süt MLT düzeyleri, 5., 10., 15. günlerde, sırasıyla 8,64±1,4; 7,02±0,97; 8,71±2,3 ve 5,01±0,92; 5,23±0,35; 3,93±0,81 pg/ml olarak bulunurken, kontrol akşam grubunda, 8,59±1,8; 7,53±2,14; 8,35±0,94 ve 6,91±1,73; 6,8±1,27; 3,67±0,97 pg/ml olarak hesaplandı. Deneme sabah grubunda serum ve süt MLT düzeyleri, aynı günlerde, sırasıyla 10,93±2,06; 15,37±2,6; 11,25±1,71 ve 2,97±0,64; 5,7±1,06; 3,33±0,73 pg/ml olarak hesaplanırken, deneme akşam grubunda 14,83±3,11; 14,5±3,57; 12,95±4,09 ve 4,42±0,61; 2,51±0,56; 2,48±0,79 pg/ml olarak hesaplandı. Serum ve süt MLT düzeyleri, süt somatik hücre sayısı, süt kalite parametrelerinden iletkenlik dışında gruplar arasında veya grup içinde herhangi bir istatistikî fark belirlenmedi. Sonuç olarak, kırmızı LED ampuller ile gece aydınlatılmasının (652 nm) 12 saat boyunca kullanımında serum ve süt melatonin düzeyleri ile süt parametrelerinin olumsuz etkilenmediği görüldüğünden gece barınak içi aydınlatmalarda kullanılmasında bir sakınca olmadığı düşünüldü.

**Anahtar kelimeler:** Holştayn, Karanlık, Kırmızı ışık, Melatonin, Süt kalitesi

### Introduction

Proper lighting of animal farms is important for both animal welfare and safe, healthy working

conditions for the farm staff (Belyaev and Gorbunova 1973; Köseman and Şeker 2019). Today, it is tried to provide advantages such as energy

**Yazışma adresi / Correspondence:** Beyza Suvarıklı Alan, Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Selcuk University, Konya, Türkiye e-mail: [beyza.alan@selcuk.edu.tr](mailto:beyza.alan@selcuk.edu.tr)

**ORCID IDs of the authors:** <sup>1</sup>0000-0003-3586-9534 • <sup>2</sup>0000-0002-5481-1111 • <sup>3</sup>0000-0003-4698-9291 • <sup>4</sup>0000-0002-1429-2724 • <sup>5</sup>0000-0002-6991-3727 • <sup>6</sup>0000-0002-4609-8395



saving and more efficiency by adjusting the illumination times in livestock farms. It was reported in studies that cows prefer a light environment over dark. Probably, the better lightning and visual contact between cows contribute for social hierarchy build-up and prevention of traumatism. This has LED researchers and agricultural equipment manufacturers to develop and apply technologies for the best possible lighting, thereby providing optimal growing conditions. (Penev et al. 2014). For this purpose, breeders use red light, known as 'invisible light' for cattle at night, for night illumination (Bunu 2019; Olsson 2020). LEDs reduce consumption of electricity for illumination in dairy barns and require less maintenance compared with several other types of light fixtures available for animal houses, which makes them increasingly popular. The use of LEDs also entails better control of light intensity as the diodes can be dimmed, as well as better control of the light spectrum as there are many different color types available. Artificial light supplements daylight, when daylight is available, and provides adequate levels of illuminance during the rest of the day to allow a daylight-like environment of 16h per 24h for lactating cows (ASABE 2014).

The retina contains 2 types of photoreceptors called cones and rods. Photoreceptors in the retina are stimulated by light. Like most mammals, are dichromats and have short-wavelength-sensitive (S-cones) and medium- to long-wavelength-sensitive cones (ML-cones) (Penev et al. 2014; Lindkvist et al. 2021). Melatonin (MLT) is a neuromodulatory hormone synthesized from the pineal gland. In both the pineal gland and ocular tissue, MLT synthesis and release parallels the circadian rhythm in relation to dark and light intensity. Retinal cells, which are hyperpolarized in the light, suppress MLT synthesis, while they depolarize in the dark and initiate synthesis in the pineal gland. The excitation threshold is light energy with a wavelength of about 482 nm (Ostrin 2019). The wavelength, intensity, and duration of light affect MLT biosynthesis. A light intensity of 5-10 lx in cattle is considered the threshold at which MLT synthesis is inhibited (Muthuramalingam et al. 2006; Dahl 2010). Short wavelength lights suppress MLT synthesis due to their high energies (Cajochen et al. 2005; Asher et al. 2015; Arnao and Ruiz 2018). Melatonin is amphiphilic, meaning it can diffuse freely across biological membranes (Simonneau and Ribelayga 2003; Yu et al. 2016) into the circulatory system and from the bloodstream to milk

(Vanecek 1998; Castro et al. 2011). Photoperiod application is important for milk production and health of dairy cattle (Dahl and Petitclerc 2003; Dahl et al. 2012; Crawford et al. 2015). Photoperiod feeding is also important in lactating dairy cows for increased milk yield (Peters and Tucker 1978; Dahl and Petitclerc 2003).

Melatonin released by dark stimuli induces relaxation and sleep in mammals. Therefore, there is some concern that the presence of light at night may interfere with rest in cows (Lawson and Kennedy 2001; Muthuramalingam et al. 2006). In a study by Lawson and Kennedy (2001) it was shown that MLT levels decreased in heifers under night-time lighting of 50 lx and higher intensity. On the other hand, it was noted that after 2h of 50 lx illumination, the suppression of MLT release disappeared. Muthuramalingam et al. (2006) suggest that it may be appropriate to use 10 lx and lower intensity light in areas where it is recommended to be dark. In a human study on MLT secretion with blue and red light, it was stated that blue light (479 nm) suppressed MLT release, while red light (627 nm) had no effect. In general, light intensity is an important parameter in measuring the suppression level of MLT, and as the brightness of the light stimulus increases, the suppression power increases (Papamichael et al. 2012).

In this study, since there were not enough satisfactory studies on the effects of night lighting with red light on blood-milk MLT levels and milk quality parameters in Holstein dairy cows, it was aimed to determine blood-milk MLT levels and milk quality parameters in Holstein dairy cows exposed to red light (with a wavelength of 652 nm and 50,267 lx) for 15 days.

## Material and Methods

### Animal and Feed Materials

Approval for the study was obtained from the Selcuk University Faculty of Veterinary Medicine Local Ethics Committee for Animal Experiments (dated 16.01.2020 and decision no:2020/02).

The study was carried out in a Research and Application Farm (Location: 38° 02' 18" K, 32° 30' 15" D) after a 5-day acclimation phase, for a total of 30 days (3 July - 2 August) with 15 days of dark and experimental groups. In the research, 6 Holstein cows were selected and the experiment was started. In the selection, animals aged between 3 and 9 years and with close milk yield levels were preferred (Table 1).

**Table 1** Age and lactation days of the selected animals

Business Animal No	Lactation day	Age	Average Milk Yield kg/day
1	95	9	21,61±0,60
7	60	8	28,26±0,26
8	249	7	24,31±0,70
13	58	3	26,03±0,46
14	48	7	22,45±0,53
16	149	4	23,73±0,59
<b>Average</b>	<b>109,8</b>	<b>6,33</b>	<b>24,40 ±0,91</b>

During the experiment, the feeding program of the enterprise was applied. No changes were made to concentrate and roughage contents throughout the experiment. The roughage and concentrate feed ingredients and the feeding schedule are presented in (Tables 2, 3 and 4). Feeding was given ad libitum as a mixture of roughage and concentrated feed. The yield share as concentrated feed was given individually by the automatic voluntary milking system (VMS) in front of the animals during their milking.

**Table 2.** Mixture ratios of coarse and concentrated feed.

Feed Ingredient	Amount in (kg)	Ration (%)
Straw	3,0	15
Clover	3,5	17,5
Corn Silage	6,0	30
Bran	0,5	2,5
Milk Feed	5,5	27,5
Cottonseed Meal	0,5	2,5
Beet Pulp	1,0	5
Vit Min Premix	0,005	0,02
Salt	0,005	0,02
<b>Total</b>	<b>20.01</b>	<b>%100</b>

**Table 3.** Roughage physical and chemical analysis results.

PHYSICAL ANALYSIS	
Name	Tmr
Amount	3 Kg
Where it Came From	Farm
Arrived Date	09.09.2020
Packaging Shape	Plastic Bag
Appearance	Normal
Colour	Normal
Smell	Normal
Foreign Matter	No

**CHEMICAL ANALYSIS**

	Natural	Dry matter
Dry Matter.%	96,44	96,44
Crude Ash.%	6,76	7,01
Crude oil %	1,53	1,58
Crude Cellulose.%	36,23	37,57
Crude Protein.%	6,39	6,63
ME, kcal/kg	1544	1601

**Table 4.** Physical and Chemical Analysis Results of Concentrate (Pellet) Feed.**PHYSICAL ANALYSIS**

Name	Pellet Feed
Appearance	Normal
Amount	3 Kg
Where it Came From	Farm
Arrived Date	09.09.2020
Packaging Shape	Plastic Bag
Colour	Normal
Smell	Normal
Foreign Matter	No

**CHEMICAL ANALYSIS**

	Natural	Dry matter
Dry Matter.%	91,15	91,15
Crude Ash.%	6,32	6,94
Crude oil %	1,48	1,62
Crude Cellulose.%	8,11	8,89
Crude Protein.%	16,33	17,92
ME, kcal/kg	2564	2813

Before starting the experiment, the animals were subjected to the acclimatization period 5-days before sampling by continuing the lighting program applied by the enterprise for the dark period. No changes in feed or worker were made until the end of the experiment. No application was carried out except for routine applications. No ration changes were applied during the study. On the days of blood and milk sampling, samples were taken from the roughage and concentrated feed ingredients in accordance with the procedures and content analyses were performed (Tables 2, 3 and 4).

**Milk Sampling Periods**

This study was conducted in two stages. Five days before the start of the experiment and the 5-days

between the dark and light periods were defined as the acclimatization period. In order to form the control group (Stage 1), milk samples from 6 cows were collected from the right fore udder on the 5th, 10th and 15th days of the study, at the end of the night (6.00 a.m.) and at the end of the day (06.00 p.m.). Before the light application, light sources were mounted in the facility and, the same animals were subjected to a 5-day acclimation period. For the purpose of the experimental group (Stage 2), 100 ml were collected from the right anterior nipple at the end of the night (06:00 am) and at the end of the day (06:00 pm) on days 5th, 10th and 15th days of the study. In addition, blood was taken from the coccygeal vein before the morning and evening milking of the animals during 1st and 2nd stages. The sera of the blood samples taken were separated.

#### **Determination of Somatic Cell Counts (SCC):**

In order to determine the SCC ethyl alcohol and acetonitrile were mixed in a bottle and kept in a water bath set at 60-70°C for a while, after adding methylene blue and mixing well, it was kept at 4°C overnight. It was then used by filtration after adding glacial acetic acid. After the milk samples brought to the laboratory, they were homogenized by keeping them in a shaking water bath set at 50-60°C for 30 minutes, 0.05 ml then milk sample was spread on an area of 100 mm<sup>2</sup> on a clean slide. After the prepared preparations were air-dried, they were covered with SCC paint solution to cover them completely and painted for 10 minutes. The stained preparations were washed, dried, and examined under the microscope with an immersion objective by dripping cedar oil.

The average number of cells in a microscope field was determined by counting the cells with clear nuclei in 100 microscope fields in the preparations with more cells and 20 in the preparations with few cells and SCC in 1 ml of milk was determined (Anonymous 1981).

#### **Milk Content Analysis**

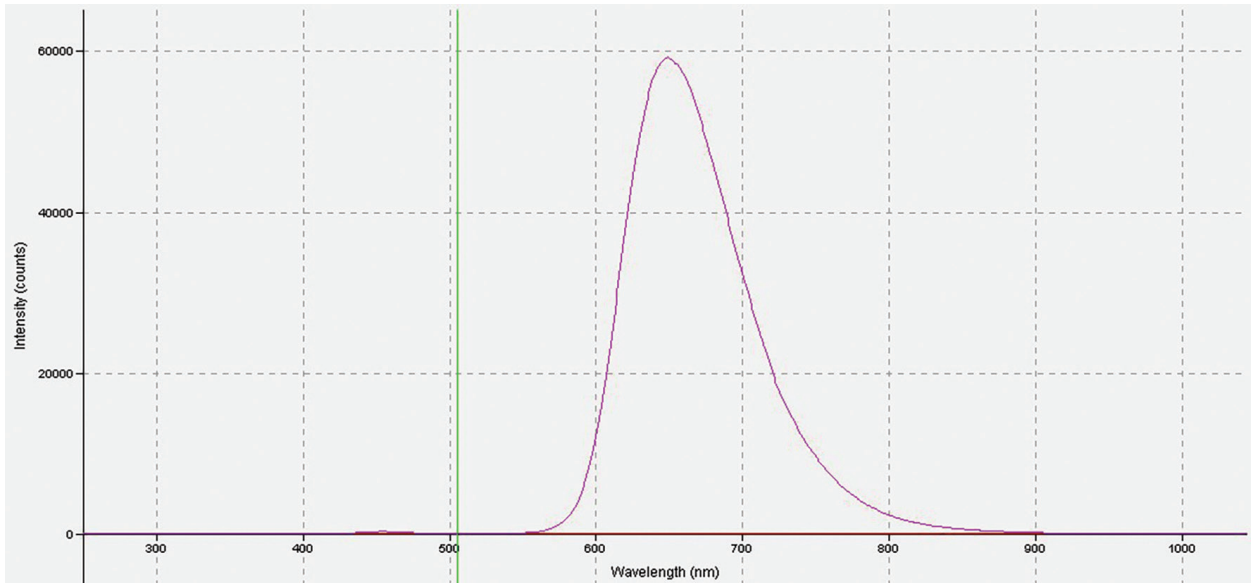
Fat, dry matter, protein, lactose, density, freezing point and conductivity analyses in milk were performed by infrared analysis method (combined by © Mayasan Biotech) using MILKANA® Express Plus

device. Milk protein, fat, dry matter and lactose were measured using a Milko Scan FT device (Produced for Turkey with Serial No. 2008 Part No: 701028), based on Fourier transform infrared spectrum analysis.

#### **Light Application**

LED bulbs and carrier armature (1800 rotatable 50 Watt SMD Led Projector luminaire slim case) were used in the preparation of the light fixtures. SMD Powered (6040 -F2525 A2) with a cooled 50 watt red light was mounted in bulb cases. Wavelength measurements of the light source were carried out with the aid of an electron microscope spectrophotometer (LED) Ocean Optics/Qe 65000, and the distance between the fiber tip and the led lamp was 10-15 cm. The wavelength of the light was calculated as approximately 652 nm (Figure 1).

The light fixtures, which were measured, were mounted in suitable places in the barn, where light insulation (the windows of which were covered with aluminum foil) was made, by the electric technicians working in the farm. After assembly and during the trial periods, light intensities were measured at the animal eye and the feeder levels. While the lighting program applied to the farm was continued to be applied to the selected animals during the control (dark, 1st stage) period of the experiment, blood and milk samples were collected on the 5th, 10th, and 15th days of the night, after the 5-day adaptation period. In the red light application, which is the main application of the experiment, after this period, the light mechanism was started, and the second stage of the experiment was started after the 5-day adaptation period. During this period, the animals were exposed to red light for 12h (between 06.00 pm and 06:00 am) after 06.00 pm, while they were exposed to daylight during the day. As in the control period, milk and blood samples were collected from the same animals on days 5th, 10th and 15th days, twice, in the morning and evening, in accordance with the specified protocol. Light measurements were made and recorded during the periods when the samples of the dark and red light illumination phases were collected. The light intensity was measured with the help of the ILT 1700 radiometer at the eye level of the animals and the intensity of the light intensity was calculated as 4.67 x 10.76 fc (= ~50,267 lx).



**Figure 1.** Wavelength of the red LED bulb light used in the experiment.

### Temperature and Humidity Measurements

The light quantity and spectral compositions were measured using a calibrated handheld fiber-optic spectrometer (IL 1700 Research Radiometer). In addition, measurements of humidity, (Trotec Heat humidity meter BC 06) and air flow rate (Air Velocity Meter Trotec BA 06) were carried out. In addition, values such as altitude, humidity, day length and moon position of the location of the enterprise were obtained from the Regional Directorate of Meteorology. The average air temperature for July, the period of the research, was 25.51 °C (max 36.16-min 11,5 °C), and the monthly precipitation was 0.6 mm. For the beginning of August, the average air temperature was 23.79 °C (max 36.43-min 8.31 °C), monthly rainfall was recorded as 12.8 mm. The animals were housed in the barn (22±2°C and 55±5% humidity) with an automatic fan with temperature and humidity control inside the barn.

### Analysis of Milk and Serum Melatonin Levels

Collected milk samples were brought to the biochemistry laboratory in the cold chain and stored at -20°C until use. Analysis of milk MLT levels was performed with the human direct saliva MLT ELISA kit (RE54041, IBL International, Germany) modified for cow's milk by Kollmann et al. (2008) and Milagres et al. (2014). Milk samples were analyzed according

to the kit procedure (Milagres et al. 2014). Before sampling, milk samples were diluted 4 times. Serum was applied directly to the kit procedure. The levels are given as pg/ml.

### Statistical Analysis

IBM SPSS 25 package program was used for statistical analysis of the data. The Kolmogorov-Smirnova test was used to determine whether the data showed a normal distribution. Since the data did not conform to normal distribution, after Kruskal Wallis test for nonparametric analysis of variance, Mann-Whitney U test was used for pairwise comparisons and the Dunnett test was used for multiple comparisons to determine the differences in the groups. Spearman's test was used to evaluate the relationship between blood and milk MLT concentration (night and day milk average), SCC and milk nutrient content levels (dry matter, fat, protein, density, conductivity, lactose) in each group and the relationship between milking time and blood milk in each group.

### Results

The serum and milk MLT levels and SCC findings of the data obtained in the study are given in Table 5, and data on milk content parameters are given in Table 6.

**Table 5.** Serum and milk MLT levels (pg/ml) and milk SCC levels (Mean  $\pm$ SE)

n=6		MORNING			EVENING		
		CONTROL	TRIAL	P	CONTROL	TRIAL	P
Serum MLT	5. gün	8,64 $\pm$ 1,4	10,93 $\pm$ 2,06	0,699	8,59 $\pm$ 1,8	14,83 $\pm$ 3,11	0,310
Serum MLT	10. gün	7,02 $\pm$ 0,97	15,37 $\pm$ 2,6	0,090	7,53 $\pm$ 2,14	14,50 $\pm$ 3,57	0,310
Serum MLT	15. gün	8,71 $\pm$ 2,3	11,25 $\pm$ 1,71	0,310	8,35 $\pm$ 0,94	12,95 $\pm$ 4,09	0,589
	<i>p</i>	0,697	0,322		0,947	0,891	
Milk MLT	5. gün	5,01 $\pm$ 0,92	2,97 $\pm$ 0,64	0,180	6,91 $\pm$ 1,73	4,42 $\pm$ 0,61	0,093
Milk MLT	10. gün	5,23 $\pm$ 0,35	5,7 $\pm$ 1,06	0,240	6,80 $\pm$ 1,27	2,51 $\pm$ 0,56	0,004
Milk MLT	15. gün	3,93 $\pm$ 0,81	3,33 $\pm$ 0,73	0,394	3,67 $\pm$ 0,97	2,48 $\pm$ 0,79	0,394
	<i>p</i>	0,359	0,139		0,113	0,118	
SCC*	5. gün	37,32 $\pm$ 5,63	91,23 $\pm$ 37,82	0,180	111,96 $\pm$ 82,21	140,99 $\pm$ 34,40	0,180
SCC*	10. gün	62,20 $\pm$ 23,82	99,52 $\pm$ 35,19	0,485	62,2 $\pm$ 14,00	248,81 $\pm$ 146,78	0,589
SCC*	15. gün	91,23 $\pm$ 28,49	161,72 $\pm$ 92,82	0,818	140,99 $\pm$ 101,51	157,58 $\pm$ 117,87	0,818
	<i>p</i>	0,147	0,845		0,452	0,584	

(\*pieces x 1000).

**Table 6.** Milk parameters (Mean  $\pm$ SE) in all experimental groups.

		MORNING			EVENING		
		CONTROL	TRIAL	P	CONTROL	TRIAL	P
% DEN	5. gün	27,22 $\pm$ 1,92	29,58 $\pm$ 0,38	0,520	24,22 $\pm$ 2,85	27,38 $\pm$ 1,37	0,589
% DEN	10. gün	28,63 $\pm$ 1,32	30,17 $\pm$ 0,55	0,589	23,78 $\pm$ 2,98	24,28 $\pm$ 1,74	0,937
% DEN	15. gün	25,66 $\pm$ 4,51	30,32 $\pm$ 0,16	0,818	27,85 $\pm$ 1,10	28,62 $\pm$ 0,90	0,589
	<i>p</i>	0,645	0,345		0,554	0,075	
% FAT	5. gün	3,30 $\pm$ 1,62	1,38 $\pm$ 0,32	0,630	2,28 $\pm$ 0,50	3,13 $\pm$ 1,20	0,937
% FAT	10. gün	1,55 $\pm$ 0,53	0,93 $\pm$ 0,23	0,485	5,42 $\pm$ 1,48	5,27 $\pm$ 1,43	0,937
% FAT	15. gün	1,10 $\pm$ 0,51	0,55 $\pm$ 0,18	0,937	3,01 $\pm$ 1,11	1,86 $\pm$ 0,69	0,310
	<i>p</i>	0,431	0,076		0,359	0,108	
% FP	5. gün	53,53 $\pm$ 1,02	54,53 $\pm$ 0,35	0,699	46,97 $\pm$ 4,39	53,58 $\pm$ 0,53	0,310
% FP	10. gün	53,05 $\pm$ 1,53	54,82 $\pm$ 1,01	0,485	52,00 $\pm$ 2,45	51,95 $\pm$ 0,65	0,485
% FP	15. gün	54,62 $\pm$ 0,70	54,38 $\pm$ 0,36	0,818	54,02 $\pm$ 0,79	53,67 $\pm$ 0,61	0,818
	<i>p</i>	0,875	0,470		0,402	0,144	
% LAC	5. gün	4,35 $\pm$ 0,11	4,47 $\pm$ 0,03	0,699	3,81 $\pm$ 0,37	4,36 $\pm$ 0,06	0,485
% LAC	10. gün	4,36 $\pm$ 0,13	4,50 $\pm$ 0,07	0,485	4,10 $\pm$ 0,30	4,16 $\pm$ 0,09	0,485
% LAC	15. gün	4,52 $\pm$ 0,07	4,48 $\pm$ 0,02	0,699	4,41 $\pm$ 0,06	4,39 $\pm$ 0,06	0,937
	<i>p</i>	0,778	0,443		0,548	0,125	
% PROT	5. gün	2,96 $\pm$ 0,05	3,01 $\pm$ 0,02	0,748	2,60 $\pm$ 0,24	2,97 $\pm$ 0,02	0,394
% PROT	10. gün	2,94 $\pm$ 0,08	3,02 $\pm$ 0,05	0,485	2,85 $\pm$ 0,18	2,88 $\pm$ 0,03	0,240
% PROT	15. gün	3,03 $\pm$ 0,05	3,00 $\pm$ 0,02	0,818	3,0 $\pm$ 0,04	2,96 $\pm$ 0,03	0,589
	<i>p</i>	0,719	0,450		0,321	0,115	

		MORNING			EVENING		
		CONTROL	TRIAL	P	CONTROL	TRIAL	P
% SNF	5. gün	7,90±0,16	8,07±0,05	0,631	6,91±0,66	7,91±0,10	0,394
% SNF	10. gün	7,87±0,22	8,11±0,13	0,485	7,50±0,52	7,6±0,13	0,485
% SNF	15. gün	8,17±0,14	8,06±0,05	0,699	7,99±0,11	7,93±0,09	0,589
	<i>p</i>	0,781	0,475		0,436	0,119	
Z mS/cm	5. gün	4,53±0,19	5,13±0,10	0,015	4,79±0,15b	5,19±0,17	0,240
Z mS/cm	10. gün	4,99±0,21	5,17±0,06	0,589	5,04±0,18a	5,18±0,10	0,485
Z mS/cm	15. gün	4,78±0,13	5,18±0,15	0,093	5,27±0,05a	5,25±0,11	0,699
	<i>p</i>	0,082	0,890		0,030*	0,932	

\* The difference at the P<0.05 level is significant. DEN: Density 1.0260 g/cm<sup>3</sup> – 1.0330 g/cm<sup>3</sup> (±0.0005g/cm<sup>3</sup>) FP: Freezing Point % (-1°C) – 0°C (±0.015°C) , SNF: Oil-free dry substance 6%–12% (±0.2%) FAT: oil 0.5%–9% (±0.1%). Z: Conductivity:2 mS/cm – 20 mS/cm (±1%) (18°C).

Correlation tables between the relevant parameters are presented in Table 7 for the 5th day, Table 8 for the 10th day and Table 9 for the 15th day in the experimental and control groups.

**Table 7.** Correlations between control and trial day 5 morning and evening milk MLT and milk quality parameters.

CONTROL		TRIAL								
Morning	Serum	Milk	FAT	SNF	DEN	PROT	FP	LAC	Z	SCC
Evening	MLT	MLT								
Serum MLT	1	0,60	0,89*	-0,31	-0,49	-0,20	-0,31	-0,31	0,00	0,44
Serum MLT	1	-0,64	0,89*	-0,43	-0,84*	-0,32	-0,43	-0,60	-0,26	-0,81*
Milk MLT	0,41	1	0,43	-0,83*	-0,94**	-0,78	-0,83*	-0,83*	0,35	0,09
Milk MLT	0,03	1	-0,52	0,06	0,46	0,01	0,06	0,23	0,70	0,87*
FAT	0,37	-0,14	1	-0,20	-0,37	-0,14	-0,20	-0,20	-0,43	0,79
FAT	0,94**	0,26	1	-0,77	-0,99**	-0,70	-0,77	-0,83*	-0,26	-0,78
SNF	0,03	0,12	-0,54	1	0,94**	0,99**	1,00**	1,00**	-0,32	0,09
SNF	-0,14	-0,49	-0,43	1	0,84*	0,99**	1,00**	0,94**	0,14	0,32
DEN	-0,14	0,29	-0,89*	0,83*	1	0,93**	0,94**	0,94**	-0,23	-0,09
DEN	-0,31	-0,54	-0,60	0,94**	1	0,78	0,84*	0,90*	0,23	0,72
PROT	0,03	0,25	-0,29	0,91*	0,68	1	0,99**	0,99**	-0,22	0,04
PROT	-0,14	-0,49	-0,43	1,00**	0,94**	1	0,99**	0,90*	0,09	0,28
FP	0,06	0,09	-0,49	0,99**	0,81*	0,93**	1	1,00**	-0,32	0,09
FP	-0,14	-0,49	-0,43	1,00**	0,94**	1,00**	1	0,94**	0,14	0,32
LAC	0,03	0,12	-0,54	1,00**	0,83*	0,91*	0,99**	1	-0,32	0,09
LAC	-0,14	-0,49	-0,43	1,00**	0,94**	1,00**	1,00**	1	0,31	0,41
Z	0,03	-0,26	-0,37	0,37	0,49	0,26	0,49	0,37	1	-0,85*
Z	-0,03	0,54	-0,09	0,43	0,37	0,43	0,43	0,43	1	0,35
SCC	-0,88*	-0,30	-0,29	0,29	0,29	0,40	0,30	0,29	0,10	1
SCC	0,51	-0,78	0,34	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	-0,68	1

\*P<0.05 correlations mean significant, \*\*P<0.01 level correlations mean important. (The correlation coefficients in bold (r) belong to the Evening group, and the italics belong to the Experimental group).

**Table 8.** Correlations between control and trial day 10 morning and evening milk MLT and milk quality parameters.

CONTROL		TRIAL								
Morning	Serum	Milk	FAT	SNF	DEN	PROT	FP	LAC	Z	SCC
Evening	MLT	MLT								
Serum MLT	1	0,60	0,89*	-0,31	-0,49	-0,20	-0,31	-0,31	0,00	0,44
Serum MLT	1	0,99**	-0,12	0,41	0,12	0,32	0,41	0,41	0,35	0,36
Milk MLT	-0,15	1	0,43	-0,83*	-0,94**	-0,78	-0,83*	-0,83*	0,35	0,09
Milk MLT	0,09	1	-0,14	0,43	0,14	0,26	0,43	0,43	0,31	0,44
FAT	0,26	-0,09	1	-0,20	-0,37	-0,14	-0,20	-0,20	-0,43	0,79
FAT	0,66	0,60	1	-0,94**	-1,00**	-0,77	-0,94**	-0,94**	-0,14	-0,03
SNF	-0,18	0,56	-0,46	1	0,94**	0,99**	1,00**	1,00**	-0,32	0,09
SNF	-0,54	-0,03	-0,77	1	0,94**	0,83*	1,00**	1,00**	0,31	0,03
DEN	-0,22	0,50	-0,72	0,94**	1	0,93**	0,94**	0,94**	-0,23	-0,09
DEN	-0,37	-0,26	-0,83*	0,94**	1	0,77	0,94**	0,94**	0,14	0,03
PROT	-0,17	0,57	-0,40	0,99**	0,92*	1	0,99**	0,99**	-0,22	0,04
PROT	-0,54	-0,03	-0,77	1,00**	0,94**	1	0,83*	0,83*	0,26	-0,37
FP	-0,17	0,47	-0,39	0,99**	0,90*	0,99**	1	1,00**	-0,32	0,09
FP	-0,54	-0,03	-0,77	1,00**	0,94**	1,00**	1	1,00**	0,31	0,03
LAC	-0,18	0,56	-0,50	0,99**	0,96**	0,99**	0,98**	1	-0,32	0,09
LAC	-0,54	-0,03	-0,77	1,00**	0,94**	1,00**	1,00**	1	0,31	0,03
Z	-0,71	0,13	0,10	-0,13	-0,08	-0,14	-0,15	-0,13	1	-0,85*
Z	-0,43	-0,14	-0,77	0,89*	0,94**	0,89*	0,89*	0,89*	1	-0,30
SCC	-0,11	-0,40	-0,36	-0,59	-0,28	-0,64	-0,64	-0,55	0,33	1
SCC	0,39	0,33	0,82*	-0,88*	-0,88*	-0,88*	-0,88*	-0,88*	-0,70	1

\* P<0.05 correlations mean significant, \*\*P<0.01 level correlations mean important.

**Table 9.** Correlations between control and trial day 15 morning and evening milk MLT and milk quality parameters.

CONTROL		TRIAL								
Morning	Serum	Milk	FAT	SNF	DEN	PROT	FP	LAC	Z	SCC
Evening	MLT	MLT								
Serum MLT	1	-0,20	-0,49	-0,71	-0,32	-0,71	-0,71	-0,67	0,14	0,00
Serum MLT	1	0,06	0,26	-0,31	-0,37	-0,14	-0,14	-0,37	0,03	0,12
Milk MLT	0,26	1	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,09	-0,54	0,41
Milk MLT	0,93**	1	-0,41	0,64	0,52	0,84*	0,84*	0,52	0,38	-0,72
FAT	-0,66	-0,14	1	0,61	0,00	0,61	0,61	0,59	-0,49	0,01
FAT	-0,70	-0,83*	1	-0,60	-0,77	-0,49	-0,49	-0,77	-0,89*	0,62
SNF	-0,14	0,37	0,14	1	0,75	1,00**	1,00**	0,99**	-0,09	-0,55
SNF	0,23	0,43	-0,03	1	0,94**	0,94**	0,94**	0,94**	0,43	-0,93**
DEN	-0,64	-0,06	0,06	0,58	1	0,75	0,75	0,76	0,29	-0,72
DEN	0,52	0,77	-0,60	0,77	1	0,83*	0,83*	1,00**	0,66	-0,93**
PROT	-0,12	0,46	0,12	0,99**	0,59	1	1,00**	0,99**	-0,09	-0,55
PROT	0,29	0,37	0,14	0,94**	0,60	1	1,00**	0,83*	0,37	-0,93**

CONTROL		TRIAL								
Morning	Serum	Milk	FAT	SNF	DEN	PROT	FP	LAC	Z	SCC
Evening	MLT	MLT								
FP	-0,26	0,49	0,09	0,94**	0,64	0,93**	1	0,99**	-0,09	-0,55
FP	0,12	0,37	-0,09	0,94**	0,83*	0,83*	1	0,83*	0,37	-0,93**
LAC	-0,14	0,37	0,14	1,00**	0,58	0,97**	0,94**	1	0,06	-0,60
LAC	0,12	0,37	-0,09	0,94**	0,83*	0,83*	1,00**	1	0,66	-0,93**
Z	-0,49	0,26	0,31	-0,20	-0,06	-0,23	0,09	-0,20	1	-0,32
Z	0,58	0,31	0,09	0,09	-0,14	0,37	-0,14	-0,14	1	-0,62
SCC	-0,06	-0,46	-0,55	-0,55	0,24	-0,53	-0,46	-0,55	-0,12	1
SCC	-0,03	-0,27	-0,03	-0,94**	-0,70	-0,82*	-0,88*	-0,88*	0,15	1

\*P<0.05 correlations mean significant, \*\*P<0.01 level correlations mean important.

On the 5th day of the study, serum MLT and FAT were positively high in the evening group ( $r=+0.89$ ,  $p<0.05$ ), serum MLT and DEN ( $r=-0.84$ ,  $p<0.05$ ) and SCC ( $r=-0.81$ ,  $p<0.05$ ) a negative high correlation was detected. There was no significant relationship between milk MLT and milk parameters in the control group ( $P>0.05$ ). Significant between SNF ( $r=-0.83$ ,  $p<0.05$ ) and LAC ( $r=-0.83$ ,  $p<0.05$ ), DEN ( $r=-0.94$ ,  $p<0.05$ ) in the trial morning group with milk MLT ( $<0.01$ ), very significant negative associations were observed between a very significant positive correlation ( $r=+0.94$ ) was found between serum MLT and FAT in the trial evening group. It was observed that there was a high positive ( $r=+0.87$ ,  $p<0.05$ ) correlation between milk MLT and SCC in the trial evening group. When the correlations in terms of SCC were examined, no significant relationship was detected in the control evening group, while there was a highly negative ( $r=-0.88$ ,  $p<0.05$ ) relationship with serum MLT in the morning group. In the experimental groups, there was a high negative correlation ( $r=-0.85$ ,  $p<0.05$ ) with only conductivity (Z) in the morning group (Table 7).

A significantly high correlation was detected between serum MLT and milk MLT in the evening in the control group on the 10th day of the study ( $r=0.99$ ,  $P<0.05$ ). In terms of milk quality characteristics, a high positive ( $r=0.89$ ,  $p<0.05$ ) correlation was determined between morning serum MLT and FAT in the morning and evening groups on the 10th day of the trial. No significant relationships could be determined with serum MLT in terms of other characteristics. Significant correlations were found between milk MLT and SNF, DEN, FP, and LAC in the morning control group ( $p<0.05$ ). There was no significant correlation between the control evening milk MLT and any of the features ( $p>0.05$ ). In the

control evening, positive ( $r=0.82$ ) relationships between FAT, which is between SCC and milk components, and negative ( $r=-0.88$ ) relationships between SNF, DEN, PROT, FP and LAC were determined. It was calculated that there was only a negative significant correlation ( $r=-0.85$ ) between SCC and Zara in the trial morning group. On the 10th day of the study, very high positive correlations were observed between the control SNF and DEN parameters and PROT, FP, LAC, Z, provided that they were similar in the morning and evening groups. In the same groups, very high positive correlations were observed between PROT and FP, LAC and Z (Table 8).

On the 15th day of the study, a very high positive correlation was detected between serum MLT and milk MLT levels in the trial evening group ( $r=+0.93$ ,  $p<0.01$ ). There was a significant negative correlation between milk MLT and FAT in the trial evening group ( $r=-0.83$ ,  $p<0.05$ ). On the 15th day in the control group, significant negative correlations ( $p<0.05$ ) were observed between SCC and SNF and between SCC and PROT, FP and LAC. It was revealed that there were very high negative relationships ( $r=-0.93$ ,  $p<0.01$ ) between SCC and SNF, DEN, PROT, LAC, and FP in the red light trial groups (Table 9).

## Discussion

Currently, it is thought that different light applications in livestock farms may be beneficial in terms of animal productivity. By adjusting the light and dark times, it is tried to provide advantages such as energy saving and more efficiency. The eyes of all mammals contain light-sensitive rods that allow vision in the dark and cones that allow us to see shapes and colors in daylight. Cow eyes are large and contain a high amount of rods, which may facilitate vision



at low light intensities (Phillips et al. 2000). Today, it is not known exactly how well cattle can see in the dark, and there is no complete information about the color discrimination in cattle. All primates are trichromatic and have three types of cones, while the mullain has only two types of cones and is dichromatic. For this reason, it is thought that cattle cannot distinguish between green and red (Sjaastad et al. 2003). At night, breeders use red light, known as "invisible light" for cattle. This suggests that red light is useful for night-time lighting. Thus, the farmers think that they will not disturb the animals when they control them at night (Olsson 2020). In our study, no significant changes were observed in the milk and serum MLT levels and SCC in the control and light trial groups, which is consistent with the finding that red light is beneficial in night lighting.

Light is the most important factor affecting the synthesis and release of the MLT hormone, which is an indole compound and synthesized from the amino acid tryptophan. The secretion of melatonin by pineal gland cells depends on the sensitivity of pinealocytes to light. As a result of this sensitivity, the inhibition caused by light disappears in the dark and MLT secretion by melanocytes increases. Whether the environment is light or dark, in other words, day and night, is the main factor in MLT synthesis and release (Özgüner et al. 1995). Melatonin secretion reaches its highest level, especially at around 23.00-05.00 at night. The level of MLT in the cell and in the blood increases 3-10 times compared to that in the daytime. While the blood concentration of melatonin in humans is approximately 0-20 pg/dl during the daytime, it rises to 50-200 pg/dl at night (Claustrat et al. 2005). Also, MLT biosynthesis is sensitive to the wavelength of light. Synthesis is suppressed by short light wavelengths (Cajochen et al. 2005; Asher and Corsi 2015). In general, light intensity is an important parameter for measuring the suppression level of MLT, and as the brightness of the light stimulus increases, the suppression power also increases (Özçelik et al. 2013). In a study on MLT secretion with blue and red light in humans, it was stated that blue light (479 nm) suppressed MLT secretion, while red light (627 nm) had no effect. In another study conducted in humans, it was reported that MLT secretion was suppressed by exposure to short-wavelength light (446-477 nm) (Brainard et al. 2001). It has been shown that light in the short-wavelength spectrum (465-485 nm) suppresses MLT production in mammals (Lockley et al. 2003; Mainster, 2006; Brainard et al. 2008). On the other hand, it is known that the effects of light on MLT synthesis

and release are not similar among different species. For example, it has been reported that light application at a wavelength of 640 nm in hamsters inhibits MLT secretion from the pineal gland, MLT suppression occurs at 460 nm in humans, and serum MLT levels decrease slightly at 630 and 700 nm (Hanifin et al. 2006). In this study, it was determined that 50 lx red light at wavelength 652 nm at the animal eye level, applied for 15-days, did not significantly change serum MLT levels in milk cows compared to dark application. This is important in terms of showing that MLT synthesis does not decrease in farms that will be illuminated at night with red light.

The presence and levels (5-25 pg/ml) of the MLT hormone, which is photoperiodically synthesized from the pineal gland, in human, cow, and goat milk have been demonstrated (Eriksson et al. 1998; Valtonen et al. 2003; Castro et al. 2011). Milk MLT levels in cows have been reported at different levels by different researchers: Milk MLT levels in Ayrshire cows are  $7 \pm 2$  pg/ml, (Eriksson et al. 1998), in dry period Holstein-Friesian cows 5.4 pg/ml in February, 11 in August 8 pg/ml (Schaper et al. 2015) and  $2.9 \pm 0.6$  pg/ml in dairy cows in June (Castro et al. 2011). Milk MLT levels in the study (in the range of 3.93-5.23 pg/ml) were slightly lower than the levels reported by Eriksson et al. (1998) and Schaper et al. (2015) and slightly higher than the levels reported by Castro et al. (2011) was determined as. Serum MLT levels obtained in the morning and evening hours in the control group were 7.02 pg/ml in the control group, close to Eriksson et al. (1998) and slightly higher 8.71 pg/ml in the evening group. In the red light experimental groups, it was in the range of 7.53-8.59 pg/ml.

The concentration of MLT in milk follows a diurnal course in parallel with the serum concentration. The highest concentration is at night and the lowest at noon. For this reason, milk expressed at night (between 2 and 4 at night) contains higher MLT than milk expressed during the day (Milagres et al. 2014). In the study, no difference was observed in terms of MLT levels between blood and milk samples taken around 06.00 a.m. and blood and milk samples taken around 06.00 p.m. This may be related to the short half-life of the MLT hormone. The half-life of melatonin in the blood is approximately 40 minutes (Çevik and Yurdaydin 1998). It has been reported that the release of MLT, which has a special circadian rhythm, starts to increase at 09.00-10.00 p.m. hours in the evening, reaches a maximum level at 02.00-04.00 a.m. hours, starts to decrease at 05.00-07.00 a.m. in the morning and decreases to basal levels

after 07:00 a.m. (Claustrat et al. 2005; Castro et al. 2011). The pineal gland synthesizes approximately 80% of the amount of MLT in the bloodstream. On the other hand, MLT synthesis is not limited to the pineal gland. The presence of hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT), known to be involved in the synthesis of melatonin, in organs other than the pineal gland suggests that MLT synthesis also occurs outside the pineal gland. It has been reported that some cells in the Harder gland, lacrimal gland, retina, erythrocytes, platelets and gastrointestinal tract synthesize MLT (Cardinali and Pévet 1998). There are no literature data on MLT secretion from the mammary gland. Although there is information that milk and serum MLT levels follow a parallel course (Milagres et al. 2014), it is reported that this parallelism changes according to the lactation and non-lactation periods of animals. While milk MLT levels were  $7 \pm 2$  pg/ml during the lactation period in Ayrshire cows, it was  $15 \pm 1$  pg/ml at night and did not show any correlation with serum MLT levels ( $7 \pm 2$  pg/ml during the day,  $27 \pm 7$  pg/ml at night), milk and serum MLT levels changed in parallel in the non-lactation period (Eriksson et al. 1998). This study was conducted on Holstein cows that were on the 110th day of lactation on average. The fact that the milk MLT level did not change at the same rate as serum MLT is consistent with the study of Eriksson et al. (1998). On the other hand, it differs from the studies of Vanecek (1998) and Castro et al. (2011) who suggested that there is a relationship between blood and milk melatonin concentrations. In addition, it was observed that milk MLT levels decreased on the days 5th, 10th and 15th days following the red light application, and the statistical difference was detected on the 10th day. Statistically significant correlations between milk and serum MLT levels were detected only at day 15 in the control and on day 10 of the trial. In the light of these findings, it can be thought that milk MLT levels respond to red light application differently from serum MLT levels, serum and milk MLT levels do not always follow a parallel pattern, and there may be other mechanisms controlling milk MLT levels.

It is thought that there are some relationships between milk production, milk content and MLT. MLT applied externally (implanted) to dairy cows grazing in the pasture by Auld et al. (2007) decreased milk yield, decreased milk lactose levels, and increased fat, protein and casein levels. Externally applied MLT implant in Holstein cows decreased the number of milk somatic cells and also increased serum albumin alanine transferase and lactate dehydrogenase levels

while decreasing cortisol levels (Yang et al. 2017). In his study, it was noted that after MLT administration, the concentration of IgG and IgM increased transiently, followed by a significant decrease in white blood cells and lymphocytes. In conclusion, MLT treatment improved immune activity in cows, reduced SCC, and improved milk quality.

Milk fat is a complex mixture of different types of fat, which is the body's main source of energy. As the milk fat content increases, the quality of the milk improves (Romero Velarde et al. 2019). Molik et al. (2011) showed that MLT application and exposure to short day photoperiod in different seasons in sheep had significant effects on protein, fat, and lactose levels and fatty acid content of sheep milk ( $P < 0.01$ ). In this study, a high positive correlation ( $r = +0.94$ ,  $p < 0.01$ ) was observed between serum MLT and milk fat levels in the control group on the 5th day. In addition, high positive correlations ( $r = +0.89$ ,  $p < 0.05$ ) were determined between morning and evening serum MLT and milk fat levels in the 5th day red light group. This correlation between serum MLT and milk fat levels was not detected in the control group, although the red light was also seen on the 10th day. It can be thought that the fat content in milk is positively affected by light application. On the other hand, endogenous MLT and exogenous MLT may have different interactions with milk parameters, and the dose of MLT is one of the issues that may be important in this interaction.

In their study on cow's milk, they found the relationship between milk fat (%) and milk SCC and milk protein (%) levels as  $r = 0.37$  and  $r = 0.63$ , respectively. Similarly, in this study, correlations were calculated as  $r = 0.60$  between evening milk SCC and milk fat in the experimental group on the 15th day, and  $r = 0.61$  between milk fat and milk protein levels in the morning group. The correlation between milk fat and milk SCC was slightly higher than that observed in this study ( $r = 0.62$ ) (Ikonen et al. 2004). In both studies, correlations were not found to be statistically significant ( $P > 0.05$ ). It was determined that the correlation level, which was  $r = -0.81$   $p < 0.05$  on the 5th day in the evening of the experimental group, was  $r = +0.36$  on the 10th day and  $r = +0.12$  on the 15th day, and may have changed by being affected by red light. SCC with serum MLT was calculated as  $r = +0.87$  ( $p < 0.05$ ) on the 5th day,  $r = +0.44$  on the 10th day and  $r = -0.72$  on the 15th day. This trend of change in serum MLT levels can be considered as an important finding in terms of preventing mastitis formation and improving milk quality.

On the 10th day of the study, a negative correlation ( $r=-0.81$ ,  $p<0.05$ ) was determined between evening serum MLT levels and milk SCC in the control group. In addition, a negative correlation was determined between serum MLT levels and milk SCC in the 10th day of red light application ( $r=-0.81$ ,  $p<0.05$ ). Yang et al. (2017) as reported, it is thought that this negative correlation between MLT and SCC obtained in our study may be important in preventing mastitis. The fact that serum and milk MLT levels did not decrease statistically can be considered as an important finding in our study, although a night-time illumination of 50 lx was used with red light.

## Conclusion and Recommendations

As a result of the data obtained in the study, it was observed that serum and milk MLT levels and milk parameters were not adversely affected by 15-day-old red LED bulbs (652 nm) and night (12 h) illumination in Holstein dairy cows.

In this study, in which we tried to measure the effect of red light, no statistical difference was found in terms of serum MLT, milk MLT and milk SCC measured in the morning control and morning trial groups ( $P>0.05$ ). In the evening control and evening trial groups, a statistical difference was obtained for the same values on the 10th day of only the milk MLT group ( $P=0.004$ ).

When the correlations of milk components were examined, it was determined that FAT and SCC were affected more in red light groups than in the control group. No significant changes were detected between serum MLT, milk MLT and milk parameters in the day, morning and evening samples. Only a very high positive correlation was determined between serum MLT and milk MLT at day 15. In addition, a strong positive correlation was observed between serum MLT and FAT in the morning and evening, while a negative correlation was found between MLT and DEN.

It was observed that 12h of illumination with red LED bulbs did not have any negative effect on milk parameters. As it can be understood from the relations between milk MLT levels and milk SCC on the 5th, 10th and 15th days of the study, it can be argued that red LED bulbs can be used in night lighting for quality milk production without causing any serious problems.

As a result, suitable red light applications in compulsory night lighting will make it possible to obtain rich quality milk without causing significant decreases in MLT levels. It can be claimed that light-

ing with a wavelength of 652 nm for 12h can be used in night-time shelter lighting without causing significant decreases in blood MLT levels, as in the dark.

**Ethics committee for the use of experimental animals:** The study was conducted at the Experimental Medicine Research and Application Center (SUDAM) of Selçuk University and the ethical approval (Year 2020 - No: 202002) was obtained from SUDAM.

**Acknowledgements:** This study has been produced by Selçuk University Scientific Research Projects Unit with first author's thesis study supported by Project number 20202007.

**Financial support and relationship of interest:** The Scientific Research Projects (BAP) unit of Selçuk University funded this study (Project number: 20202007). The authors declare no conflict of interest.

## References

- Anonymous (1981) IDF <https://fil-idf.org/publications/bulletin/membrane-processes-guidelines-for-testing-equipment-terms-and-definitions/pdf>. (Erişim: 18.06.2021, 11.23).
- Arnao MB, Ruiz JH. (2018) The Potential of phytemelatonin as a nutraceutical. *Molecules*. 23(1), 238. doi: 10.3390/molecules23010238.
- ASABE American Society of Agricultural and Biological Engineers. (2014) Standards. Lighting systems for Agricultural Facilities. St Joseph (US), ASAE EP344.4 (R2019).
- Asher A, Shabtay A, Brosh A, Eitam H, Agmon R, Cohen-Zinder M, Zubidat AE, Halm A, (2015) Chrono-functional milk, The difference between melatonin concentration in night milk versus day milk under different illumination conditions. *Chronobiol Int*. 32(10), 1409-1416. doi: 10.3109/07420528.2015.1102149.
- Asher G, Corsi SP. (2015) Time for food: the intimate interplay between nutrition, metabolism, and the circadian clock. *Cell*. 161(1), 84-92. doi: 10.1016/j.cell.2015.03.015.
- Auldist MJ, Turner SA, McMahon CD, Prosser CG. (2007) Effects of melatonin on the yield and composition of milk from grazing dairy cows in New Zealand. *J Dairy Sci Res*. 74(1), 52-57. doi: 10.1017/S0022029906002160.
- Belyaev V, Gorbunova E. (1973) Effect of lightning in premises on milk yield of cows. *Veterinaria*, 11, 29-31.
- Brainard GC, Hanifin JP, Greeson JM, Byrne B, Glickman G, Gerner E, Rollag MD. (2001) Action spectrum for melatonin regulation in humans, Evidence for a novel circadian photoreceptor. *J Neurosci*. 21(16), 6405-6412. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-16-06405.2001>.
- Brainard GC, Sliney D, Hanifin JP, Glickman G, Byrne B, Greeson JM, Rollag MD. (2008) Sensitivity of the human circadian system to short-wavelength (420-nm) light. *J Biol Rhythm*. 23(5), 379-86. doi: 10.1177/0748730408323089.
- Bunu M. (2019). Effects of red and blue LED light on feed intake, feed selection and milk yield in dairy Cows Department of Animal Nutrition and Management. Master's thesis.
- Cajochen C, Münch M, Kobińska S, Kräuchi K, Steiner R, Oelhafen P, Orgül S, Wirz-Justice A. (2005) High sensitivity of human melatonin, alertness, thermoregulation, and heart rate to short

- wavelength light. *J Clin Endocrinol Metab.* 90(3), 1311-1316. doi: 10.1210/jc.2004-0957.
- Cardinali DP, Pévet P. (1998) Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev.* 2(3), 175-190. doi: 10.1016/s1087-0792(98)90020-x.
- Castro N, Spengler M, Lollivier V, Wellnitz O, Meyer HHD, Bruckmaier RM. (2011) Diurnal pattern of Melatonin in blood and milk of dairy cows. *Milchwissenschaft.* 66(4), 352-353.
- Claustrat B, Brun J, Chazot G. (2005). The basic physiology and pathophysiology of Melatonin. *Sleep Medicine Reviews.* 9(1), 11-24. doi: 10.1016/j.smrv.2004.08.001.
- Crawford HM, Morin DE, Wall EH, McFadden TB, Dahl GE. (2015) Evidence for a role of prolactin in mediating effects of photoperiod during the dry period. *Animals.* 5(3), 803-820. doi: 10.3390/ani5030385.
- Çevik M, Yurdaydın N. (1998) Evcil hayvanlarda fotoperiyodizm ve dölvörimine etkisi. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.* 38(1), 69-78.
- Dahl GE, Petitclerc D. (2003) Management of photoperiod in the dairy herd for improved production and health. *J Anim Sci.* 81 Suppl 3, 11-17. doi: 10.2527/2003.81suppl\_311x.
- Dahl GE. (2010) Photoperiod Management of Dairy Cattle. Minnesota Dairy Health Conference, University of Minnesota, St. Paul.
- Dahl GE, Tao S, Thompson IM. (2012) Lactation Biology Symposium, Effects of photoperiod on mammary gland development and lactation. *J Anim Sci.* 90(3), 755-760. doi: 10.2527/jas.2011-4630.
- Eriksson L, Valtonen M, Laitinen JT, Paananen M, Kaikkonen M. (1998) Diurnal rhythm of melatonin in bovine milk, Pharmacokinetics of exogenous melatonin in lactating cows and goats. *Acta Vet Scand.* 39(3), 301-310. doi: 10.1186/BF03547778.
- Hanifin JP, Stewart KT, Smith P, Tanner R, Rollag M, Brainard GC. (2006) High-intensity red light suppresses melatonin. *Chronobiol Int.* 23(1-2), 251-268. doi: 10.1080/07420520500521988.
- Ikonen S, Morri A, Tyrisevä M, Ruottinen O, Ojala M. (2004) Genetic and phenotypic correlations between milk coagulation properties, milk production traits, somatic cell count, casein content, and ph of milk. *J Dairy Sci.* 87(2), 458-467. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73185-9.
- Kollmann MT, Locher M, Hirche F, Eder K, Meyer HH, Bruckmaier RM. (2008) Effects of tryptophan supplementation on plasma tryptophan and related hormone levels in heifers and dairy cows. *Domest Anim Endocrinol.* 34(1), 14-24. doi: 10.1016/j.domaniend.2006.09.005.
- Köseman A, Şeker İ. (2019) Influence of husbandry conditions on animal welfare at cattle farms in Turkey. *Anim Sci Pap Rep.* 37(2), 137-147. https://doi.org/10.5555/20193386562.
- Lawson TJ, Kennedy AD. (2001) Inhibition of nighttime melatonin secretion in cattle, threshold light intensity for dairy heifers. *Can J Anim Sci.* 81(1), 153-156. https://doi.org/10.4141/A00-058.
- Lindkvist S, Ternman E, Ferneborg S, Bänkestad D, Lindkvist J, Ekesten B, Agenäs S. (2021) Effects of achromatic and chromatic lights on pupillary response, endocrinology, activity, and milk production in dairy cows. *PLoS One.* 16(7), e0253776. doi: 10.1371/journal.pone.0253776.
- Lockley SW, Brainard GC, Czeisler CA. (2003) High sensitivity of the human circadian melatonin rhythm to resetting by short wavelength light. *J Clin Endocr Metab.* 88(9), 4502-4505. doi: 10.1210/jc.2003-030570.
- Mainster MA. (2006) Violet and blue light blocking intraocular lenses, Photoprotection versus photoreception. *Brit J Ophthalmol.* 90(6), 784-792. doi: 10.1136/bjo.2005.086553.
- Milagres MP, Minim VPR, Minim L A, Simiqueli AA, Moraes LES, Martino HSD. (2014) Night milking adds value to cow's milk. *J Sci Food Agr.* 94(8), 1688-1692. doi: 10.1002/jsfa.6480.
- Miteva C. (2012) Hygienic aspects of freerange production systems for dairy cows. Monograph, Academic Publishing House of the Trakia University.
- Molik E, Bonczar G, Żebrowska A, Misztal T, Pustkowiak H, Zięba D. (2011) Effect of day length and exogenous melatonin on chemical composition of sheep milk. *Arch Anim Breed.* 54, 177-187. DOI:10.5194/AAB-54-177-2011.
- Muthuramalingam P, Kennedy AD, Berry RJ. (2006) Plasma melatonin and insulin-like growth factor-1 responses to dim light at night in dairy heifers. *J Pineal Res.* 40(3), 225-229. doi: 10.1111/j.1600-079X.2005.00303.x.
- Olsson P. (2020) The effect of low light intensity and red light on heart rate, blood pressure, respiratory rate and activity in dairy cows. *Masterin Animal Science Place of publication.* Uppsala Place of publication, Uppsala. http://epsilon.slu.se, (Erişim 3 Mart 2020, 16.42).
- Ostrin LA. (2019) Ocular and systemic melatonin and the influence of light exposure. *Clin Exp Optom.* 102(2), 99-108. DOI: 10.1111/cxo.12824.
- Özçelik F, Erdem M, Bolu A, Gülsün M. (2013) Melatonin, general features and its role in psychiatric disorders. *Current Approaches in Psychiatry.* 5(2), 179-203. doi.org/10.5455/cap.20130512.
- Özgüner F, Özcankaya R, Delibaş N, Koyu A, Çalıskan S. (1995) Melatonin ve klinik önemi. *SDÜ Tıp Fak Derg.* 2(4), 1-6.
- Papamichael C, Skene DJ, Revell VL. (2012) Human nonvisual responses to simultaneous presentation of blue and red monochromatic light. *J Biol Rhythm.* 27(1), 70-78. https://doi.org/10.1177/0748730411431447.
- Penev T, Radev V, Slavov T, Kirov V, Dimov D, Atanassov A, Marinov I, (2014) Effect of lighting on the growth, development, behaviour, production and reproduction traits in dairy cows. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3(11), 798-810.
- Peters RR, Tucker HA. (1978) Prolactin and growth hormone responses to photoperiod in heifers. *Endocrinology.* 103(1), 229-234. doi.org/10.1210/endo-103-1-229.
- Phillips CJC, Morris ID, Lomas CA, Lockwood SJ. (2000) The locomotion of dairy cows in passageways with different light intensities. *Anim Welfare.* 9(4), 421-431. DOI: https://doi.org/10.1017/S0962728600023009.
- Romero Velarde E, Delgado-Franco D, García-Gutiérrez M, Gurrola-Díaz C, Larrosa-Haro A, Montijo-Barríos E, Muskiet FAJ, Vargas-Guerrero B, Geurts J. (2019) The Importance of Lactose in the Human Diet, Outcomes of a Mexican Consensus Meeting. *Nutrients.* 11(11), 2737. doi: 10.3390/nu11112737.
- Schaper C, Koethe M, Braun PG. (2015) Melatonin levels in Holstein-Friesian dairy cow milk. *Journal of Food Safety and Food Quality.* 66(6), 172-176. DOI: 10.2376/0003-925X-66-172.
- Simonneaux V, Ribelayga C. (2003) Generation of the Melatonin endocrine message in mammals, a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev.* 55(2), 325-95. doi: 10.1124/pr.55.2.2.
- Sjaastad OV, Sand O, Hove K. (2003) Physiology of domestic animals. 2nd edition. Oslo, Scandinavian Veterinary Press. 256-257.
- Valtonen M, Kangas AP, Voutilainen M, Eriksson L. (2003) Diurnal rhythm of melatonin in young calves and intake of melatonin in milk. *Anim Sci.* 77(1), 149-154. doi:10.1017/S1357729800053741.
- Vanecek J. (1998) Cellular Mechanisms of melatonin Action. *Physiol Rev.* 78(3), 687-721. doi: 10.1152/physrev.1998.78.3.687.
- Yang M, Shi J, Tian J, Tao J, Chai M, Wang J, Xu Z, Song Y, Zhu K, Ji P, Liu G. (2017) Exogenous melatonin reduces somatic cell count of milk in Holstein cows. *Sci Rep.* 7, 43280. doi.org/10.1038/srep43280.
- Yu H, Dickson EJ, Jung SR, Koh DS, Hille B. (2016) High membrane permeability for melatonin. *J Gen Physiol.* 147(1), 63-76. doi: 10.1085/jgp.201511526.



# *Silybum marianum*'un broyler böbreğinde methomyl hasarına karşı etkilerinin patolojik ve biyokimyasal olarak araştırılması

Bahadır Kılınc<sup>1\*</sup>, Ertan Oruç<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Keçioren, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup> Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Selçuklu, Konya, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 06.10.2023, Kabul Tarihi / Accepted: 26.10.2023

**Özet:** Bu çalışmada broylerlerde Methomyl toksikasyonuna bağlı oluşan böbrek hasarına karşı *Silybum marianum* tohumu tozunun koruyucu/önleyici ya da iyileştirici etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. 28 gün olarak planlanan çalışmada Kontrol grubu (KONT), Methomyl grubu (MET), *Silybum marianum* tohumu tozu grubu (SMT) ve Methomyl+*Silybum marianum* tohumu tozu grubu (MET+SMT) olmak üzere her birisinde 32 hayvan bulunan 4 farklı grup oluşturuldu. Methomyl 20 ppm, *Silybum marianum* tohumu tozu ise 10 gr/kg olarak yemlere ilave edildi. Deneme süresince haftalık olarak her bir gruptan 8 hayvanın nekropsileri yapılarak biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için örnekler alındı. Biyokimyasal incelemeler için alınan serum örneklerinden total protein, kreatinin ve ürik asit parametrelerin ölçümleri yapıldı. Histopatolojik incelemelerde ise böbreklerde hiperemi, tubulus epitellerinde dejenerasyon ve nekroz, Bowman kapsülünde kalınlaşma, intertübuler alanda kanama ve yangısal hücre infiltrasyonu, tubulus bazal membranlarında kalınlaşma bulguları değerlendirildi. Çalışmada her hafta kan serumlarında yapılan analizlerde kreatinin, ürik asit ve total protein değerleri KONT ve SMT gruplarında benzer bulunurken, MET gruplarında, KONT ve SMT gruplarına kıyasla istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır. MET+SMT grubunda ise ilgili parametrelerin değerleri MET grubuna göre düşük olduğu görülmüştür. Methomyl verilen tüm gruplarda, böbrek dokularında 14'üncü gün ölçümlerde belirginleşen, 21 ve 28'inci günlerde zamana bağlı olarak şiddeti artan hasar meydana gelmiştir. Koruyucu/iyileştirici amaçla verilen *Silybum marianum*'un ise biyokimyasal ve histopatolojik düzeyde hasarları azalttığı gözlemlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Biyokimya, Böbrek, Histopatoloji, Methomyl, *Silybum marianum*

## Pathological and biochemical investigation of the effects of *Silybum marianum* against methomyl damage in broiler kidney

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the protective/preventive or ameliorative effects of *Silybum marianum* seed powder against kidney damage caused by Methomyl toxicity in broilers. In the 28-day study, 4 different groups of 32 animals each were formed as Control group (CONT), Methomyl group (MET), *Silybum marianum* seed powder group (SMT) and Methomyl+*Silybum marianum* seed powder group (MET+SMT). Methomyl 20 ppm and *Silybum marianum* seed powder 10 g/kg were added to the feed. During the experiment, 8 animals from each group were necropsied weekly and samples were taken for biochemical and histopathological examinations. Total protein, creatinine and uric acid parameters were measured from serum samples taken for biochemical examinations. In histopathological examinations, renal hyperemia, degeneration and necrosis of tubular epithelium, thickening of Bowman's capsule, hemorrhage and inflammatory cell infiltration in the intertubular area, and thickening of tubular basement membranes were evaluated. In the study, creatinine, uric acid and total protein values were found to be similar in the KONT and SMT groups, but statistically higher in the MET group compared to the KONT and SMT groups. In the MET+SMT group, the values of the related parameters were lower than in the MET group. In all methomyl-treated groups, damage to the kidney tissues became evident in the measurements on the 14th day and increased in severity on the 21st and 28th days in a time-dependent manner. *Silybum marianum* given for protective/healing purposes was observed to reduce the damage at biochemical and histopathological levels.

**Keywords:** Biochemistry, Histopathology, Kidney, Methomyl, *Silybum marianum*

## Giriş

Methomyl'in, memelilere, kuşlara ve çevreye karşı son derece yüksek kalıntı toksisitesi nedeniyle birçok Avrupa ülkesinde ve Türkiye'de Methomyl kullanımını yasaklanmıştır (Boucaud-Maitre ve ark 2019, Erişim 1).

Methomyl nefrotoksisitesinde histopatolojik olarak, glomerüllerde atrofi, tübüllerde dilatasyon, epitelde vakuoler dejenerasyon ile deskuamasyon, ayrıca intertübüler alanda ödem, renal kan damarında tromboz, yangısal hücre infiltrasyonu, perivasküler ödem ve hemoraji rapor edilmiştir (Ashour

**Yazışma adresi / Correspondence:** Bahadır Kılınc, Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Keçioren, Ankara, Türkiye  
e-mail: bahadir.kilinc@tarimorman.gov.tr

\*Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesindeki birinci yazarın Doktora tezinden özetlenmiştir.

**ORCID IDs of the authors:** <sup>1</sup>0000-0003-3426-2116 • <sup>2</sup>0000-0003-4234-8219

ve ark 2017, Sakr ve ark 2018). Methomyl ile ilişkili dejeneratif değişiklikler ve nefritik hasar, methomyl kaynaklı oksidatif strese, lipid peroksidasyonuna, sonuçta ortaya çıkan serbest radikal birikimine ve antioksidan sistemin bozulmasıyla ilişkili olduğu bildirilmektedir (El-Demerdash ve ark 2013). Hücrel vakuolasyon oluşumu hücre hasarını sınırlamaya çalışan adaptif bir fizyolojik yanıt olarak değerlendirilirken yangısal reaksiyon ise, dokuların methomyl tarafından uygulanan oksidatif stres kaynaklı yaranmaya karşı bir savunma tepkisi olarak kabul edilir (Sakr ve ark 2018). Methomyl, memelilerde asetilkolinesteraz aktivitesini önemli ölçüde inhibe eder (Lin ve ark 2020).

Deve dikenini antik çağlardan beri bilinmektedir. Anavatanı Akdeniz bölgesi olup, Avrupa ve Kuzey Amerika boyunca, ülkemizde ise en fazla Ege ve Marmara bölgelerinde yayılış göstermektedir (Eren ve Sevgi 2020). Tohumlarında çok fazla miktarda silymarin bulundurulur. İçeriğinde kimyasal bileşenleri olarak silymarin; izosilibin, silibin, silidianin silikristin ve dehidrosilibin izomerlerinden meydana gelmektedir (Ding ve ark 2001). *Silybum marianum L.*, yaklaşık % 70-80 arasında silymarin flavonolignansları, % 20-30'luk miktarı ise çoğunluğunu polimerik ve okside polifenolik içeriklerin meydana getirdiği ve kimyasal olarak belirlenememiş türevleri içermektedir (Sanchez-Sampedro ve ark 2007). *Silybum marianum* tohumları % 1-5 oranında silymarin içermektedir. Tohumlarından üretilen ekstraktlarında %70-80 oranında silymarin vardır. *Silybum marianum* bitkisinin yapraklarında, çiçeklerinde ve köklerinde silymarin etkeni bulunmaz (Çelik ve Kan 2013). Silymarinde bulunan esas etkili madde *silibindir* (Çubukçu ve ark 2002).

Silymarin, çoklu in vitro ve hayvan çalışmalarında antifibrotik, antioksidatif ve antiinflamatuvar etkiler göstermiştir (Cai ve ark 2015).

Bu çalışmada broylerlerde methomyl toksikasyonuna bağlı oluşan böbrek hasarına karşı *Silybum marianum* tohumu tozunun koruyucu/önleyici ya da iyileştirici etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### Methomyl ve *Silybum marianum* Tohumu Tozu

Çalışmada ticari olarak temin edilen Methomyl (®Coupon 90 SP) ve *Silybum marianum* tohumu tozu kullanılmıştır. Ticari eldede edilen *Silybum marianum* Tohumu Tozunda HPLC cihazı ile yapılan analizlerde % 1,8 silymarin içeriği belirlenmiştir. Çalışmada MET gruplarına verilen standart broiler yemlerine 20 ppm methomyl, SMT gruplarına ise kg

başına 10 gr. *Silybum marianum* tohumu tozu katılmıştır. Her grup için ayrı ayrı olmak üzere Methomyl ve *Silybum marianum* tohumu tozu içeren broiler yemleri, özel bir yem fabrikasında mikser ile homojenize edilerek hazırlanmış ve hazırlanan homojenize yemler sızdırmaz özellikteki kraft torbalara konularak muhafaza edilmiştir.

### Deney Hayvanları ve Gruplar

Çalışma, Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yerel Etik Kurul (Karar No:2021/07) izni ile gerçekleştirildi.

Çalışmada özel bir damızlık işletmesinden temin edilen 128 adet 7 günlük broiler civciv (Ross 308) kullanıldı. Deneme ortamına alınan civcivler adaptasyon amacıyla 7 gün kontrollü bakım ve beslenmeye alındı. Böylelikle civcivler 14 günlük yaştan itibaren denemeye hazır hale getirildi. Deneme amacıyla aşağıdaki gruplar oluşturuldu.

**1. Kontrol Grubu** (KONT, n=32): Bu grup içerisindeki broilerlere 28 gün boyunca standart broiler besleme yemi ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi.

**2. Methomyl Grubu** (MET, n=32): Bu grup içerisindeki broilerlere 28 gün boyunca her gün 20 ppm Methomyl içeren standart broiler yemi ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi.

**3. SMT Grubu** (SMT, n=32): Bu grup içerisindeki broilerlere 28 gün boyunca her gün 10 g/kg *Silybum marianum* Tohumu Tozu içeren standart broiler yemi ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi.

**4. MET+SMT Grubu** (MET+SMT, n=32): Bu grup içerisindeki broilerlere 28 gün boyunca her gün 20 ppm Methomyl + 10 gr/kg *Silybum marianum* tohumu tozu içeren standart broiler yemi ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi.

Deneme süresince tüm broilerler için bir saat karanlık ve 23 saat aydınlık olacak şekilde aydınlatma programı uygulandı. Çalışmada KONT grubunda 6'nci, SMT grubunda 4'ncü ve MET+SMT grubunda 5'nci günlerde birer, MET grubunda ise 10, 16 ve 25'inci günlerde olmak üzere üç deney hayvanı ölü bulunduğu için istatistiksel olarak değerlendirilmemiştir.

### Biyokimya ve histopatoloji örneklerinin hazırlanması

Deneme süresince her bir gruba ait broilerlerden 7 gün arayla 7, 14 ve 21'inci günlerde 8'er broiler rastgele seçilerek dekapitasyon yöntemiyle ötenazi uygulandı. 28'inci günde ise gruplarda kalan diğer hayvanlara (KONT, SMT ve MET+SMT gruplarından 7, MET grubundan 5 hayvan) sistemik nekropsi yapıldı. Biyokimyasal analiz amacıyla deney hayvanlarından

intrakardiyak yolla alınan kan örnekleri 4000 devirde 25 dakika santrifüj sonrası elde edilen serum örnekleri ependorf tüplere alınarak -80°C'de saklandı.

Biyokimyasal ölçümlerde serum numunelerinde total protein, kreatinin, ürik asit (Triolab - Ankara) kolorometrik metotla Beckman Coulter marka AU640 model otoanalizörde Imrogen marka sıvı reaktif ticari kit kullanılarak (Tablo 1) yapılmıştır.

**Tablo 1.** Biyokimyasal analizler için kullanılan ticari kit listesi.

Reaktif	Lot No	Marka
Ürik Asit	25042	Imrogen, (Türkiye)
Total Protein	21528	Imrogen, (Türkiye)
Kreatinin	21422	Imrogen, (Türkiye)

Sistemik nekropsi sırasında ise böbrek dokusuna ait makroskopik bulgular kaydedilerek fikzasyon amacıyla %10'luk tamponlu formalin solüsyonu içerisinde muhafaza edildi. Histopatolojik inceleme amacıyla alınan böbrek dokusu örneklerinden rutin histopatoloji preparatı hazırlama prosedürünü takiben parafin bloklar hazırlandı ve mikrotom (Leica RM 2125 RT) ile 5µm kalınlığında kesitler alındı. Tüm kesitler HE boyama protokolüne uygun şekilde boyandı (Luna, 1968). Histopatolojik bulguları değerlendirmek amacıyla Meyerholz ve ark (2019) tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek skorlama yapıldı. Bu amaçla X20 objektif altında 9 alan incelendi ve Tablo 2'e göre skorlandı.

**Tablo 2.** Histopatolojik skorlama tablosu.

Skor	Tanımlama
0	Histopatolojik bulguya rastlanmadı
1	Histopatolojik bulgu kesitin 1/3'ünde (1-3 mikroskopik alanda) görüldü.
2	Histopatolojik bulgu kesitin 2/3'ünde (4-6 mikroskopik alanda) görüldü.
3	Histopatolojik bulgu kesitin 3/3'ünde (7-9 mikroskopik alanda) görüldü.

Histopatolojik olarak böbreklerde hiperemi, kanama, dejenerasyon, nekroz, proteinöz sıvı birikimi, bazal membranlarda kalınlaşma, yangısal hücre infiltrasyonu değerlendirildi. Her bir deneme grubundan 7, 14, 21'inci günlerde rastgele alınan sekizer ve 28'inci günde geride kalan KONT, SMT ve MET-SMT grubundan 7, MET grubundan ise 5 hayvana ait böbrek örnekleri histopatolojik olarak değerlendirildi. Histopatolojik skorların karşılaştırılması toplam skorlar üzerinden yapıldı. Bu amaçla böbrek kesitlerinde hiperemi, tubulus epitellerinde dejenerasyon ve nekroz, Bowman kapsülünde kalınlaşma, intertubuler alanda kanama ve yangısal hücre infiltrasyonu,

tubulus bazal membranlarında kalınlaşma bulguları değerlendirildi.

### İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS (25.0) bilgisayar yazılımı kullanıldı. Verilerin dağılımları Brown-Forsythe ve Bartlett's test kullanılarak test edilmiştir. Grup kıyaslamaları için veriler için One-Way ANOVA Post Hoc Tukey testi uygulanarak harflendirilmiştir. Histopatolojik skor verileri Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir. Test sonuçları  $P < 0.05$ 'e göre anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar  $Mean \pm SE$  olarak verilmiştir.

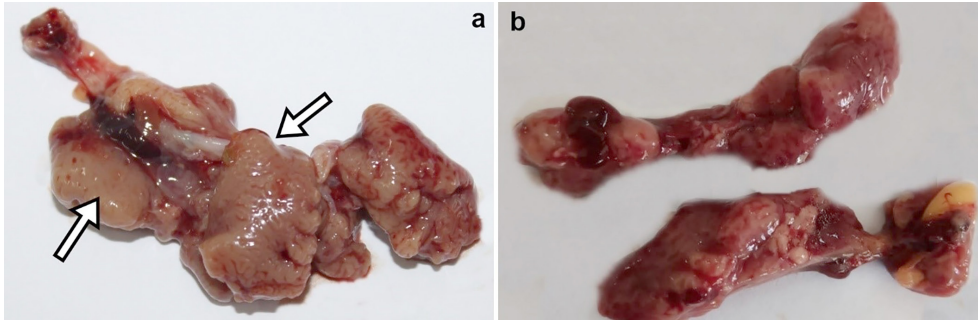
## Bulgular

### Makroskopik Bulgular

Çalışmanın 7 ve 14'üncü günlerinde nekropsileri yapılan MET, KONT, SMT ve MET+SMT grubu broilerlerin böbrek dokularında makroskopik bulguya rastlanmadı (Şekil 1b). Çalışmanın 21'inci gününde nekropsi yapılan MET grubuna ait böbreklerde dört, MET+SMT grubuna ait böbreklerde ise bir solgunluk ve şişkinlik olduğu görüldü (Şekil 1a). Yirmi sekizinci günde yapılan incelemede ise MET grubuna ait böbreklerde üç solgunluk ve iki şişkinlik gözlemlendi. Yirmi sekizinci günde ayrıca MET+SMT grubuna ait böbreklerde bir solgunluk ve bir şişkinlik tespit edildi. Makroskopik bulgular ve deneme hayvanlarında görülme sayıları Tablo 3'te sunulmuştur.

**Tablo 3.** Makroskopik bulgular ve deneme hayvanlarında görülme sayıları.

Nekropsi günü	Gruplar	Böbrek	
		Solgunluk	Şişkinlik
7	KONT	-	-
	MET	-	-
	SMT	-	-
	MET+SMT	-	-
14	KONT	-	-
	MET	-	-
	SMT	-	-
	MET+SMT	-	-
21	KONT	-	-
	MET	4	4
	SMT	-	-
	MET+SMT	1	1
28	KONT	-	-
	MET	3	2
	SMT	-	-
	MET+SMT	1	1



**Şekil 1. a)** MET grubuna ait bir böbrekte 21'inci günde solgun ve şişkin görünüm (oklar). **b)** MET-SMT grubuna ait bir böbrekte 7'nci günde normal görünüm.

### Mikroskopik Bulgular

Çalışmada histopatolojik olarak böbreklerde hiperemi, kanama, dejenerasyon, nekroz, proteinöz sıvı birikimi, bazal membranlarda kalınlaşma, yangısal hücre infiltrasyonu değerlendirildi (Şekil 2). Böbrek dokusundaki histopatolojik değişiklik skorlarının toplamına bakıldığında KONT, SMT ve MET+SMT kendi grupları arasında istatistiki olarak değişiklik ( $P > 0,05$ ) bulunmamıştır. MET grubunda 21'inci günde en şiddetli hasar olduğu, 28'inci günde şiddetli ( $P < 0,001$ ), 14'üncü günde daha hafif şiddette hasarlı olduğu ( $P < 0,05$ ) ve 7'inci günde ise anlam-

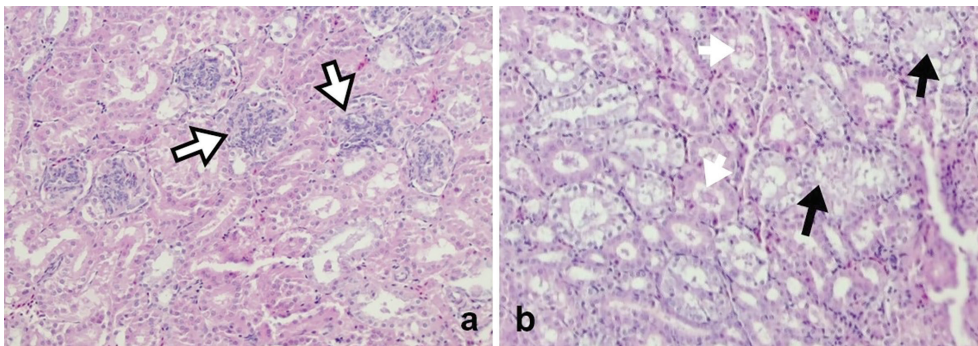
sız ( $P > 0,05$ ) olarak bulunmuştur. MET+SMT grubunda 28'inci gündeki sonuçları MET grubundan düşük, KONT ve SMT gruplarından yüksek olduğu ( $P < 0,001$ ), 21'inci gün sonuçlarına bakıldığında ise MET+SMT grubunun MET grubundan düşük, KONT ve SMT grupları ile istatistiksel olarak aynı olduğu görüldü. 14'üncü gün sonuçlarına bakıldığında MET+SMT grubunun MET grubundan düşük, KONT ve SMT gruplarından yüksek olduğu ( $P < 0,05$ ) tespit edilmiştir.

Böbreklerde görülen histopatolojik bulgulara ait istatistiksel karşılaştırma Tablo 4'de sunulmuştur.

**Tablo 4.** Böbreklerde görülen histopatolojik bulguların istatistiksel karşılaştırılması

Günler	Gruplar				P DEĞERİ
	KONT	SMT	MET	MET-SMT	
7	0,37±0,26	0,25±0,25	1,87±0,74c	0,87±0,64	$P > 0,05$
14	0,00±0,00B	0,37±0,37B	4,00±1,40cA	2,62±1,52AB	$P < 0,05$
21	0,50±0,37B	0,37±0,26B	8,75±2,24aA	3,37±1,52B	$P < 0,001$
28	0,71±0,35C	0,28±0,28C	14,00±1,22bA	6,57±2,08B	$P < 0,001$
P Değeri	$P > 0,05$	$P > 0,05$	a,b,c: $P < 0,001$	$P > 0,05$	

a,b,c: sütündeki farklılıkları, A,B,C: Satırdaki farklılıkları ifade etmektedir.



**Şekil 2. a)** MET grubuna ait bir böbrekte glomerulonefritis. Hücre proliferasyonu ve kalınlaşmaya bağlı Bowman boşlukları daralmış veya kapanmış (oklar). **b)** Tubulus epitelinde dejenerasyon (siyah oklar) ve tubulus lümenlerinde proteinöz sıvı birikimleri (beyaz oklar). H-E. Orijinal Büyütme 200X



**Biyokimyasal analizler**

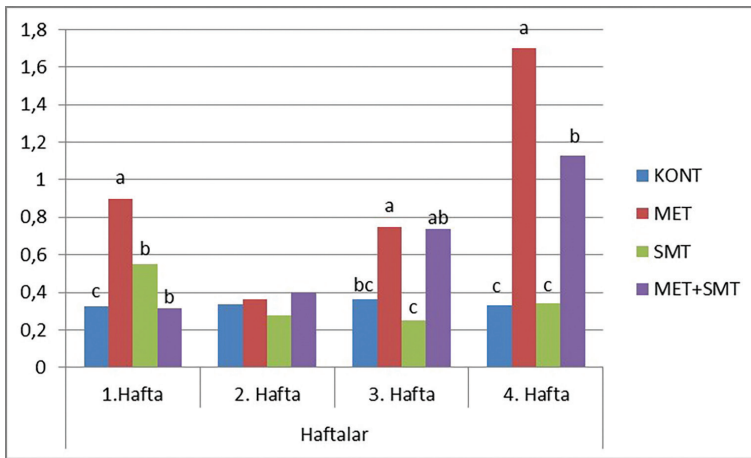
Tüm gruplardan elde edilen serum total protein, ürik asit ve kreatinin düzeyleri istatistiki karşılaştırılması

yapılmış olup tablo 4, 5 ve 6'da sunulmuştur. Grupların haftalık değişimleri ve ait olduğu parametrenin açıklamaları ayrıca şekil 3, 4 ve 5'te verilmiştir.

**Tablo 4.** Kreatinin düzeyinin haftalara göre değişiminin istatistik sonuçları.

Gruplar	KREATİNİN (mg/dL)				P Değeri
	1.Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	
KONT	0,325±0,12	0,337±0,20	0,362±0,10	0,328±0,21	P>0,05
MET	0,900±0,27	0,362±0,09 <sup>\$\$</sup>	0,750±0,50	1,700±0,20 <sup>\$\$</sup>	P<0,01
SMT	0,550±0,14	0,275±0,16 <sup>\$</sup>	0,250±0,16	0,342±0,11 <sup>\$</sup>	P<0,05
MET+SMT	0,312±0,13	0,400±0,16	0,737±0,16 <sup>\$\$\$</sup>	1,128±0,18 <sup>\$\$\$</sup>	P<0,001

\$ = P<0,05, \$\$ = P<0,01, \$\$\$ = P<0,001 değerlerini ifade etmektedir.



**Şekil 3.** Kreatinin düzeyinin haftalara göre değişimi. İstatistiksel farklılıklar anlamlılık derecesine göre a, b, c olarak harflendirilmiştir.

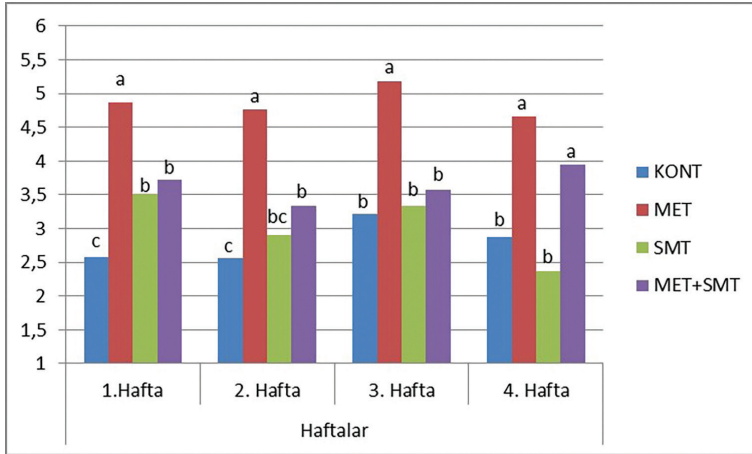
Kreatinin düzeyinin 2'nci, 3'üncü ve 4'üncü haftalardaki KONT grubu ile SMT grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamışken (P>0,05), 1'inci haftada fark anlamlı bulunmuştur (P<0,05). KONT grupları ile MET grupları karşılaştırıldığında 1'inci ve 3. haftada (P<0,05) anlamlı düzeyde, 4'üncü haftada

ise (P<0,001) düzeyinde çok önemli fark görülürken, 2'nci haftada fark bulunamamıştır (P>0,05). MET grubu ile MET+SMT grubunun, 2'nci ve 3'üncü haftalardaki istatistiksel olarak karşılaştırıldığında fark bulunamazken, 1'inci haftada (P<0,01), 4'üncü haftada ise (P<0,05) düzeyinde anlamlı olarak fark bulundu.

**Tablo 5.** Ürik asit düzeyinin haftalara göre değişiminin istatistiki olarak sonuçları.

Gruplar	ÜRİK ASİT (mg/mL)				P Değeri
	1.Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	
KONT	2,58±0,70	2,56±0,53	3,21±0,65	2,87±0,50	P>0,05
MET	4,87±0,44	4,76±0,50	5,18±1,23	4,66±0,87	P>0,05
SMT	3,52±0,35	2,9±0,47 <sup>\$</sup>	3,33±0,36	2,37±0,52 <sup>\$</sup>	P<0,05
MET+SMT	3,72±0,20	3,33±0,50	3,58±0,56	3,94±0,59	P>0,05

\$ = P<0,05 değerini ifade etmektedir.



**Şekil 4.** Ürik asit düzeyinin haftalara göre değişiminin grafik olarak sonuçları. İstatistiksel farklılıklar anlamlılık derecesine göre a, b, c olarak harflendirilmiştir.

Ürik asit düzeyinin 2'nci, 3'üncü ve 4'üncü haftadaki KONT grubu ile SMT grubu arasında istatistiksel olarak fark bulunmamışken 1'inci haftada anlamlı fark bulunmuştur ( $P < 0,05$ ). KONT grubu ile MET grubu karşılaştırıldığında 1'inci, 2'inci ve 3'üncü haftada ( $P < 0,01$ ) düzeyinde önemli, 2'inci haftadaki ( $P < 0,001$ ) düzeyinde çok önemli fark bulunurken, 3'üncü ve 4'üncü haftada ise fark bulunmamıştır ( $P > 0,05$ ). MET grubu ile MET+SMT grubunun 1'inci, 2'inci ve 3'üncü haftalar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında  $P < 0,05$  düzeyinde anlamlı olarak fark bul-

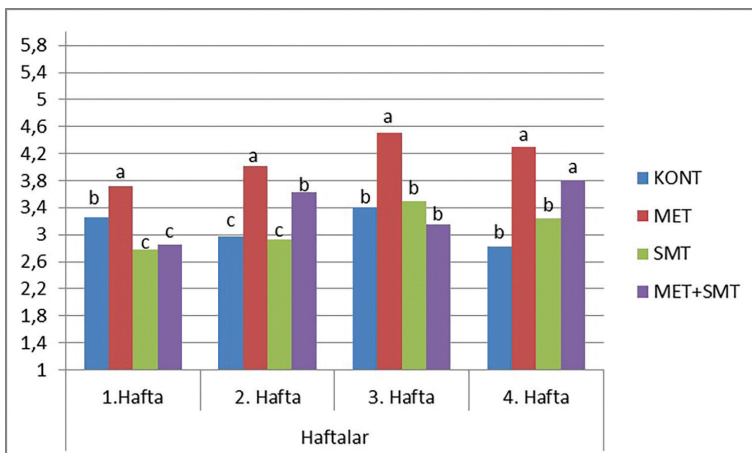
nurken, 4'üncü haftada anlamlı olarak fark bulunmamıştır ( $P > 0,05$ ).

Haftalara göre serum ürik asit düzeyi değişimleri KONT, MET ve MET+SMT gruplarının aynı grup içerisindeki 1'inci hafta sonuçları ile karşılaştırıldığında 2'inci, 3'üncü ve 4'üncü haftalarda istatistiksel olarak fark ( $P > 0,05$ ) bulunmamıştır. SMT grubunda ise 1'inci haftaya göre 2'inci haftada anlamlı ( $P < 0,05$ ) ve 4'üncü haftada da istatistiksel olarak önemli ( $P < 0,01$ ) farklılık bulunmuştur.

**Tablo 6.** Total Protein düzeyinin haftalara göre değişiminin istatistiki olarak sonuçları.

Gruplar	TOTAL PROTEİN (mg/mL)				P Değeri
	1.Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	
KONT	3,25±0,22	2,98±0,28	3,4±0,37	2,82±0,39 <sup>s</sup>	$P < 0,05$
MET	3,72±0,37	4,01±0,22	4,51±0,27 <sup>ss</sup>	4,30±0,45	$P < 0,01$
SMT	2,78±0,22	2,93±0,27	3,5±0,52 <sup>s</sup>	3,24±0,35	$P < 0,05$
MET+SMT	2,85±0,26	3,63±0,22 <sup>ss</sup>	3,15±0,27	3,80±0,16 <sup>sss</sup>	$P < 0,01$

\$ =  $P < 0,05$ , \$\$ =  $P < 0,01$ , \$\$\$ =  $P < 0,001$  değerlerini ifade etmektedir.



**Şekil 5.** Total Protein düzeyinin haftalara göre değişiminin grafik olarak sonuçları. İstatistiksel farklılıklar anlamlılık derecesine göre a, b, c olarak harflendirilmiştir.

Total Protein düzeyinin 2'nci, 3'üncü ve 4'üncü haftalardaki KONT grupları ile SMT grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamışken ( $P>0,05$ ), 1'inci haftada anlamlı fark bulunmuştur ( $P<0,05$ ). KONT grupları ile MET grupları karşılaştırıldığında 1'inci, 2'nci, 3'üncü ve 4'üncü haftalarda istatistiksel olarak ( $P<0,01$ ) değerinde önemli derecede fark bulunmuştur. MET grupları ile MET+SMT gruplarının 4'üncü haftada istatistiksel fark bulunmazken ( $P>0,05$ ), 1'inci ve 2'nci haftadaki total protein düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ( $P<0,05$ ) değerinde anlamlı, 3'üncü haftadaki düzeylerinin ise ( $P<0,01$ ) değerinde önemli olduğu bulunmuştur.

Haftalara göre serum total protein düzeyi değişimleri KONT grubunda 1'inci diğer haftalar karşılaştırıldığında 4'üncü haftada istatistiksel olarak anlamlı ( $P<0,05$ ) düşüş bulunmuştur. MET grubunda 1'inci haftaya göre yapılan kıyaslamada istatistiksel olarak 3'üncü haftada ( $P<0,01$ ) çok önemli düzeyde fark bulunmuştur. SMT grubunda 1'inci haftaya göre yapılan kıyaslamada istatistiksel olarak 3'üncü haftada ( $P<0,05$ ) anlamlı düzeyde farklılık tespit edilmiştir. MET+SMT grubunda 1'inci haftaya göre kıyaslandıklarında istatistiksel olarak 2'nci haftada ( $P<0,01$ ) düzeyinde önemli, 4'üncü haftada ise ( $P<0,001$ ) değerinde çok önemli olarak sonuç bulunmuştur.

## Tartışma

Karbamatlar karbamik asit türevleri olup pestisit, herbisit ve fungusit olarak kullanılırlar (Shalaby ve ark 2010). Methomyl [IUPAC: S- Metil N-( Metilkarbamoiloksi) tiyoasetimidat], bir mono-metil-karbamat olup pestisit olarak kullanılmaktadır. Methomyl ayrıca gıda maddelerinde kirletici olarak bulunabilen kalıntılardan birisidir (Makrides ve ark 2005). Pestisitler serbest radikallerin açığa çıkmasına neden olarak ya da serbest radikalleri süpüren antioksidan sistemlerde değişiklikler yaparak oksidatif stresi indükleyebilir (Banerjee ve ark 2001). Devedeni olarak da bilinen Silybum marianum bitkisinin tohumlarında bol miktarda bir flavonoid bileşiği olan silymarin etken maddesi mevcuttur (Kocaman ve Dabak 2015). Yapılan araştırmalarda Silymarinin antioksidan, antiviral, antiapoptotik, antienflamatuvar, antikarsinojenik, antianjiyojenik ve antifibrotik etkileri ortaya konulmuştur (Gür ve Aktaş 2022).

Çalışmada, broiler civcilerde Methomyl'in böbrek dokusundaki toksik sonuçları ile Silybum marianum tohumu tozunun nefroprotektif etkilerinin histopatolojik ve biyokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Methomyl ile ilişkili dejeneratif değişiklikler ve nefritik hasar, Methomyl kaynaklı oksidatif strese, lipid peroksidasyonuna ve sonuçta ortaya çıkan serbest radikal birikimine ve antioksidan sistemin bozulmasıyla ilişkilidir (El-Demerdash ve ark 2013). Çalışmamızda KONT ve SMT gruplarının böbrek histopatolojik skorları karşılaştırıldığında tüm haftalarda benzer sonuçlar olmakla birlikte MET grubunda yüksek skorlar alınmış MET+SMT grubunda ise yüksek düzeydeki hasarların azalmış olduğu dikkati çekmiştir. Şentürk ve ark (2010) tarafından yapılan bir çalışmada silymarinin böbrek dokuda oksidatif stresi azaltıcı etkisi olduğunu belirtmektedir. Bu sonuç SMT'nin oksidatif stresi düşürerek nefritik hasarı azalttığı yorumlanabilir.

Djefal ve ark (2015) Methomyl ile muamele edilen sıçanlarda, KONT grubu sıçanlarına göre önemli ölçüde daha yüksek üre ve kreatinin seviyeleri tespit etmişlerdir. Yine yapılan diğer bir çalışmada Sakr ve ark (2018), Methomyl uygulaması sonucu, kreatinin seviyesinde anlamlı ( $P<0,001$ ) artış belirlemiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada da kreatinin seviyesinin KONT grubuna göre MET grubunda uygulamaya bağlı olarak yaklaşık 5 kat artmış olması Djefal ve ark (2015)'nin çalışması ile uyumlu bulunmuştur. MET+SMT grubunda ise kreatinin seviyesinde azalma olması silymarinin böbreklerdeki hasarın azalmasına katkı sağlamış olabileceğini düşündürmüş, teyit amacıyla buna özel bir çalışma yapılmasının faydalı olacağı sonucuna varılmıştır.

Böbrekler, yüksek kan hacmi ve çözünen maddelerin konsantrasyonu edilmesiyile birlikte çevresel kirleticiler tarafından toksik saldırıya karşı duyarlıdır. Deneysel olarak rasyona thiram ve klorpirifos ilave edilen deneysel çalışmalarda böbrek tubüler epitel hücrelerinde dejenerasyon ve nekroz görülmüştür (Subapriya ve ark 2007, Krishnakumar ve Visvanathan 2014). MET ile deney hayvanlarında yapılan diğer çalışmalarda, böbreğin tubulus epitel hücrelerinde dejeneratif değişiklik, intertubuler alanda fokal yangısal hücre infiltrasyonu ve konjesyon belirlenmiştir (El-Demerdash ve ark 2013, Mansour ve ark 2015, Aslanturk ve Kalender 2021). Çalışmamızda Methomyl toksikasyonuna maruz kalan broilerlerin böbrek dokusunda tubul epitelinde dejenerasyon ve nekroz, Bowman bazal membranında kalınlaşma, intertubuler alanda kanama ve yangısal hücre infiltrasyonu tespit edilmiştir. Bu histopatolojik bulgular Methomyl'in broilerlerin böbrek dokusunda nefrotoksik etki gösterdiği bilgisini desteklemektedir. Cecen ve ark (2011)'nin Doksorubisin ile toksikasyon yapılan hayvanlarda böbrek dokusunun histopatolojik incelemesinde belirgin tübüler dejenerasyon

ve nekroz dahil önemli renal lezyonlar gözlenmiş ve Silymarin tedavisinin bu histopatolojik bulguları azalttığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmamızda da, MET grubunda, KONT grubuna göre tubulus epitellerinde nekroz ve Bowman bazal membranında kalınlaşma artarken, MET+SMT grubunda ise SMT ve KONT grubuna benzer olduğu görülmüştür. Ayrıca MET grubunda intertubuler yangısal hücre infiltrasyonu ve kanamanın MET-SMT grubuna göre fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular değerlendirildiğinde Methomyl'in nefrotoksik etkisine karşı, Silymarin böbrek dokusunda iyileştirici etki göstermiştir.

## Sonuç

Sonuç olarak Methomyl verilen grupta böbreklerde oluşan histopatolojik değişikliklerinin şiddetinin zamana bağlı olarak da artış gösterdiği, Methomylin özellikle 4'üncü haftada böbrek dokularında önemli düzeyde hasar meydana getirdiği görülmüş, koruyucu/iyileştirici amaçla verilen Silybum marianum'un tüm haftalarda biyokimyasal ve histopatolojik düzeyde hasarları azalttığı gözlemlenmiştir. Çalışmada biyokimyasal veriler değerlendirildiğinde; Kreatinin, Ürik asit ve Total protein değerleri de MET+SMT grubunda MET grubuna oranla daha düşük seviyede gözlenmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, broylerlerde Methomyl maruziyetine bağlı böbreklerde oluşabilecek toksik hasarın, hasarın yeni yapılacak rasyon çalışmaları doğrultusunda Silybum marianum Tohumu Tozu ilave edilerek azaltılabileceği önerilmiştir.

**Etik kurul kararı:** Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yerel Etik Kurulunun 05.05.2021 tarih ve 2021/7 sayılı kararı ile çalışmanın yapılması uygun görülmüştür.

## Kaynaklar

- Ashour MB, Ahmed OM, Asran A, Ali MA, 2017. Assessment of the preventive effects of *Salvia officinalis* and *Ruta graveolens* ethanolic leaf extracts on chlorpyrifos-and Methomyl-induced renal toxicity and oxidative stress in albino rats. *International journal of prevention and treatment*, 6(2), 34-44. DOI: 10.5923/j.ijpt.20170602.03
- Aslanturk A, Kalender Y, 2021. Methomyl-induced nephrotoxicity and protective effect of curcumin in male rats. *Toxicology research*, 10, 1003-1012. doi.org/10.1093/toxres/tfab080
- Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS, 2001. Pesticide-induced oxidative stress: perspective and trends. *Reviews on environmental health*, 16(1), 1-40. doi.org/10.1515/REVEH.2001.16.1.1
- Boucaud-Maitre D, Rambourg MO, Sinno-Tellier S, Puskarczyk E, Pineau X, Kammerer M, Bloch J, Langrand J, 2019. Human exposure to banned pesticides reported to the French Poison Control Centers: 2012-2016. *Environmental toxicology and pharmacology*, 69, 51-56. doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.017
- Cecen E, Dost T, Culhaci N, Karul A, Ergur B, Birincioglu M, 2011. Protective effects of silymarin against doxorubicin-induced

- toxicity. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 12(10), 2697-2704.
- Çelik AS, Kan Y, 2013. Konya ekolojik şartlarında yetiştirilen meryemana dikenli bitkisinin (*Silybum marianum*) tohum verimi, Silymarin ve sabit yağ bileşenlerinin belirlenmesi. *selcuk journal of agriculture and food sciences*, 27(1), 24-31.
- Çubukçu B, Meriçli AH, Mat A, Sarıyar G, Sütlüpinar N, Meriçli F, 2002. İ.Ü. eczacılık fakültesi farmakognozi anabilim dalı, fitoterapi yardımcı ders kitabı.
- Ding TM, Tian SJ, Zhang ZX, Gu DZ, Chen Y, Shi YH, Sun ZP, 2001. Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 26(1), 155-61. doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00364-8
- Djeffal A, Messarah M, Boumendjel A, Kadeche L, Feki AE, 2015. Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on Methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats. *Toxicology and industrial health*, 31(1), 31-43. doi.org/10.1177/0748233712468020
- El-Demerdash F, Dewar Y, ElMazoudy RH, Attia AA, 2013. Kidney antioxidant status, biochemical para MET ers and histopathological changes induced by Methomyl in CD-1 mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65(6), 897-01. doi.org/10.1016/j.etp.2013.01.002
- Erişim 1: <https://www.tarimorman.gov.tr/Konular/Bitki-Sagligi-Hizmetleri/Bitki-Koruma-Urunleri-Ve-Makinalari/Bitki-Koruma-Urunleri> Erişim tarihi:24.07.2023
- Gür FM, Aktaş İ, 2022. Silymarin protects kidneys from paclitaxel-induced nephrotoxicity. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 10(3), 452-58. doi.org/10.24925/turjaf.v10i3.452-458.5119
- Kocaman N, Dabak Ö, 2015. Hepatoprotektif bir ajan: silymarin. *Firat tıp dergisi*, 20(3), 128-32.
- Krishnakumar T, Visvanathan R, 2014. Acrylamide in food products: a review. *Journal of Food Processing and Technology*, 5(7). DOI: 10.4172/2157-7110.1000344
- Lin Z, Zhang W, Pang S, Huang Y, Mishra S, Bhatt P, Chen S, 2020. Current approaches to and future perspectives on Methomyl degradation in contaminated soil/water environments. *Molecules*, 25(3), 738. doi.org/10.3390/molecules25030738
- Luna LG (1968): *Manual of histologic staining Methods of the armed forces institute of pathology*, 3rd edn. McGraw- Hill, New York.
- Makrides C, Koukouvas M, Achillews G, Tsikkos S, Vounou E, Symeonides M, Christodoulides P, Ioannides M, 2005. Methomyl-induced severe acute pancreatitis: possible etiological association. *JOP*, 6(2), 166-71.
- Mansour SA, Mohamed RI, Ali AR, 2015. Which exposure period to selenium is more protective against hepato-renal toxicity of Methomyl in male rats. *J Biochem Int*, 2, 105-18.
- Meyerholz DK, Tintle NL, Beck AP, 2019. Common pitfalls in analysis of tissue scores. *Veterinary pathology*, 56(1), 39-42. doi.org/10.1177/0300985818794250
- Sakr S, Hassanien H, Bester MJ, Arbi S, Sobhy A, El Negris H, Steenkamp V, 2018. Beneficial effects of folic acid on the kidneys and testes of adult albino rats after exposure to Methomyl. *Toxicology research*, 7(3), 480-91. doi.org/10.1039/c7tx00309a
- Shalaby MA, El Zorba HY, Ziada RM, 2010. Reproductive toxicity of Methomyl insecticide in male rats and protective effect of folic acid. *Food and chemical toxicology*, 48(11), 3221-3226. doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.027
- Subapriya S, Vairamuthu S, Manohar BM, Balachandran C, 2007. Pathomorphological changes in thiram toxicosis in broiler chicken. *International Journal of Poultry Science*, 6(4), 251-54.
- Şentürk H, Kolankaya D, Şahin Y, 2010. Renal İskemi-Reperfüzyonu Sirasında Sıçan Böbreğinde Oluşan Oksidatif Stres Hasarına Silimarin Etkisi. *Cankaya University Journal of Science and Engineering*, 7 (1).



# Broyler rasyonlarında prebiyotik ve organik asit kullanımının performans ve bazı kan parametreleri üzerine etkilerinin belirlenmesi

Mustafa Coşar<sup>1\*</sup>, Mehmet Akif Karslı<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Genetik Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup> Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 16.05.2023, Kabul Tarihi / Accepted: 26.09.2023

**Özet:** Bu çalışmada broyler karma yemlerine prebiyotik, organik asit ve prebiyotik- organik asit kombinasyonunun ilavesinin performans, karkas ağırlığı ve bazı kan parametreleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada 160 adet günlük (Ross PM3) erkek broyler civciv kullanılmıştır. Kontrol grubu ve 3 deneme grubu olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur. Her grup 40 hayvan içermektedir. Bu gruplar da 4 alt grup olacak şekilde dizayn edilmiştir. Her alt grupta da 10'ar adet civciv bulunmaktadır. Deney grupları, prebiyotik (100 mg/kg) grubu, organik asit (3,0 g/kg) grubu ve prebiyotik (100 mg/kg)- organik asit (3,0 g /kg) grubu olarak dizayn edildi. Deneme 42 gün sürdü. Deneme süresince hayvanların canlı ağırlıkları, canlı ağırlık artışları, yem tüketimleri ve yemden yararlanma oranları haftalık olarak hesaplandı. Çalışmanın 42. gününde her alt gruptan 2'şer adet olmak üzere rastgele seçilen 32 adet broyler karkas ağırlığı ve kan parametrelerinin belirlenmesinde kullanıldı. Kesilen hayvanların sıcak ve soğuk karkas, karaciğer, kalp, dalak, taşlık, bezli mide ve Bursa fabricius ağırlıkları ile bağırsak uzunlukları belirlendi. Kan serumlarında LDL kolesterol, total kolesterol, glukoz, trigliserit, HDL kolesterol, total protein ve albümin düzeylerinin tayini gerçekleştirildi. Çalışma sonunda, deneme gruplarında canlı ağırlıklar ve canlı ağırlık artışları kontrol grubuna göre daha yüksek ( $P<0.05$ ), yem tüketimi prebiyotik grubunda daha yüksek ( $P<0.05$ ), fakat yemden yararlanma oranı prebiyotik-organik asit grubunda en düşük olarak belirlendi ( $P<0.00$ ). Deneme grupları arasında, LDL kolesterol, total kolesterol, trigliserid, total protein, albümin ve HDL kolesterol seviyesinde anlamlı farklar vardı ( $P<0.05$ ). Serum glikoz değerleri kontrol grubu ve deney grubunda benzerdi ( $P>0.05$ ). Kontrol ve deney grupları arasında karaciğer, kalp, dalak ve Bursa fabricius ağırlık ortalamaları yönünden anlamlı fark belirlenmedi ( $P>0.05$ ). Ancak, taşlık ve bezli mide ağırlıkları ve barsak uzunlukları gruplara göre anlamlı olarak farklıydı ( $P<0.05$ ). Biyokimyasal ve performans parametrelerine bakılarak kanatlılarda yem katkı maddesi olarak prebiyotik, organik asit ve prebiyotik-organik asit kombinasyonları yemlere katılabilir. Ancak bunların antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabilecekleri hususunda daha fazla ve detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** Broyler, kan parametreleri, organik asit, performans, prebiyotik

## Determination of the effects of prebiotic and organic acid use on performance and some blood parameters in broiler rations

**Abstract:** In this study, it was aimed to determine the effects of adding prebiotic, organic acid and prebiotic-organic acid combination to broiler mixed feeds on performance, carcass weight and some blood parameters. 160 day-old (Ross PM3) male broiler chicks were used in the study. Four groups were formed as control group and 3 experimental groups. Each group contains 40 animals. These groups were designed as 4 subgroups. There are 10 chicks in each subgroup. Experimental groups, prebiotic (100 mg/kg) group, organic acid (3,0 g/kg) group and prebiotic (100 mg/kg)- organic acid (3,0 g) /kg) group. The trial lasted 42 days. During the experiment, the live weights, live weight gains, feed consumption and feed conversion ratios of the animals were calculated on a weekly basis. On the 42nd day of the study, 32 randomly selected broiler carcasses, 2 from each subgroup, were used to determine the weight and blood parameters. The weights of hot and cold carcasses, liver, heart, spleen, gizzard-covered stomach and Bursa fabricius, and the lengths of intestine of slaughtered animals were determined. Blood samples were analyzed for the determination of LDL cholesterol, total cholesterol, glucose, triglyceride, HDL cholesterol, total protein and albumin levels in blood sera. At the end of the study, the live weights and live weight gains in the experimental groups were higher than those of control group ( $P<0.05$ ), the feed consumption was higher in the prebiotic group ( $P<0.05$ ), but feed conversion ratio was the lowest in the prebiotic-organic acid group ( $P<0.00$ ). Among the experimental groups, there were significant differences in LDL cholesterol, total cholesterol, triglyceride, total protein, albumin and HDL cholesterol levels ( $P<0.05$ ). The values of blood sera glucose were similar in the control group and experimental groups ( $P>0.05$ ). There was no significant difference between the control and experimental groups in terms of liver, heart, spleen and Bursa fabricius weight averages ( $P>0.05$ ). However, the weights of the gizzard and glandular stomachs, and the lengths of the intestines were significantly different according to the groups ( $P<0.05$ ). Considering the biochemical and performance parameters, prebiotic, organic acid and prebiotic-organic acid combinations can be added to the feeds as feed additives in poultry. However, there is a need for more and detailed studies on whether they can be used as an alternative to antibiotics.

**Keywords:** Blood parameters, broiler, organic acid, performance, prebiotic

**Yazışma adresi / Correspondence:** Mustafa Coşar, Etlık VKMAE Müdürlüğü Genetik Laboratuvarı, Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No: 23-1 Keçiören, Ankara e-posta: mustafa.cosar@tarimorman.gov.tr

\* Bu çalışma K.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesindeki birinci yazarın Doktora tezinden özetlenmiştir.

**ORCID IDs of the authors:** <sup>1</sup>0000-0002-9274-3826 • <sup>2</sup>0000-0002-3081-9450

## Giriş

Ülkemizin nüfusu hızlı bir şekilde çoğalmakta, çoğalan nüfus karşısında tabii kaynaklarımız ihtiyaçlarımızı istenilen düzeyde karşılayamamaktadır. Bu yüzden yeterli, etkili ve sağlıklı beslenme bir sorun haline gelmiştir. Yeterli, etkili ve sağlıklı beslenmeyi sağlamak için biyolojik açıdan yüksek sindirilebilir değerliliğe sahip besinlerin yeteri kadar tüketilmesi gerekmektedir. Bu nedenle yeterli, etkili ve sağlıklı beslenmede hayvansal kökenli besin maddeleri tercih edilmelidir (Yenilmez 2006; Yüzbaşı 2012; Coşar ve Karslı 2020). Hayvansal kökenli proteine ihtiyacı olan ülkelerde kırmızı et gibi beyaz et de son derece önemlidir. Tavuk etinin farklı tarzlarda tüketime sunulması, hazmı ve sindirimi kolay olması nedeniyle beyaz et oldukça rağbet görmektedir. Kanatlı hayvanlar yüksek üreme gücüne sahiptirler ve kanatlı hayvanların büyümesi ve gelişmesi hızlıdır. Tabii olarak kanatlıların beslenmesi bu manada ucuz ve kolaydır (Şenköylü 1991; Türkoğlu ve ark 1997; Erensayın 2001; Yüzbaşı 2012; Coşar ve Karslı 2020). Kanatlı broyler işletmelerinde amaç hayvan başına en az maliyetle en yüksek verimi elde edebilmektir (Şenköylü 1991; Türkoğlu ve ark 1997; Yenilmez 2006; Coşar ve Karslı 2020). Broylerlerin hızlı büyümesi, yemi etkili bir şekilde tüketmesi ve sağlıklı olması mide bağırsak sisteminin aktivitesiyle birebir ilişkilidir (Alp ve Kahraman 1996). Sindirim ve solunum sistemi hastalıklarının önlenmesi başta olmak üzere; sindirim sistemindeki patojen mikroorganizmaların üremesini durdurmak ve önlemek amacıyla hayvan yemlerine katılan antibiyotikler, bağırsaklardaki patojen bakterilerin yanı sıra vücut için yararlı olan mikroorganizmaların çoğalmasını da önlemektedirler (Aşan ve Özcan 2006). Ayrıca patojen bakteriler, antibiyotiklerin yemlerde koruyucu amaç için kullanılmalarına bağlı olarak zamanla bu antibiyotiklere karşı direnç kazanmaktadırlar (Alp ve Kahraman 1996; Aşan ve Özcan 2006). Antibiyotiklerin yem katkı maddesi amacıyla 2006'dan beri çiftlik hayvanlarında yemlere katılması Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde ve ülkemizde tamamen yasaklanmıştır (Buğdaycı 2008; Soğancı 2018). Bunun sonucu olarak da bilim adamları antibiyotiğe alternatif olarak doğal kökenli yem katkı maddelerini araştırmaya başlamışlardır (Soğancı 2018). Antibiyotiklere karşı alternatif yem katkısı olarak prebiyotik, prebiyotik, organik asit ve esansiyel yağlar geliştirilmiştir (Nir ve Şenköylü 2000; Buğdaycı 2008; Soğancı 2018). Prebiyotikler konakçının ince barsağındaki enzimlerden etkilenmeyen ve konakçı için faydalı olan laktobasilus ve bifidobakterium gibi bir ya da birkaç probiyotik bakterinin çoğalmasını sağlayan, insan ve hay-

van sağlığı için faydalı olan doğal ya da yapay besin maddeleridir (Manning ve Gibson 2004; Aşan ve Özcan 2006; Özden 2010; Soğancı 2018). Yapılan bir araştırmada, prebiyotiklerin insan gıdasına ve hayvan yemine ilave edilmesiyle dışkıda probiyotik bakterilerden bifidobakteriumun sayısının arttığı, buna karşılık konakçı için patojen olan bakterilerin sayısında kayda değer azalma olduğu tespit edilmiştir (Santos ve ark 2005; Soğancı 2018). Organik asitler doğadaki bitki ve hayvan gibi birçok organizmadan saf bir şekilde temin edilmektedir. Her bir organik asitin kendine has bir antimikrobiyel etki alanı mevcuttur. Laktik asitin (LA) bakteriler üzerine olan etkisi daha güçlüyken, salisilik asit (SA) antifungal özelliğe sahip olup mantarlar üzerine daha etkilidir ve küf oluşumunu engeller. Organik asitlerden propiyonik asit (PA) ve formik asitin (FA) antimikrobiyel spektrumunu ise daha geniş olup, hem bakterilere hem de maya ve funguslara etki edebilmektedir (Dibner ve Buttin 2002; Kamacı ve Şenköylü 2007). Kanatlı hayvanlar için toksik etki oluşturmadan broyler rasyonlarında rahatlıkla kullanılabilen organik asitler, hayvanların yemden yararlanma oranını ve günlük canlı ağırlık artışını pozitif olarak etkilemektedir. Bunun yanında antimikrobiyel etkileri sayesinde patojen bakteri, maya ve mantarların kontrolünde de görev alırlar. Broylerlerin yemine takviye edilen organik asitler, hayvanın kurağında pH'yı düşürür (Nir ve Şenköylü 2000; Kamacı ve Şenköylü 2007). Broylerlerin yemine yaklaşık %1 miktarında ilave edilen propiyonik asit ve formik asit kombinasyonu, geniş antimikrobiyel spektruma sahip oldukları için mikrofloradaki patojen bakteri, maya ve fungusların kolonida üremesini ve çoğalmasını önler; mukozaya tutunmasını zorlaştırır (Dibner ve Buttin 2002; Kamacı ve Şenköylü 2007). Çabuk ve ark'nın (2006) yaptığı bir araştırmada, kanatlı hayvanların yemine prebiyotik takviyesinin büyüme ve gelişme gibi performanslarına olumlu katkı yapmadığını ancak hayvanların canlı ağırlığına olumlu katkı sağladığı bildirilmiştir. Bildiricilerde rasyona prebiyotik ilavesinin hem büyümeyi ve gelişmeyi hem de dalak, B. fabricus ve timus organ ağırlıklarında çok iyi artışa neden olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (Soğancı 2018). Broyler ve bildiricin rasyonlarına prebiyotik ilavesi ile yapılan başka çalışmalarda da elde edilen sonuçların aynı olduğu söylenmektedir (Keser ve ark 2011; Tufan ve ark 2015). Broyler rasyonuna prebiyotik ilavesi ile yapılan başka araştırmalarda serum HDL kolesterol düzeylerinin yüksek olduğu buna karşılık LDL kolesterol düzeylerinin düşük olduğu durumlar da vardır (Sayed ve ark 2015; Li ve ark 2016). Tufan ve Arslan (2012) ise broyler rasyonuna prebiyotik ilavesi ile yaptıkları çalışmada kan serumunda hem HDL

kolesterol düzeyinin hem de LDL kolesterol düzeyinin düştüğünü tespit etmişlerdir. Broyler rasyonuna mannan oligosakkarit (MOS) ilave edilerek yapılan çalışmada, performansın ve serum trigliserit seviyesinin etkilenmediği, düşük dozdaki MOS'lerin (% 0,05) serum kolesterol seviyesini düşürdüğü, yüksek dozdaki MOS'lerin (% 0,10 ve 0,15) ise serum kolesterol seviyesini artırdığı ifade edilmiştir (Yalçınkaya ve ark 2008). Broyler rasyonuna MOS ve OZn ilave edilerek yapılan başka bir çalışmada, büyüme performansının etkilenmediği, bazı serum parametrelerinin ise değiştiği, MOS ve organik çinko grubunda bakır seviyesinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur (Yalçınkaya ve ark 2012).

Bu çalışmada bu bilgiler ışığında, broyler rasyonlarında prebiyotik, organik asit ve prebiyotik-organik asit kombinasyonu kullanımının performans ve bazı kan parametreleri üzerine etkilerinin belirlenmesi ve elde edilecek bulgular sonucunda yeme prebiyotik ve organik asit eklenmesinin faydalı olup olmayacağı araştırılacaktır.

## Materyal ve Metot

### Materyal

Çalışmada günlük 160 adet (Ross PM3) erkek broyler civciv kullanılmıştır. Her bir grup 40 hayvandan oluşacak şekilde 1 adet kontrol grubu ve 3 adet deneme grubu olmak üzere toplam 4 gruba ayrılmıştır. Bu gruplar da kendi içinde 10'ar adet broyler civcivden oluşan 4 alt grup olacak şekilde dizayın edilmiştir. Araştırma grupları; I- Kontrol grubu, II- Prebiyotik grubu, III- Organik asit grubu, IV- Prebiyotik-Organik asit grubu olacak şekilde tanzim edilmiştir. Çalışmada kullanılan günlük civcivler ticari damızlık işletmesinin kuluçkahanesinden alınıp araştırma kümesine getirilmiş ve teker teker tartılmak suretiyle kümeslere yerleştirilmiştir. Deneme çalışması 42 gün sürmüştür. Denemenin ilk iki haftalık döneminde civcivlere, %23,5 HP ve 3100 kcal/kg ME içeren temel broyler civciv rasyonu; 15. günden 42. günün sonuna kadar ise % 22 HP ve 3200 kcal/kg ME içeren temel broyler piliç rasyonu verilmiştir (Tablo 1). Kontrol grubuna sadece temel rasyon verilmiştir. Deneme gruplarından 1. gruba temel rasyon + prebiyotik (100 mg/kg), 2. gruba temel rasyon + organik asit (3,0 g/kg) ve 3. gruba temel rasyon + prebiyotik (100 mg/kg), + organik asit (3,0 g/kg) tozları verilmiştir. Bu çalışma, Etlik VKMAEM'in Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 2021/21 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

**Tablo 1.** Etlik civciv ve piliç rasyonlarının bileşimi (%).

<b>Yemler (DSA Agrifood Product Inc. Bakonyem Kırıkkale/ Ankara)</b>	<b>Broyler Civciv Rasyonu ( 0- 14gün)</b>	<b>Broyler Piliç Rasyonu ( 15- 42gün)</b>
Mısır	40,00	42,50
Buğday	9,50	10,00
Soya küspesi	25,00	23,00
Tam yağlı soya	15,00	15,00
Balık unu	3,30	1,30
Bitkisel yağ	3,90	4,90
Kireçtaşı	1,50	1,50
DCP	1,00	1,00
Tuz	0,25	0,25
Vitamin + Mineral premiksi*	0,35	0,35
DL-Methionin	0,20	0,20
<b>Hesapla bulunan</b>		
HP, %	23,50	22,00
ME, kcal/kg	3100	3200
Ca, %	0,89	0,88
P, %	0,60	0,58

\***Rovimix 124-F(Roche):** 2,5 kg'ında 15 000 000 IU Vitamin A, 1 500 000 IU Vitamin D3, 50 000 Vitamin E, 5000 mg Vitamin K3, 3 000 mg Vitamin B1, 6 000 mg Vitamin B2, 25 000 mg Niasin, 12 000mg Kalsiyum- D Pantotenat, 5000mg Vitamin B6, 30mg Vitamin B12, 1 000 mg Folik asit, 125 mg D- Biotin, 300 000 L-Lysin içerir. **Remineral 1 (Roche):** 1 kg'ında 80 000 mg Manganez, 30 000 mg Demir, 60 000 mg Çinko, 5 000 mg Bakır, 500 mg Kobalt, 2 000 mg İyot, 235 680 mg Kalsiyum Karbonat içerir.

Araştırma rasyonunda prebiyotik olarak inulin ve FOS takviye edici gıda, organik asit olarak da propiyonik asitin kalsiyum tuzu kullanılmıştır.

### Metot

Çalışmamız yerde kümeste yapılmıştır. Kümes altlığı olarak da odun talaşı kullanılmıştır. 42 günlük deneme süresince, broylerlerin günlük tüketebilecekleri miktardaki yem ve su hayvanlara ad-libitum olarak verilmiştir. Cıvcivlere ilk 3 gün boyunca, tepsi şeklindeki cıvciv yemlikleri ve sulukları ile daha sonra ise, değişik hacim ve büyüklükteki (3 kg, 5 kg, 10 kg, 15 kg'lık) suluk ve yemlikler ile su ve yem verilmiştir. Kümesin sıcaklığı cıvcivler kümese konmadan 1 gün öncesinde ısıtılarak 34°C'ye ayarlanmıştır. Kümes sıcaklığı ilk hafta 34°C olup, ilk haftadan sonra sıcaklık her hafta yaklaşık 2,5-3°C düşürülerek 20°C'ye sabitlenmiştir. Araştırmada kümesin aydınlatılması 24 saat esasına göre programlanmıştır. Aydınlatma gündüz pencerelerden gelen gün ışığı aracılığı ile sağlanmış, geceleri ise lambalarla yapılmıştır. Deneme süresince tüm grupların canlı ağırlıkları (CA), canlı ağırlık artışları (CAA), yem tüketimleri (YT) ve yemden yararlanma oranları (YYO) haftalık olarak hesaplanmıştır. Denemenin 42. gününde tüm broylerler tartılmıştır. Her gruptan rastgele 8 erkek broyler olmak üzere toplam 32 broyler kesilmiştir. Kesimden önce broylerler 12 saat aç bırakılmıştır. Kesimden sonra broylerlerin tüyleri elle yolunduktan sonra intertarsal eklemden ayakları ayrılmıştır. Ardından iç organları tamamen çıkarılan hayvanlar hassas terazide tartılarak sıcak karkas ağırlıkları (SKA) belirlenmiştir. Karkaslar, soğuk karkas tartımları yapılmak amacıyla, soğuk hava dolabına konulmuştur. Burada +4°C'de 18 saat bekletildikten sonra soğuk karkas ağırlıkları (SKA) tartılarak tespit edilmiştir. Kesilen broylerlerin iç organlarından karaciğer, dalak, kalp, taşlık, bezli mide ve Bursa fabricius'ları da hassas terazi ile tartılarak ağırlıkları belirlenmiştir. Ayrıca bağırsakların uzunlukları da tespit edilmiştir. Araştırmanın sonunda 12 saat aç bırakılan broylerlerden her gruptan 8'er adet hayvanın kanat altı venasından (Vena subcutanea ulnaris) toplam 32 adet kan örnekleri antikoagülsüz tüplere alınmıştır. Alınan 32 adet kan örneği 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek ependorf tüple-

re serumları ayrılmıştır. Serumlar analiz yapıncaya kadar -20°C'lik derin dondurucuda saklanmıştır. Kan serumlarında LDL kolesterol, total kolesterol, glikoz, trigliserit, HDL kolesterol, total protein ve albumin değerleri otoanalizör cihazı (Mindray BS-400, Çin) ile kolorimetrik yöntemlerle çalışan ticari kitler (Rel assay, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak çift okuma yapılarak tespit edilmiştir. Çalışmadaki gruplardan elde edilen verilerin istatistikî analizleri ile gruplara ait ortalama değerler arasında fark bulunup bulunmadığı tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile hesaplanmıştır. Gruplar arası farklılıkların tespitinde Duncan Çoklu Karşılaştırma testinden yararlanılmıştır (Duncan 1955). Bulgulara ait verilerin istatistikî analizleri SPSS paket programı (SPSS 20.0 evaluation version for Windows, Trial Version) kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ise elde edilen verilerin ortalama değerleri ve ortalama değerlere ait standart hata ( $\bar{X} \pm S\bar{X}$ ) şeklinde ifade edilmiştir.

### Bulgular

Yapılan çalışmada kullanılan temel rasyonların ham besin madde miktarları ile metabolize olabilir enerji değerleri Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2.** Rasyonların ham besin madde miktarları ve metabolize olabilir enerji (kcal/kg) değerleri.

	Etlik cıvciv yemi	Etlik piliç yemi
Kuru Madde (%)	90,30	91,05
Hamprotein (%)	23,50	22,10
Hamyağ (%)	4,80	5,90
Hamselüloz (%)	3,35	3,45
Hamkül (%)	5,50	5,15
Metabolize olabilir enerji (kcal/kg)	3115	3218

### Ortalama Canlı Ağırlıklar (CA)

Çalışmada kullanılan 4 gruba ait haftalık ortalama canlı ağırlıkları (CA) tablo 3'te verilmiştir. Tabloya göre çalışmanın ilk gününde cıvciv ağırlıkları dikkate alınarak gruplar arasında homojen bir dağılım sağlanmaya çalışılmıştır. Bu nedenle de cıvcivlerin başlagıç CA'ları bakımından istatistikî fark bulun-



mamıştır. Sunulan çalışmada, 1. haftada ortalama CA değerleri deneme gruplarında kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek ( $P<0,05$ ), deneme gruplarının kendi aralarında ise ortalama CA değerlerinin benzer olduğu görülmüştür ( $P>0,05$ ). Ortalama CA değerleri 2. ve 3. haftalarda kontrol grubu ile deneme grupları arasında benzer olup, önemli bir fark bulunmadığı ( $P>0,05$ ), 4. haftada 2. deneme grubu olan organik asit grubu ile 3. deneme grubu olan prebiyotik- organik asit grubu arasında önemli bir

fark olduğu ( $P<0,05$ ), 5. ve 6. haftalarda ise kontrol grubu ile deneme grupları arasında benzer olduğu gözlemlenmiştir ( $P>0,05$ ). Denemenin sonunda tüm grupların ortalama CA sıralamaları rakamsal olarak ise şöyledir: 1. Organik asit grubu: 3331,67 g, 2. Prebiyotik- Organik asit grubu: 3304,54 g, 3. Prebiyotik grubu: 3264,66 g ve 4. Kontrol grubu: 3248,01 gramdır. Kontrol grubuna göre prebiyotik grubunda % 0,51, prebiyotik- organik asit grubunda % 1,74 ve organik asit grubunda % 2,58 oranında daha fazla CAA sağlamıştır.

**Tablo 3.** Grupların haftalık ortalama canlı ağırlıkları, gr ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ ).

Yaş (Hafta)	Kontrol	Prebiyotik	Organik Asit	Prebiyotik-Organik Asit	P Değeri
BCA	41,15±0,41	41,37±0,40	40,68±0,31	40,675±0,57	0,60
1	167,55 <sup>b</sup> ± 3,39	177,325 <sup>a</sup> ± 2,68	179,200 <sup>a</sup> ± 3,21	177,51 <sup>a</sup> ± 2,38	0,02
2	477,33 ± 9,70	506,48± 11,35	497,30 ± 9,76	495,00 ± 8,00	0,20
3	1007,35± 17,64	1034,08 ± 20,94	1034,68 ± 17,39	988,75 ± 15,06	0,20
4	1644,73 <sup>ab</sup> ± 26,78	1631,08 <sup>ab</sup> ± 33,79	1698,38 <sup>a</sup> ± 31,29	1571,75 <sup>b</sup> ± 36,83	0,11
5	2408,13±42,85	2440,58±47,35	2506,43±38,73	2424,05±49,35	0,46
6	3248,01±24,18	3264,66±29,57	3331,67±35,44	3304,54±50,29	0,05

\* Aynı satırdaki farklı harf taşıyan ortalamalar arasında önemli farklılık bulunmaktadır ( $P<0,05$ ).

### Ortalama Canlı Ağırlık Artışları (CAA)

Çalışmada kullanılan 4 gruba ait haftalık ortalama canlı ağırlık artışları (CAA) tablo4'te verilmiştir. Tabloya göre 1. haftada ortalama CAA'ı kontrol grubunda deneme gruplarına göre önemli ölçüde düşük iken ( $P<0,05$ ), sonraki haftalarda ise kontrol grubu ile deneme grupları arasında önemli bir fark bulunmamaktadır ( $P>0,05$ ). Altı hafta boyunca grupların ortalama CAA'ında 3. deneme grubu olan prebiyotik- organik asit grubu ile 2. deneme grubu olan organik asit grubu benzer olup, bu iki grup ile

kontrol grubu arasında önemli bir fark bulunmaktadır ( $P<0,05$ ). Çalışmanın sonunda tüm grupların ortalama CAA sıralamaları rakamsal olarak ise şöyledir: 1. Prebiyotik- Organik asit grubunda: 3313,78 g, 2. Organik asit grubunda: 3303,94 g, 3. Prebiyotik grubunda: 3246,30 g ve 4. Kontrol grubunda: 3206,18 gramdır. Kontrol grubuna göre prebiyotik grubunda: % 1,25, organik asit grubunda: % 3,05 ve prebiyotik-organik asit grubunda: % 3,36 oranında daha fazla CAA değeri sağlamıştır.

**Tablo 4.** Grupların haftalık ortalama canlı ağırlık artışları, gr ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ ).

Yaş (Hafta)	Kontrol	Prebiyotik	Organik Asit	Prebiyotik-Organik Asit	P Değeri
1	126,4 <sup>b</sup> ± 3,31	135,95 <sup>a</sup> ± 2,66	138,51 <sup>a</sup> ± 3,21	136,83 <sup>a</sup> ± 2,45	0,02
2	309,77 ± 9,93	329,15± 11,17	318,10 ± 10,66	317,48 ± 8,42	0,60
3	530,03± 17,59	527,6 ± 22,99	537,38± 21,24	493,75 ± 16,42	0,41
4	637,38± 33,34	623,50 ± 40,16	676,70± 27,94	583 ± 33,23	0,46
5	763,40±45,89	809,50±48,27	808,05±44,66	852,30±64,75	0,64
6	839,88±49,37	824,08±49,94	825,24±56,45	880,49±62,00	0,64
0-6	3206,18 <sup>b</sup> ± 24,22	3246,30 <sup>ab</sup> ± 32,83	3303,94 <sup>a</sup> ± 33,14	3313,78 <sup>a</sup> ± 50,29	0,05

\* Aynı satırdaki farklı harf taşıyan ortalamalar arasında önemli farklılık bulunmaktadır ( $P<0,05$ ).

### Ortalama Yem Tüketimleri (YT)

Çalışmada kullanılan 4 gruba ait haftalık ortalama yem tüketimleri (YT) tablo 5'te verilmiştir. Tabloya göre çalışmada en yüksek YT'nin 1., 3., 4. ve 5. haftalarda 1. deneme grubu olan prebiyotik grubunda, 2. haftada 3. deneme grubu olan prebiyotik- organik asit grubunda. 6. haftada ise 2. deneme grubu olan organik asit grubunda olduğu görülmektedir. Çalışmada 1. haftada ortalama en yüksek YT'nin prebiyotik grubunda ( $P>0,05$ ), en düşük ise kontrol grubunda olduğu tespit edilmiş olup ( $P<0,05$ ), diğer iki deneme grubu arasında önemli bir fark bulunmamaktadır ( $P>0,05$ ). İkinci haftada ortalama YT'i 3. deneme grubu olan prebiyotik- organik asit grubunda daha yüksektir ( $P>0,05$ ). 3. deneme grubu olan prebiyotik- organik asit grubu ile kontrol grubu ve diğer deneme grupları arasında önemli bir fark bulunmaktadır ( $P<0,05$ ). Üçüncü haftada 1. de-

neme grubu olan prebiyotik grubunun YT'i yüksek olup ( $P<0,05$ ), ortalama YT'i bakımından prebiyotik grubu ile kontrol grubu ve diğer deneme grupları arasında önemli bir fark bulunmaktadır ( $P<0,05$ ). Dördüncü haftada 1. deneme grubu olan prebiyotik grubu ile 2. deneme grubu olan organik asit grubunun YT'leri diğer gruplara göre önemli derecede yüksek bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Beşinci haftada ortalama YT'i prebiyotik grubunda diğer gruplara oranla önemli derece yüksek olduğu görülmektedir ( $P<0,05$ ). Altıncı haftada ise ortalama YT'i organik asit grubunda oldukça yüksektir ( $P<0,05$ ). Deneme süresince en yüksek ortalama YT'nin prebiyotik grubunda olduğu, bu grubu kontrol grubu ile organik asit grubunun izlediği ve en düşük YT'nin ise 3. deneme grubu olan prebiyotik- organik asit grubunda olduğu tespit edilmiştir ( $P<0,00$ ).

**Tablo 5.** Grupların haftalık ortalama yem tüketimleri, gr ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ ).

Yaş (Hafta)	Kontrol	Prebiyotik	Organik Asit	Prebiyotik-Organik Asit	P Değeri
1	175,26 <sup>c</sup> ± 0,54	227,71 <sup>a</sup> ± 0,91	200,62 <sup>b</sup> ± 0,66	202,17 <sup>b</sup> ± 1,6	0,00
2	516,84 <sup>b</sup> ± 3,54	511,88 <sup>b</sup> ± 3,7	478,85 <sup>c</sup> ± 0,45	539,99 <sup>a</sup> ± 0,46	0,00
3	814,54 <sup>b</sup> ± 5,83	843,42 <sup>a</sup> ± 3,18	720,79 <sup>c</sup> ± 2,76	717,04 <sup>c</sup> ± 2,87	0,00
4	842,19 <sup>b</sup> ± 6,59	985,05 <sup>a</sup> ± 0,09	968,35 <sup>a</sup> ± 8,44	830,55 <sup>b</sup> ± 7,35	0,00
5	1181,90 <sup>b</sup> ± 1,61	1316,52 <sup>a</sup> ± 14,81	1208,90 <sup>b</sup> ± 11,13	1098,27 <sup>c</sup> ± 8,52	0,00
6	1535,77 <sup>c</sup> ± 1,96	1572,30 <sup>b</sup> ± 2,02	1578,85 <sup>a</sup> ± 1,99	1568,95 <sup>b</sup> ± 2,84	0,00
0-6	5066,51 <sup>c</sup> ± 15,24	5456,90 <sup>a</sup> ± 13,41	5156,37 <sup>b</sup> ± 22,19	4956,99 <sup>d</sup> ± 20,48	0,00

\* Aynı satırdaki farklı harf taşıyan ortalamalar arasında önemli farklılık bulunmaktadır ( $P<0,05$ ).

### Yemden Yararlanma Oranları (YYO)

Çalışmada kullanılan 4 gruba ait haftalık ortalama yemden yararlanma oranları (YYO) tablo 6'da verilmiştir. Tablo 6'ya göre çalışmanın ilk 3 haftasında en iyi YYO'nun 2. deneme grubu olan organik asit grubunda ( $P<0,00$ ), 4. haftadan sonra ve tüm deneme süresi dikkate alındığında ise en iyi YYO'nun 3. dene-

me grubu olan prebiyotik- organik asit grubunda olduğu ( $P<0,00$ ) ve bu grup ile diğer gruplar arasında önemli bir fark bulunduğu görülmektedir ( $P<0,00$ ). Çalışmanın sonunda ortalama YYO'ları sırasıyla rakamsal olarak şöyledir: 1. Prebiyotik- Organik asit grubu: 1,52, 2. Kontrol grubu: 1,58, 3. Organik asit grubu grubu: 1,58 ve 4. Prebiyotik grubu: 1,71'tir.

**Tablo 6.** Grupların haftalık yemden yararlanma oranları, kg yem/ kg canlı ağırlık artışı, ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ ).

Yaş (Hafta)	Kontrol	Prebiyotik	Organik Asit	Prebiyotik-Organik Asit	P Değeri
1	1,4675 <sup>c</sup> ± 0,01	1,8380 <sup>a</sup> ± 0,01	1,4483 <sup>c</sup> ± 0,00	1,5289 <sup>b</sup> ± 0,01	0,00
2	1,6450 <sup>b</sup> ± 0,02	1,5719 <sup>c</sup> ± 0,015	1,5052 <sup>d</sup> ± 0,00	1,7478 <sup>a</sup> ± 0,01	0,00
3	1,5382 <sup>b</sup> ± 0,01	1,6547 <sup>a</sup> ± 0,00	1,4580 <sup>c</sup> ± 0,01	1,5359 <sup>b</sup> ± 0,01	0,00
4	1,3479 <sup>c</sup> ± 0,01	1,6218 <sup>a</sup> ± 0,01	1,5040 <sup>b</sup> ± 0,02	1,3461 <sup>c</sup> ± 0,02	0,00
5	1,5874 <sup>b</sup> ± 0,03	1,7244 <sup>a</sup> ± 0,01	1,5538 <sup>b</sup> ± 0,03	1,3965 <sup>c</sup> ± 0,01	0,00
6	1,8962 <sup>c</sup> ± 0,01	1,9581 <sup>a</sup> ± 0,00	1,9349 <sup>b</sup> ± 0,01	1,7195 <sup>d</sup> ± 0,01	0,00
0-6	1,58 <sup>b</sup> ± 0,02	1,71 <sup>a</sup> ± 0,00	1,58 <sup>b</sup> ± 0,01	1,52 <sup>c</sup> ± 0,01	0,00

\* Aynı satırdaki farklı harf taşıyan ortalamalar arasında önemli farklılık bulunmaktadır ( $P<0,05$ ).

### Karkas Verimi, İç Organ Ağırlıkları ve Bağırsak Uzunluğu

Çalışmadaki broylerlere ait karkas verim özellikleri, iç organ ağırlıkları ve bağırsak uzunlukları tablo 7'de verilmiştir. Tabloya göre rastgele seçilen broylerden en iyi ortalama CA'nın, 3. deneme grubu olan prebiyotik- organik asit grubu ile 2. deneme grubu olan organik asit grubunda olduğu görülmüştür ( $P<0,01$ ). Ortalama CA'da prebiyotik- organik asit grubu ile organik asit grubu benzer ( $P>0,05$ ) iken, CA'da bu gruplar ile kontrol grubu arasında önemli bir fark ortaya çıkmıştır ( $P<0,01$ ). En iyi ortalama sıcak ve soğuk karkas ağırlıklarının 3. deneme grubu olan prebiyotik- organik asit grubunda olduğu görülmektedir ( $P<0,00$ ). 3. deneme grubu olan prebiyotik- organik asit grubu ile kontrol grubu ve prebiyotik grubu arasında önemli bir fark bulunmaktadır ( $P<0,00$ ). En iyi ortalama sıcak ve soğuk karkas randımanları kontrol grubu ile 3. deneme grubu olan prebiyotik- organik asit grubunda olduğu görülmektedir ( $P<0,01$ ). Bu gruplar ile diğer iki deneme grubu arasındaki fark

ise önemli bulunmuştur ( $P<0,01$ ). Karaciğer, kalp, dalak ve Bursa fabricius'a ait ortalama ağırlıklarda kontrol grubu ile deneme grupları arasında önemli bir fark bulunmamaktadır ( $P>0,05$ ). Taşlık ve bezsel midenin ortalama ağırlıklarında prebiyotik grubu ile kontrol grubu arasında önemli bir fark bulunmaktadır ( $P<0,05$ ). Bağırsakların ortalama uzunluklarında 3. deneme grubu olan prebiyotik- organik asit grubu ile kontrol grubu arasında önemli bir fark bulunmaktadır ( $P<0,05$ ). En iyi ortalama CA (3537,75 g), sıcak KA'ı (2716,26 g), sıcak KR'ı (% 76,31), soğuk KA'ı (2690,56 g), soğuk KR'ı (% 75,61) ve kalp ağırlığı (70,93 g) ile 3. deneme grubu olan prebiyotik- organik asit grubunda elde edilmiştir. Kalp ve dalağın ortalama ağırlıkları hemen hemen tüm gruplarda aynıdır. Taşlık ve Bezli Midenin ortalama ağırlığı en iyi 59,18 g ile prebiyotik grubunda bulunmuştur. B. Fabricius'un en iyi ortalama ağırlığı 6,3 g ile organik asit grubunda elde edilmiştir. Ortalama bağırsak uzunluğu 233,88 cm ile 3. deneme grubu olan prebiyotik- organik asit grubunda bulunmuştur.

**Tablo 7.** Karkas verim özellikleri, iç organ ağırlıkları, bağırsak uzunlukları ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ ).

Parametreler	Kontrol	Prebiyotik	Organik Asit	Prebiyotik-Organik Asit	P Değeri
Canlı Ağırlık, gr	3254,38 <sup>b</sup> ± 45,18	3403,38 <sup>ab</sup> ± 42,24	3450,13 <sup>a</sup> ± 42,96	3537,75 <sup>a</sup> ± 70,58	0,01
Sıcak Karkas Ağırlığı, gr	2469,25 <sup>b</sup> ± 32,15	2507,18 <sup>b</sup> ± 35,36	2585,26 <sup>ab</sup> ± 45,26	2716,26 <sup>a</sup> ± 62,49	0,00
Sıcak Karkas Randımanı, %	75,90 <sup>a</sup> ±0,70	73,90 <sup>b</sup> ±0,60	74,12 <sup>b</sup> ±0,55	76,31 <sup>a</sup> ±0,44	0,01
Soğuk Karkas Ağırlığı, gr	2445,25 <sup>b</sup> ± 31,84	2484,18 <sup>b</sup> ± 35,87	2561,62 <sup>ab</sup> ± 44,85	2690,56 <sup>a</sup> ±61,46	0,00
Soğuk Karkas Randımanı, %	75,16 <sup>a</sup> ±0,69	73,22 <sup>b</sup> ±0,61	73,44 <sup>b</sup> ±0,56	75,61 <sup>a</sup> ±0,44	0,01
Karaciğer Ağırlığı, gr	65,86± 3,14	69,87±1,78	69,56±2,52	70,93±2,81	0,55
Kalp Ağırlığı, gr	15,68±0,68	15,06±0,40	15±0,68	15,12±0,73	0,86
Dalak Ağırlık, gr	3,68±0,35	3,56±0,39	3,62±0,52	3,68±0,41	0,99
Taşlık ve Bezli Mide, gr	53,05 <sup>b</sup> ±1,07	59,18 <sup>a</sup> ±1,78	58,5 <sup>ab</sup> ±1,95	57,31 <sup>ab</sup> ±2,37	0,11
B. Fabricius Ağırlığı, gr	6,21±0,34	5,88±0,23	6,3±0,51	5,33±0,33	0,27
Bağırsak Uzunluğu, cm	227,75 <sup>b</sup> ±1,80	232,25 <sup>ab</sup> ±1,79	233 <sup>ab</sup> ±1,51	233,88 <sup>a</sup> ±2,22	0,11

\* Aynı satırdaki farklı harf taşıyan ortalamalar arasında önemli farklılık bulunmaktadır ( $P<0,05$ ).

### Kan Serum Parametreleri

Çalışmadaki tüm gruplara ait kan serumlarının bazı parametrelerini gösteren sonuçlar tablo 8'de verilmiştir. Ortalama LDL kolesterol değeri 20,5 mg/ dl ile 28,5 mg/ dl arasında değişmekte olup, 28,5 mg/ dl ile en yüksek organik asit grubunda iken 20,5 mg/ dl ile en düşük prebiyotik grubunda bulunmuştur ( $P<0,04$ ). Ortalama total kolesterol değeri, 103,13 mg/dl ile 116,25 mg/dl arasında değişmekte olup, 103,13 mg/dl ile en düşük yine prebiyotik grubunda tespit edilmiştir ( $P<0,04$ ). Grupların ortalama serum glikoz değerleri 222,00 mg/dl ile 242,38 mg/dl ara-

sında olup, grupların ortalama serum glikoz değerleri arasında önemli bir fark saptanmamıştır ( $P>0,05$ ). Ortalama trigliserit değeri, 63,75 mg/dl ile 127,5 mg/ dl arasında olup, 127,5 mg/dl ile en yüksek organik asit grubunda iken 63,75 mg/dl ile en düşük kontrol grubunda bulunmuştur ( $P<0,00$ ). Ortalama serum HDL kolesterol değeri 128,23 mg/dl ile 357,03 mg/ dl arasında olup, 3. deneme grubu olan prebiyotik- organik asit ile organik asit grublarında, kontrol ve prebiyotik gruplarına oranla önemli düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $P<0,00$ ). Serum total protein değeri 3,38 g/dl ile 3,94 g/dl arasında olup, total

protein değeri açısından yalnızca kontrol grubu ile prebiyotik grubu arasında önemli bir fark bulunmaktadır ( $P<0,02$ ). Ortalama albümin değeri, 1,37 g/dl ile 1,54 g/dl arasında değişmekte olup, ortalama albümin değeri 1,54 g/dl ile en yüksek kontrol

grubunda iken 1,37 g/dl ile en düşük prebiyotik grubunda gözlemlenmiştir ( $P<0,03$ ). Ortalama albümin değeri kontrol grubu ile 3. deneme grubu olan prebiyotik- organik asit grubunda benzerdir ( $P>0,05$ ).

**Tablo 8.** Gruplardaki bazı kan serumu parametreleri, ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ )

Parametreler	Kontrol	Prebiyotik	Organik Asit	Prebiyotik-Organik Asit	P Değeri
LDL Kolesterol (mg/dl)	24,00 <sup>ab</sup> ±2,13	20,50 <sup>b</sup> ±1,08	28,50 <sup>a</sup> ±2,60	23,25 <sup>ab</sup> ±1,11	0,04
Total Kolesterol (mg/dl)	114,13 <sup>a</sup> ±3,13	103,13 <sup>b</sup> ±4,88	116,25 <sup>a</sup> ±3,18	116,25 <sup>a</sup> ±2,87	0,04
Glikoz (mg/dl)	222,00±10,43	242,38±11,66	222,00±9,37	241,13±5,43	0,25
Trigliserit (mg/dl)	63,75 <sup>c</sup> ±6,23	89,63 <sup>bc</sup> ±13,36	127,50 <sup>a</sup> ±8,02	112,63 <sup>ab</sup> ±10,79	0,00
HDL Kolesterol (mg/dl)	128,23 <sup>b</sup> ±28,21	133,35 <sup>b</sup> ±22,59	322,23 <sup>a</sup> ±39,35	357,03 <sup>a</sup> ±40,35	0,00
Total protein (g/dl)	3,94 <sup>a</sup> ±0,14	3,38 <sup>b</sup> ±0,1	3,67 <sup>ab</sup> ±0,12	3,66 <sup>ab</sup> ±0,11	0,02
Albümin (g/dl)	1,54 <sup>a</sup> ±0,036	1,37 <sup>b</sup> ±0,041	1,46 <sup>ab</sup> ±0,031	1,49 <sup>a</sup> ±0,045	0,03

\* Aynı satırdaki farklı harf taşıyan ortalamalar arasında önemli farklılık bulunmaktadır ( $P<0,05$ ).

## Tartışma ve Sonuç

Ülkemiz insanlarında yeterli, etkili ve sağlıklı beslenmeyi sağlamak için biyolojik açıdan yüksek sindirilebilir değerliliğe sahip besinlerin yeteri kadar tüketilmesi gerekmektedir. Bunun için de günlük beslenmede hayvansal kökenli besin maddeleri tercih edilmelidir (Yüzbaşı 2012; Coşar ve Karslı 2020). Hayvansal kökenli proteine ihtiyacı olan ülkelerde kırmızı et gibi beyaz et de son derece önemlidir. Tavuk etinin farklı tarzlarda tüketime sunulması, hazmı ve sindirimi kolay olması nedeniyle beyaz et oldukça rağbet görmektedir. Kanatlı hayvanlar yüksek üreme gücüne sahiptirler ve kanatlı hayvanların büyümesi ve gelişmesi hızlıdır. Tabi olarak kanatlıların beslenmesi bu manada ucuz ve kolaydır (Şenköylü 1991; Türkoğlu ve ark 1997; Erensayın 2001; Yüzbaşı 2012; Coşar ve Karslı 2020). Kanatlı broyler işletmelerinde amaç hayvan başına en az maliyetle en yüksek verimi elde edebilmektir (Şenköylü 1991; Türkoğlu ve ark 1997; Yenilmez 2006; Coşar ve Karslı 2020). Üretimi ve verimi artırmada yem katkı maddeleri ise önemli bir paya sahiptir. Bunun üzerine yem katkısı olarak probiyotik, prebiyotik, organik asit ve esansiyel yağlar geliştirilmiştir (Nir ve Şenköylü 2000; Buğdaycı 2008; Soğancı 2018). Her gün bu alanda yeni arayış ve çalışmalar yapılmaktadır. Ancak henüz istenilen sonuca ulaşılamamıştır. Gelecekte broyler rasyonlarında inülin, FOS, MOS ve KOS gibi prebiyotiklerin kullanımının ve uygulama dozlarının tespiti için çok fazla çalışma yapılmasının gerekli olduğu ifade edilmiştir (Yalçınkaya, Güngör, Başalan ve Erdem, 2008; Leblebicier ve Aydoğan, 2018). Bu çalışmada da broyler rasyonlarında prebiyotik, organik

asit ve prebiyotik- organik asit kombinasyonlarının kullanımıyla performans ve bazı kan parametreleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

## Ortalama Canlı Ağırlıklar (CA) ve Canlı Ağırlık Artışları (CAA)

Broyler yemlerinde, antibiyotiklere ihtiyaç duymaksızın, uygun doz ve miktarda prebiyotik kullanmanın büyütme faktörü olarak yem katkı maddesi olabileceği açıklanmıştır (Huang 2005a; Soğancı 2018). Sunulan çalışma boyunca gruplar arasında haftalara göre istatistiksel farklılıklar oluşsa da, deneme sonu canlı ağırlıklar, ağırlık değişimi, canlı ağırlık artış değerleri istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ( $P>0,05$ ). Ancak temel rasyona prebiyotik, organik asit ve prebiyotik- organik asit kombinasyonunun ilave edilmesi canlı ağırlıklar ve canlı ağırlık artış değerlerinde azda olsa olumlu yönde katkı sağladığını göstermektedir. Prebiyotikler ile ilgili olarak yapılan benzer bir çalışmada, kanatlı hayvanların yemine MOS ilavesinin hayvanların performanslarına olumlu katkı yaptığı bildirilmiştir (Evrensel 2009; Kahraman ve ark 2009). Evrensel (2009) tarafından broyler rasyonuna prebiyotik ve organik asit kombinasyonu ilave edilerek yapılan bir çalışmada, en iyi CA'nın 2576,43 gr ile prebiyotik- organik asit kombinasyonu içeren rasyonla beslenen deneme grubunda elde edildiği ortaya konulmuştur. Bizim çalışmamızda da en iyi CA'lar 3331,67 g ile organik asit (deneme grubu-2) ve 3304,54 g ile prebiyotik- organik asit (deneme grubu-3) kombinasyonu içeren rasyonla beslenen deneme gruplarında elde edilmiştir. Soğancı (2018) ise broylerlerde farklı dozlarda prebiyotik ile yaptığı benzer bir çalışmada, dönem süresince 100

mg ve 150 mg prebiyotik ihtiva eden denemelerde YYO'nun daha fazla olduğunu, broylelerde prebiyotik CAA ve YYO'ya olumlu katkı sağladığını, broyle yemine 100 mg prebiyotik ilavesinin metabolik faaliyetler ve CAA konusunda antibiyotiklere eş değer olabileceğini açıklamıştır. Bu bulgular bizim çalışmamızı desteklemektedir. Çabuk ve ark'nın (2006) yaptığı benzer bir çalışmada, kanatlı hayvanların yemine prebiyotik takviyesinin büyüme ve gelişme gibi performanslarına olumlu katkı yapmadığını ancak hayvanların canlı ağırlığına olumlu katkı sağladığını bildirilmiştir. Benzer başka bir çalışmada Chen ve ark (2005a), doğal hindiba kaynaklı oligofruktoz ve inulinin yeme % 1 oranlarında ilavesiyle yumurtacı tavuklarda yumurta verimine olan etkisini tespit etmeye çalışmışlardır. Kontrol grubu dikkate alındığında haftalık yumurta üretiminin % 13,35 ve % 10,73 oranlarında arttığı, yumurta ağırlığının uygulama boyunca korunduğu, bağırsak uzunluklarının arttığı ve yemin etkin bir şekilde kullanıldığı, ancak yumurta albüminde kalite bakımından her hangi bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Kırkpınar ve ark (1999), yaptıkları diğer bir çalışmada, broyle rasyonuna yem katkı maddesi olarak organik asit kombinasyonu (LA, FA, PA, SA ve FA'in tuzları) ile probiyotik (*Aspergillus spp.*) ilave ederek performans kriterlerine olan etkiyi bulmaya çalışmışlardır. Çalışma bitiminde rasyona organik asit kombinasyonu ve probiyotik ilavesinin CA'ya pozitif katkı sağladığını bildirilmiştir. Yusrızal ve Chen (2003) tarafından broyle rasyonuna prebiyotik (oligofruktoz) ilave ederek yapılan bir çalışmada ise CA ve YYO'larının erkek hayvanlarda değişmediği ancak dişi hayvanlarda % 9 ile % 10 oranlarında olumlu katkı sağladığı bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda ise damızlık ve etlik broylelerde, yeme MOS ilavesinin hayvanların performanslarına olumlu katkı yapmadığı bildirilmiştir (Kahraman 1999; Shashidhara ve Devegovda 2003; Öztürk ve Yıldırım 2005). Yukarıdaki çalışmalarda elde edilen çoğu bulgular mevcut çalışma ile benzerdir. Bununla birlikte bazı değişik bulguların elde edilmesinin hayvanların ırkı, cinsiyeti, verim yönü ve katkı maddelerinin dozlarındaki farklılıklardan kaynaklandığı şeklinde düşünülmektedir. Benzer bir çalışmada Huang ve ark (2005b), broyle yemlerine farklı dozlarda (50 mg, 100 mg ve 150 mg) prebiyotik ilave ederek yaptıkları bir çalışmanın sonunda, 100 mg prebiyotik ilave edilen grupta CAA' olduğunu, ancak 50 mg ve 150 mg prebiyotik ilave edilen gruplarda ise CAA'ında her hangi bir fark olmadığını ifade etmiştir. 100 mg prebiyotik ilave edilen grupta CAA' olması mevcut çalışmanın bulgularını desteklemektedir. Broylelerde rasyona prebiyotik ilave edilmesinin CAA'na ve yem tüketimine olumlu yön-

de katkı sağladığı başka çalışmalarda da belirtilmiştir (Huang ve ark 2005b; Li ve ark 2007; Khambualai ve ark 2009; Swiatkiewicz ve ark 2014; Soğancı 2018). Etlik piliç rasyonuna 7. ile 30. gün arasında değişik miktarlarda (1, 3, 5 g/kg) Bio-Mos takviye edilerek yapılan çalışmada ise, Bio-Mos takviyesi yapılan tüm gruplarda CAA yönünden olumlu sonuç alındığı bildirilmiştir (Iji ve Tivey 1998; Evrensel 2009). Bizim çalışmamızdaki CAA'yı desteklemektedir. Diğer bir çalışmada Mathis ve ark (2005), nekrotik enteritis enfeksiyonuna sahip broyle civcivlerin rasyonuna organik asit ilave ederek organik asitlerin etkinliğini araştırmışlardır. Bu araştırmacılar araştırma bitiminde organik asit ilave edilen deneme gruplarında kontrole nazaran CAA'nın % 29, YYO'nun % 8 artmış olduğunu ve N. enteritis'e bağlı ölümlerin de % 43 azaldığını bildirmişlerdir. Benzer çalışmada Chen ve Chen (2003a) ise doğal bir prebiyotik olan ve hindibadan ele edilen inulinin etlik piliçlerde büyüme, gelişme ve performansına olan etkisini araştırmışlardır. Bu araştırmacılar çalışmada CAA, YYO, karkas ağırlığına, karkas randımanına ve bağırsak uzunluğuna olumlu katkı sağladığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da bu performansları içeren en iyi deneme grubu prebiyotik – organik asit grubu olmuştur. Khambualai ve ark (2008), broylelerde farklı oranlarda (% 0,01, % 0,03, % 0,06) prebiyotik ilavesiyle yaptıkları bir çalışmada, düşük dozda prebiyotik kullanmanın kanda yağ düzeyini değiştirmediğini ancak canlı ağırlık artışı ve yemden yararlanma oranı gibi performans kriterlerinin daha iyi olabileceğini beyan etmişlerdir. Hadorn ve ark (2000), broyle rasyonuna değişik oranlarda (% 0,03, % 0,06 ve % 0,09) organik asit takviyesi ile yaptığı bir çalışmada, CA, CAA, YT, YYO ve ölüm oranları (ÖÖ) yönünden bütün ortalama değerlerin birbirlerinin benzeri olduğunu belirtmektedirler. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile yapılan diğer çalışmalar arasında genel olarak bazı farklılıkların olması, muhtemelen çalışmalarda kullanılan hayvanlara ait faktörler (yaş, ırk, cinsiyet, genotip ve verim yönü), yeme ait faktörler (yemin bileşeni ve kullanılan prebiyotik, organik asit ve prebiyotik- organik asit kombinasyonlarının dozu, miktarı ve uygulama yöntemi) ile kümes şartları gibi çevresel faktörlerden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

### Ortalama Yem Tüketimleri (YT)

Çalışma boyunca grupların haftalık YT değerleri farklılık göstermiştir. Deneme süresince en yüksek ortalama YT'nin prebiyotik grubunda olduğu, bu grubu kontrol grubu ile organik asit grubunun izlediği ve en düşük YT'nin ise prebiyotik- organik asit

grubunda olduğu tespit edilmiştir ( $P < 0,00$ ). Broyler rasyonuna yem katkı maddesi olarak organik asit ilave ederek yapılan benzer bir çalışmada, kullanılan organik asit kombinasyonu (formik asit ve propionik asit) mide barsak mikroflorasını düzene sokarak YT'nin azalmasına sebep olduğu açıklanmıştır (Kırkpınar ve ark 1999; Ceylan ve ark 2003a; Mathis ve ark 2005). Bu araştırma CAA ve YYO bakımından mevcut çalışmanın bulgularını desteklemektedir. Broylerlerde rasyona değişik oranlarda prebiyotik ilave edilmesinin CAA'ında ve YT'de olduğu gibi YYO'ya da olumlu yönde katkı sağladığını bildiren başka çalışmalar da bulunmaktadır (Huang ve ark 2005b; Li ve ark 2007; Swiatkiewicz ve ark 2014; Soğancı 2018). Aynı konuda yapılan başka bir çalışmada, yumurtacı tavuklarda propiyonik asitin kalsiyum tuzlarının yeme eklenmesiyle yumurta performansının (YYO'nun iyileşmesi, YT'nin düşmesi ve yumurta veriminin (YV) artması gibi) iyileştiği açıklanmıştır (Dahiya ve ark 2016; Dama ve Kaya 2018). Ceylan ve ark (2003b) broyler rasyonuna yem katkısı olarak antibiyotik, probiyotik ve organik asit kombinasyonu ilave ederek yaptıkları başka bir çalışmada, CA, CAA, YT, ÖO, KR ve YYO'ya olan etkiyi bulmaya çalışmışlardır. Araştırma bitiminde bahsedilen performans kriterlerinde oldukça fazla değişiklikler gözlemlenmiştir. Yukarıdaki çalışmalarda elde edilen çoğu bulgular mevcut çalışma ile benzerdir. Bununla birlikte bazı değişik bulguların elde edilmesinin hayvanların ırkı, cinsiyeti, verim yönü, çevre şartları, beslenme alışkanlıkları ve katkı maddelerinin dozlarındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği şeklinde düşünülmektedir.

### Yemden Yararlanma Oranları (YYO)

Bazal rasyona prebiyotik- organik asit kombinasyonunun ilave edilmesi ortalama YYO'ya olumlu yönde katkı sağladığını göstermektedir. Buna göre ortalama yemden yararlanma oranları prebiyotik- organik asit grubunda 1,52, kontrol grubunda 1,58, organik asit grubunda 1,58 ve prebiyotik grubunda 1,71 olarak bulunmuştur. Bozkurt ve ark (2005), yaptıkları benzer bir çalışmada, broyler rasyonuna yem katkı maddesi olarak organik asit, prebiyotik ve probiyotikleri yalnız ve birlikte ilave ederek CA, CAA ve YYO'ya olan etkiyi bulmaya çalışmışlardır. Araştırma bitiminde probiyotik ve prebiyotik kombinasyonun bulunduğu deneme grubunda kontrole nazaran YYO'ya olan katkısının çok fazla olduğu bildirilmiştir. İnülin prebiyotiji ile yapılan benzer çalışmaların kanatlılarda mide barsak sistemini düzene koyduğu, yumurta üretimini artırdığı, yumurta kabuğu kalitesini iyileştirdiği, yemin etkinliğini artırdığı ve sağlığa

olumlu etki yaptığını göstermektedir (Aşan ve Özcan 2006). Yumurtacı tavuklarda propiyonik asitin yemlere ilave edilmesi ile ilgili olarak yapılan başka bir çalışmada, propiyonik asitin YV ve YYO gibi kriterlerin iyileşmesine olumlu katkı sağladığı, bunun sebebinin ise propiyonik asitin hayvanların mide barsak mikroflorasını düzene sokarak besin maddelerinin daha etkin bir şekilde kullanılmasına imkân tanıdığı olarak belirtilmiştir (Haque 2009; Dama ve Kaya 2018). Bu araştırmalar mevcut çalışmada elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir. Broylerlerde rasyona değişik oranlarda prebiyotik ilave edilmesinin CAA'ında ve YT'de olduğu gibi YYO'ya da olumlu yönde katkı sağladığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Huang ve ark 2005b; Li ve ark 2007; Swiatkiewicz ve ark 2014; Soğancı 2018). Broyler rasyonuna yem katkı maddesi olarak organik asit ilave ederek yapılan başka bir çalışmada, organik asit ilave edilen deneme grubunda CAA, YYO gibi performans kriterlerinin oldukça iyi olduğu bildirilmiştir (Kamacı ve Şenköylü 2007). Shi- Bin ve Hong (2012) ise örneklerde rasyona değişik oranlarda (0,3 gr, 0,6 gr ve 1,2 gr) prebiyotik ilavesi yapmışlar, prebiyotik ilavesi arttıkça yemden yararlanma oranının iyileştiğini görmüşlerdir. Bu çalışmalarda elde edilen bulgular ile mevcut çalışmada elde ettiğimiz bulgular benzerdir. Ceylan ve ark'nın (2003a) yaptığı benzer bir çalışmada, broyler rasyonuna yem katkısı olarak probiyotik, prebiyotik ve humarik asit kombinasyonunu ilave ederek CA, CAA ve YYO'ya olan etkiyi bulmaya çalışmışlar, yem katkısı olarak kullanılan probiyotik, prebiyotik ve humarik asit kombinasyonunun deneme gruplarında kontrole nazaran YYO'ya olan katkısının çok fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen bulgular da çalışmamızla uyumludur. Yeşilbaş ve Çolpan (2006) da konuyla ilgili yaptıkları benzer bir çalışmada, değişik oranlardaki (% 0,5, % 1 ve % 1,5) PA, FA ve bunların tuzlarından oluşan organik asit kombinasyonunun kontrol grubuna göre YV'yi artırırken YYO'yu tüm dozlarda azalttığını belirtmişlerdir. Farklı sonuçların bulunmasının sebebinin organik asitlerin farklı dozlarda kullanılmasının olabileceği şeklinde açıklanabilir.

### Karkas Verimi, İç Organ Ağırlıkları ve Bağırsak Uzunluğu

Çalışmada en iyi ortalama sıcak ve soğuk KA'larının prebiyotik- organik asit grubunda ( $P < 0,00$ ), en yüksek sıcak ve soğuk KR'larının ise kontrol grubu ile prebiyotik- organik asit grubunda olduğu tespit edilmiştir ( $P < 0,01$ ). Temel rasyona prebiyotik- organik asit kombinasyonunun ilave edilmesinin sıcak ve soğuk KA'na ve sıcak ve soğuk KR'na olumlu yönde

katkı sağladığı gözlemlenmiştir. Temel rasyona prebiyotik ile prebiyotik- organik asit kombinasyonunun ilave edilmesi karaciğer, kalp, dalak ve Bursa fabricius'un ortalama ağırlıklarını etkilemediği ( $P>0,05$ ), ancak taşlık ve bezsel midenin ortalama ağırlığını ve bağırsakların ortalama uzunluğunu artırarak olumlu yönde katkı sağladığı görülmektedir ( $P<0,05$ ). Bayırbağ (2007) tarafından broyler rasyonuna prebiyotik ilavesi ile yapılan bir çalışmada, kontrole göre prebiyotik grubunun SKR'sinin önemli ölçüde yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Benzer bir çalışmada Soğancı (2018) broylerlerde rasyona prebiyotik ilavesi ile yaptığı çalışmada, karaciğer, kalp ve taşlık ağırlıklarında gruplar arasında her hangi bir fark olmadığını tespit etmiştir. Başka bir çalışmada Khambulalai ve ark (2008) de broylerlerde rasyona prebiyotik ilavesinin karaciğer, kalp ve taşlık ağırlıklarında gruplar arasında bir fark olmadığını belirtmişlerdir. Bu araştırmalar mevcut çalışmada elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir. Bir diğer çalışmada Tufan ve Arslan (2012), broylerlerde rasyona değişik oranlarda (50 mg ve 100 mg) prebiyotik ilavesinin kontrol grubuna göre kalp ve taşlık ağırlıklarında gruplar arasında bir fark olmadığını ancak karaciğer ağırlığında düşüklük olduğunu rapor etmişlerdir. Swiatkiewicz ve ark (2014), yaptığı benzer çalışmada karaciğer ve taşlık ağırlığında gruplar arasında her hangi bir fark olmadığını belirtmişlerdir. Zhou ve ark (2009) de broylerlerde rasyona prebiyotik ilavesi ile yaptığı çalışmada dalak ve B. fabricius'un ağırlığı ile organ ağırlıklarında gruplar arasında her hangi bir etkinin olmadığını bildirmişlerdir. Deng ve ark (2008) ise broylerlerde rasyona 100 mg prebiyotik ilavesi ile yaptığı çalışmada deneme gruplarında B. fabricius ve timus organ ağırlıklarında ciddi bir artış elde ettiklerini ifade etmişlerdir. Wang ve ark (2003) da başka bir çalışmada broylerlerde rasyona % 0,1 oranında prebiyotik ilavesinin dalak, B. fabricius ve timus organ ağırlıklarında iyi bir artış olduğunu açıklamışlardır. Bildiricilerde rasyona prebiyotik ilavesinin hem büyümeyi ve gelişmeyi hem de dalak, B. fabricius ve timus organ ağırlıklarında çok iyi artışa neden olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (Soğancı 2018). Bu araştırmalarda performans kriterleri bakımından elde edilen bulgular bizim çalışmamızla uyumludur. Tufan ve Arslan (2012), broylerlerde rasyona 100 mg prebiyotik ilavesi ile yaptığı diğer bir çalışmada prebiyotik ilavesi yapılan grubun bağırsak uzunluğunda diğer gruplara göre anlamlı bir şekilde uzunluk elde edildiğini açıklamışlardır. Broyler rasyonuna yem katkı maddesi olarak organik asit ve probiyotik ilave ederek yapılan bir çalışmada ise organik asit ve probiyotik kombinasyonu ilave edilen deneme grubunda ön midenin çok geliştiği, ancak karaciğer, dalak,

kalp, B. fabricius gibi iç organ ağırlıklarında bir değişikliğin olmadığı bildirilmiştir (Kamacı ve Şenköylü 2007). Bu çalışmalar da mevcut çalışmada elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir. Benzer bir çalışmada Zhou ve ark (2009) broyler yemlerine farklı dozlarda (14 mg ve 28 mg) prebiyotik ile avilamisin (44 mg) antibiyotigi katılan 5 haftalık bir çalışmada iç organ ağırlıklarını incelemişlerdir. Bu çalışmada hayvanların dalak ve Bursa fabricius'ların ağırlıklarında kontrol grubu ile deneme grupları arasında her hangi bir fark olmadığını belirtmişlerdir. Broyler rasyonuna yem katkı maddesi olarak organik asit ve probiyotik kombinasyonu ilave edilerek yapılan başka araştırmada da aynı sonuçların elde edildiği açıklanmaktadır (Loddi ve ark 2000; Denli ve ark 2003; Khurana 2005). Diğer bir çalışmada ise broylerlerde temel rasyona I. deneme grubunda 50- 80 mg klortetrasiklin antibiyotigi, II. deneme grubunda 100 mg prebiyotik ilave edilen ve kontrol grubunun ise sadece temel rasyonla beslendiği 6 haftalık bir sürede iç organ ağırlıklarını incelemişlerdir. Araştırmadaki hayvanların dalak, timus ve Bursa fabricius'ların ağırlıklarının kontrol grubuna göre deneme gruplarında ağırlıkların yüksek olması nedeniyle belirgin bir fark olduğu belirtilmiştir (Soğancı 2018). Benzer bir çalışmada da broyler rasyonuna % 0,1 oranında prebiyotik ilave edilerek yapılan çalışmada dalak, timus ve Bursa fabricius'ların ağırlıklarında kontrol grubuna nazaran deneme gruplarında ağırlıkların fazla olmasına bağlı olarak bariz bir fark olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark 2003; Soğancı 2018). Bu çalışmalarda bazı bulguların benzer bazı bulguların da farklı olmasının sebebinin hayvanın ırkı, kullanılan yem katkı maddelerinin ve dozlarının farklı olmasından kaynaklanabileceği şeklinde düşünülmektedir.

### Kan Serum Parametreleri

Sunulan çalışmada temel rasyona prebiyotik ilave edilmesi total protein ( $P<0,02$ ) ve albümin ( $P<0,03$ ) seviyelerinin düşmesine neden olmuştur. Yumurtacılarda rasyona değişik oranlarda (100 mg ve 200 mg) prebiyotik ilavesi ile yapılan çalışmada serum TP ve albümin düzeylerinin değişmediği gösterilmiştir (Yan ve ark 2010; Soğancı 2018). Diğer yandan temel rasyona prebiyotik ilave edilmesi LDL kolesterol ( $P<0,04$ ) ve total kolesterol ( $P<0,04$ ) seviyelerini düşürerek olumlu yönde katkı sağladığı görülmektedir. Temel rasyona prebiyotik ile prebiyotik- organik asit kombinasyonunun ilave edilmesi kan serumu glikoz seviyesini etkilemezken ( $P>0,05$ ), ortalama trigliserit ve HDL kolesterol seviyelerini artırmıştır ( $P<0,00$ ). Yüksek yoğunluklu lipoprotein ya da high density lipoprotein (HDL) kolesterol, kanda yüksek miktarda bulunan kolesterol doku ve damarlardan karaci-

ğere taşıyarak *kolesterolün* kandaki miktarını düşürür. Kolesterolün kanda yüksek düzeyde bulunması kalp ve kan damarlarını olumsuz etkiler. Bu nedenle HDL kolesterol kandaki fazla kolesterolü uzaklaştırıldığı için iyi kolesterol olarak bilinir (Anonim, 2023). Çalışmamızda HDL kolesterol değerinin deneme gruplarında yüksek olması sağlığa olumlu katkı sağladığını göstermektedir. Farklı dozlarda propiyonik asit ilave edilen yemlerle beslenen hayvan denemelerinde kan serumunda glikoz, kalsiyum düzeyleri, alkalın fosfataz, alanin aminotransferaz aktiviteleri değişmezken, kan yağları, fosfor seviyeleri ve aspartat aminotransferaz aktivitesinin değiştiği bildirilmiştir (Dama ve Kaya 2018). Ur Rehman ve ark (2016) yaptığı bir çalışmada broyler rasyonlarına artırılan dozda organik asit (AA) takviyelerinin serumu kalsiyum, fosfor, TP ve globulin seviyelerinde artan bir değişiklik olduğunu ancak diğer kan serumu bileşenlerinde her hangi bir değişikliğin olmadığını beyan etmişlerdir. Kaya ve ark (2007) tarafından broyler rasyonuna organik asit ilave edilerek yapılan başka bir çalışmada ise, kan serumu bileşenlerinden TP, TG ve TK düzeylerine bakıldığında deneme gruplarında istatistiksel her hangi bir değişikliğin olmadığı görülmüştür. Mevcut çalışma ile bu araştırmalarda çoğu bulguların benzer bazı bulguların da farklı olmasının sebebinin kullanılan yem katkı maddeleri ve dozları ile beslenme alışkanlıklarının farklı olmasından kaynaklanabileceği şeklinde açıklanabilir. Broylerlerde prebiyotik ile yapılan başka çalışmalarda, prebiyotik ile yemlenen broylerlerde kontrole göre serum HDL kolesterol değeri çok fazla tespit edilmiştir (Razdan 1997; Soğancı 2018). Mevcut çalışma ile uyumludur. Broylerlerin yemlerine farklı dozlarda (0, 50 mg, 100 mg) prebiyotik katılan benzer başka bir çalışmada, dönem süresince kan serumu bileşenleri araştırılmıştır. Kırk iki gün süren çalışmada, 100 mg prebiyotik ilave edilen deneme grubunda TG düzeyi çok düşük bulunmuştur. Bu çalışmada diğer deneme gruplarıyla mukayese edildiğinde kan serumu TP, TK ve HDL kolesterol değerleri de yüksek bulunmuştur. Elli mg ve 100 mg prebiyotik ilave edilen deneme gruplarında kontrole göre LDL değerinin ise çok düşük olduğu belirtilmiştir (Li ve ark 2007; Soğancı 2018). HDL ve LDL kolesterol değerleri hariç diğer kan serumu parametreleri yukarıda bahsedilen nedenlerle mevcut çalışmadan ayrılmıştır. Mevcut çalışmada temel rasyona prebiyotik ilave edilmesinin LDL kolesterol ve total kolesterol seviyelerini düşürerek olumlu yönde katkı sağladığı, total protein ve albümin seviyelerinin düşmesine neden olduğu görülmektedir. Diğer bir çalışmada ise Keser ve ark (2011), broyler yemlerine % 0,025 oranında prebiyotik ilavesiyle beslenen hayvanlarda,

kontrol grubuna göre prebiyotik ilave edilmiş grubun mukayesesinde LDL kolesterol düzeyinin düştüğü ancak diğer kan serumu bileşenlerinde; TK, HDL kolesterol, VLDL kolesterol, TG, TP, glikoz düzeyinde her hangi bir değişikliğin olmadığını tespit etmişlerdir. Broylerlerde rasyona değişik oranlarda (50 mg ve 100 mg) prebiyotik ilavesi ile yapılan başka bir çalışmada ise kan serumu TP düzeyinin yükseldiği ifade edilmiştir (Li ve ark 2007; Soğancı 2018). Soğancı (2018), broylerlerde rasyona farklı dozlarda (50 mg, 100 mg ve 200 mg) prebiyotik ilavesi ile yaptığı bir çalışmada, deneme grupları ile kontrol grubu arasında kan serumu TG düzeyi bakımından anlamlı bir farkın olduğunu, 50 mg prebiyotik ilavesi yapılan grubun serum TG düzeyinin daha düşük bulunduğunu, diğer deneme gruplarının TG düzeylerinin ise yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Yem katkı maddelerinin farklı dozlarının bu çalışmada sonucu etkilediği görülmektedir. Broylerlerde rasyona kitosan ve KOS ilavesi ile serum trigliserit düzeyinin düştüğünü bildiren araştırmalar mevcut iken (Li ve ark 2007; Zhou ve ark 2009; Tufan ve Arslan 2012; Sayed ve ark 2015; Li ve ark 2016), rasyona prebiyotik (kitosan) ve prebiyotik (KOS) ilavesi ile serum trigliserit düzeyinde her hangi değişiklik olmadığını belirten araştırmalar da vardır (Kobayashi 2006a; Khambualai ve ark 2008; Keser ve ark 2011; Nuengjamnong ve Angkanaporn 2017). Yine Soğancı (2018), broyler rasyonuna değişik oranlarda (50 mg, 100 mg, 150 mg) prebiyotik ilavesi ile yaptığı çalışmada, kontrol grubu ile deneme grupları arasında serum glikoz değeri açısından önemli bir değişiklik olmadığını açıklamıştır. Broyler ve bildircin rasyonlarına prebiyotik ilavesi ile yapılan başka çalışmalarda da elde edilen sonuçların aynı olduğu söylenmektedir (Keser ve ark 2011; Tufan ve ark 2015). Bu araştırmalar mevcut çalışma bulgularını desteklemektedir. Broyler rasyonuna mannan oligosakkarit (MOS) ilave edilerek yapılan çalışmada, performans ve serum trigliserit seviyesinin etkilenmediği, düşük dozdaki MOS'lerin (% 0,05) serum kolesterol seviyesini düşürdüğü, yüksek dozdaki MOS'lerin (% 0,10 ve 0,15) ise serum kolesterol seviyesini artırdığı ifade edilmiştir (Yalçınkaya ve ark 2008). Broyler rasyonuna MOS ve OZn ilave edilerek yapılan başka bir çalışmada, büyüme performansının etkilenmediği, bazı serum parametrelerinin ise değiştiği, MOS ve organik çinko grubunda bakır seviyesinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur (Yalçınkaya ve ark 2012). Yalçınkaya ve ark (2012) prebiyotik takviyesinin mineral emilimini artırdığını, MOS ilave edilmesinin serum bakır düzeyini yükselttiğini tespit etmişlerdir. Mevcut çalışma ile bu araştırmalarda bazı bulguların benzer bazı bulgula-



rin da farklı olmasının sebebinin hayvanın ırkı, cinsiyeti, çevre şartları, kullanılan yem katkı maddeleri ve dozları ile beslenme alışkanlıklarının farklı olmasından kaynaklanabileceği şeklinde düşünülmektedir. Broylar rasyonuna 100 ppm seviyesinde MOS ve KOS ilave edilerek yapılan bir çalışmada, serum bakır (Cu) düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu bildirilmiştir (Leblebicier ve Aydoğan 2018). Broylar rasyonuna değişik oranlarda (50 mg, 100 mg) prebiyotik (KOS) ilavesi ile yapılan diğer bir araştırmada serum TK düzeyinin düştüğü belirtilmiştir (Tufan ve Arslan 2012). Aynı sonuç prebiyotik (kitosan) ilavesi ile yapılan başka bir araştırmada da bulunmuştur (Sayed ve ark 2015; Li ve ark 2016). Broylar rasyonuna değişik oranlarda (14 mg, 28 mg) prebiyotik ilavesi yapılan başka bir çalışmada, 28 mg prebiyotik ilavesi yapılan grupta serum HDL kolesterol düzeylerinin çok iyi olduğu, ancak LDL kolesterol düzeyleri bakımından gruplar arasında hiç bir fark olmadığı da açıklanmıştır (Zhou ve ark 2009). Bu çalışmadaki HDL kolesterol seviyesi mevcut çalışmadaki bulgular ile uyumludur. Broylar rasyonuna prebiyotik ilavesi ile yapılan başka benzer araştırmalarda serum HDL kolesterol düzeylerinin yüksek olduğu buna karşılık LDL kolesterol düzeylerinin düşük olduğu durumlar da vardır (Sayed ve ark 2015; Li ve ark 2016). Tufan ve Arslan (2012) ise broylar rasyonuna prebiyotik ilavesi ile yaptıkları çalışmada kan serumunda hem HDL kolesterol düzeyinin hem de LDL kolesterol düzeyinin düştüğünü tespit etmişlerdir. Mevcut çalışmadaki prebiyotik grubunda da HDL kolesterol ve LDL kolestrol seviyelerinin düşük olduğu görülmektedir. Prebiyotiklerin, karaciğerde yağ sentezini yavaşlattığı, hiper insülinemiye engelleyerek kalp damar hastalıklarını önlediği bildirilmiştir (Roberfroid 1999; Yabancı 2010). Prebiyotiklerin, yağ sentezini düşürücü özelliği sayesinde karaciğerde yağ sentezini azaltarak serum trigliserit seviyesini düşürdüğü de rapor edilmiştir (Delzenne ve Kok 1999; Yabancı 2010). Amerikan Diyabetik Derneği (ADD) tarafından diyabet hastalığında prebiyotiklerin (inülinin) yağın ve şekerin yerine geçerek yağ metabolizmasına ait bozuklukları giderebileceği belirtilmiştir (ADD 1996; Yabancı 2010). Prebiyotikler, glikoz metabolizmasını düzenleyerek glisemileri iyileştirici etki yapmaktadır. Bağırsaklarda glukagon benzeri peptid-1 gibi incretin hormonuna benzer görev yapan peptidlerin salgılanmasına sebep olmaktadır. Bunun sonucu olarak da prebiyotiklerin karaciğerde insülin direncini regüle ettiği bildirilmiştir (Delzenne ve ark 2013; Şimşek ve Bilgili 2014). Prebiyotiklerin kolonda fermantasyonu sonucu açığa çıkan kısa zincirli yağ

asitlerinin (AA, PA, BA, LA) laktobasillus ve bifidobakterium gibi probiyotik bakterileri aktive ettiği, bu bakterilerin de hidrokso-metil-glutaril coA redüktaz enzimi üreterek kan kolesterol seviyesini düşürdüğü ispatlanmıştır (İnanç ve ark 2005).

Bu çalışmada elde edilen bulgular ışığında özetle şu sonuçlar elde edilmiştir: Temel rasyona prebiyotik, organik asit ve prebiyotik- organik asit kombinasyonun ilave edilmesi CA, CAA, sıcak ve soğuk KA ile sıcak ve soğuk KR'ına olumlu yönde katkı sağladığı görülmüştür. Araştırma süresince kontrol grubuna göre deneme gruplarının CA ve CAA'larının yüksek olduğu, en yüksek yem tüketiminin prebiyotik grubunda, en düşük yem tüketiminin ise prebiyotik- organik asit grubunda olduğu gözlemlenmiştir. Temel rasyona prebiyotik- organik asit kombinasyonunun ilave edilmesi ortalama yemden yararlanma oranına olumlu yönde katkı sağladığını göstermektedir. Çalışmamızın sonunda tüm grupların ortalama yemden yararlanma oranı 1,6 olarak bulunmuştur. Yani 1 kg CAA'ı için 1,6 kg yem tüketilmiştir. Temel rasyona prebiyotik ilave edilmesi serum LDL kolesterol ve total kolesterol seviyelerini düşürerek olumlu yönde katkı sağladığı görülmektedir. Ayrıca temel rasyona prebiyotik ilave edilmesi serum total protein ve albümin seviyelerinin düştüğünü göstermektedir. Temel rasyona prebiyotik ile prebiyotik- organik asit kombinasyonunun ilave edilmesi karaciğer, kalp, dalak ve Bursa fabricius'un ortalama ağırlıklarını etkilemediği ancak taşlık ve bezsel midenin ortalama ağırlığını ve bağırsakların ortalama uzunluğunu artırarak olumlu yönde katkı sağladığı gözlemlenmiştir. Temel rasyona prebiyotik ile prebiyotik- organik asit kombinasyonunun ilave edilmesinin serum glikoz seviyesinde önemli bir fark oluşturmadığı, fakat serum trigliserit ve HDL kolesterol seviyelerini kontrol grubuna göre yükselttiği görülmüştür. Deneme gruplarında HDL kolesterol değerinin yüksek olması sağlığa olumlu yönde katkı sağladığını göstermektedir. Bu veriler doğrultusunda broylar rasyonlarında prebiyotik, organik asit ve prebiyotik- organik asit kombinasyonu kullanımının performans ve bazı kan parametreleri üzerine olumlu katkı sağladığı görülmektedir.

Sonuç olarak, performans ve bazı kan parametrelerine bakılarak prebiyotik, organik asit ve prebiyotik-organik asit kombinasyonlarının broylarlerde yem katkı maddesi olarak yemlere ilavesinin faydalı olacağı düşünülmektedir. Ancak bunların antibiyotiklere alternatif olarak kullanılacakları hususunda daha fazla ve detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler:** Bu çalışma, Etlik Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 2021/21 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Ayrıca bu araştırma Kırıkkale Üniversitesi (KÜ), Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. BAP No: 2022- 008'dir.

**Teşekkür:** Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne ve Kırıkkale Üniversitesi (KÜ), Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimine desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

**Maddi destek çıkar bilgisi:** Makalenin yayınlanması konusunda 1. yazar Mustafa COŞAR ve 2. Yazar Mehmet Akif KARSILI arasında her hangi bir çıkar çatışmasının olmadığı beyan olunur.

## Kaynaklar

- Alp M, Kahraman R. (1996) *Use of probiotics in animal nutrition*. Istanbul University, Journal of the Faculty of Veterinary Medicine; 22 (1):1-8. file:///C:/Users/Acer/Downloads/Recep%20KAHRAMAN.pdf (Access: 27.09.2022)
- American Diabetes Association. (1996) *Role of fat replacers in diabetes medical nutrition therapy*. Diabetes Care; 19 (11):1302-1303. <https://doi.org/10.2337/diacare.19.11.1302>
- Anonim. (2023) HDL kolesterol. <https://www.medicalpark.com.tr/hdl-kolesterol/hg-2188> (Access: 30.08.2023)
- Aşan M, Özcan N. (2006) The importance of inulin as a prebiotic in poultry nutrition. Cukurova University, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, Adana Animal Production; 47 (2):48-53. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/85107> (Access: 27.09.2022)
- Bayırbağ DT. (2007) The effect of using yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) and prebiotic (MOS) in broiler diets on fattening performance and some blood parameters. PhD, Ankara University, Health Sciences Institute, Ankara, Türkiye,
- Buğdaycı KE. (2008) The effect of essential oil and probiotic on performance, immune system and some blood parameters in broilers. PhD, Ankara University, Health Sciences Institute, Ankara, Türkiye,
- Bozkurt M, Küçükylmaz K, Çatlı AU, Çınar M. (2005) The effect of dietary supplementation of prebiotic, probiotic and organic acid, either alone or combined, on performance and carcass characteristics. In; World Poultry Science Association, 15th European Symposium on Poultry Nutrition; Hungary; p. 288-290.
- Ceylan N, Çiftçi İ, İlhan Z. (2003a) The effects of alternative feed additives to growth factor antibiotics on fattening performance and intestinal microflora of broiler chickens. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences; 27 (3):727-733. <https://search.trdizin.gov.tr/yayin/detay/30562/> (Access: 11.10.2022)
- Ceylan N, Çiftçi İ, İldız F, Söğüt A. (2003b) Effects of adding enzymes, growth factors, probiotics and organic acids to broiler rations on fattening performance and intestinal microflora. Ankara university, Journal of the Faculty of Agriculture, Journal of Agricultural Sciences; 9 (3):320-326. [https://doi.org/10.1501/Tarimbil\\_00000000831](https://doi.org/10.1501/Tarimbil_00000000831)
- Chen YC, Chen TC. (2003a) Effect of adding chicory fructans in feed on broiler growth performance, serum cholesterol and intestinal length. International Journal of Poultry Science; 2 (3):214-219. <https://doi.org/10.3923/ijps.2003.214.219>
- Chen YC, Nakthong C, Chen TC. (2005a) Improvement of laying hen performance by dietary prebiotic chicory oligofructose and inulin. International Journal of Poultry Science 2005a;4 (2): 103-108. <https://doi.org/10.3923/ijps.2005.103.108>
- Coşar M, Karslı MA. (2020) Size and animal feeding habits of broiler farms in Ankara, Bolu, Eskişehir, Kayseri and Kırıkkale provinces. MSc, Etlik Journal of Veterinary Microbiology 2020; 31 (2):184-195. Ankara, Türkiye,
- Çabuk M, Bozkurt M, Alçiçek A, Çatlı AU, Başer KHC. (2006) The effect of a mixture of herbal essential oils, a mannan oligosaccharide or an antibiotic on performance of laying hens under hot climatic conditions. South African Journal of Animal Science; 36 (2):135-141. [https://scholar.google.ca/citations?view\\_op=view\\_citation&hl=fr&user=2jaoJo0AAA-AJ&citation\\_for\\_view=2jaoJo0AAA-u-x6o8ySG0sC](https://scholar.google.ca/citations?view_op=view_citation&hl=fr&user=2jaoJo0AAA-AJ&citation_for_view=2jaoJo0AAA-u-x6o8ySG0sC) (Access: 11.10.2022)
- Dahiya R, Berwal RS, Sihag S, Patil CS. (2016) The effect of dietary supplementation of salts of organic acid on production performance of laying hens. Veterinary World; 9 (12):1478-1484. DOI:10.14202/vetworld.2016.1478-1484
- Dama G, Kaya A. (2018) Effects of propionic acid supplementation in laying hen rations on performance, egg quality and some blood parameters. MSc, Journal of Tekirdag Agricultural Faculty; 15 (01):129-134. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/421612> (Access: 11.10.2022)
- Delzenne NM, Kok NN. (1999) Biochemical basis of oligofructose-induced hypolipidemia in animal models. *Journal of Nutrition*; 129 (7):1467-1470. <https://doi.org/10.1093/jn/129.7.1467>
- Delzenne NM, Neyrinck AM, Cani PD. (2013) Gut microbiota and metabolic disorders: How prebiotic can work? *British Journal of Nutrition*; 109 (2):81-85. <https://doi.org/10.1017/S0007114512004047>
- Deng X, Li X, Liu P, Yuan S, Zang J et al. (2008) Effect of chito-oligosaccharide supplementation on immunity in broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*; 21 (11):1651-1658. <https://doi.org/10.5713/ajas.2008.80056>
- Denli M, Okan F, Çelik K. (2003) Effect of dietary probiotic, organic acid and antibiotic supplementation to diets on broiler performance and carcass yield. *Pakistan Journal Of Nutrition*; 2 (2):89-91. <https://doi.org/10.3923/pjn.2003.89.91>
- Dibner JJ, Buttin P. (2002) Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *C of Applied Poultry Research*; 11 (4):453-463. <https://doi.org/10.1093/japr/11.4.453>
- Duncan DB. (1955) Multiple Range and Multiple F Test. Biometrics. Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, Virginia, USA; 11 (1):1-42. <http://dx.doi.org/10.2307/3001478>
- Erensayın C. (2001) *The New Poultry Science*. Ankara, Turkey; Nobel Publication Distribution; p. 324.
- Evrensel MF. (2009) The effect of using organic acids and prebiotics in broiler rations on fattening performance and some blood parameters. PhD, Ankara university, Institute of Health Sciences, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Ankara, Türkiye,
- Hadorn R, Wiedmer H, Feuerstien, D. (2000) Effect of different dosages of an organic-acid mixture in broiler diets. *European Poultry Science (EPS) Archiv für Geflügelkunde*;65 (1):22-27. <https://www.european-poultry-science.com/Effect-of-different-dosages> (Access: 1.10.2022)
- Haque MN, Chowdhury KM, Islam S, Akbar MA. (2009) Propionic acid is an alternative to antibiotics in poultry diet. *Bangla-*

- desh *Journal of Animal Science*; 38 (1-2):115-122. <https://doi.org/10.3329/bjas.v38i1-2.9920>
- Huang R, Mendis E, Kim SK. (2005a) Factors affecting the free radical scavenging behavior of chitosan sulfate. *International Journal of Biological Macromolecules*; 36 (1-2):120-127. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.05.001>
- Huang RL, Yin YL, Wu G, Li T, Li LL et al. (2005b) Effect of dietary oligochitosan supplementation on ileal digestibility of nutrients and performance in broiler. *Poultry Science*; 84 (9):1383-1388. <https://doi.org/10.1093/ps/84.9.1383>
- Iji PA, Tivey DR. (1998) Natural and synthetic oligosaccharides in broiler chickens diets. *World's Poultry Science Journal*; 54 (2):129-143. <https://doi.org/10.1079/WPS19980010>
- İnanç N, Şahin H, Çiçek B. (2005) The impact of probiotics and prebiotics on health. *Erciyes Medical Journal*; 27 (3):122-127. <https://search.trdizin.gov.tr/yayin/detay/54858/> (Access: 15.10.2022), [https://jagjournalagent.com/erciyesmedj/pdfs/EMJ\\_27\\_3\\_122\\_127.pdf](https://jagjournalagent.com/erciyesmedj/pdfs/EMJ_27_3_122_127.pdf)
- Kahraman R, Abaş İ, Baston K, Tanör MA, Kocabağlı N et al. (1999) The effect of organic acids and yeasts on broiler performance, ileum pH and enterobacteriaceae population. Yutav 99 International Poultry Fair and Conference, İstanbul, Türkiye; p. 515-522.
- Kahraman Z, Mızrak C, Yenice E, Atik Z ve Tunca M. (2009) Effects of Prebiotic (Mannan Oligosaccharide) Supplementation into Laying Hen Diets on the Hen Performance, Egg Quality, Organ Weights, Jejunum pH and Hatching Results. *Poultry Research Journal*; 8 (1):10-14. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/419835> (Access: 11.10.2022)
- Kamacı ST, Şenköylü N. (2007) The effects of organic acid and probiotic use on performance, intestinal histomorphology and blood parameters in broiler chickens. PhD, Trakya University, Institute of Science and Technology, Department of Agricultural Economics, Tekirdağ, Türkiye,
- Kaya CA, Tuncer ŞD, Batum S. (2007) The effects of organic acid mixtures containing humate and etheric fatty acids on fattening performance, carcass quality and some blood parameters in broilers. In: 4th National Animal Nutrition Congress, Bursa, Türkiye; p. 338-349.
- Keser O, Bilal T, Kutay H, Abas İ, Eseceli H. (2011) Effects of chitosan oligosaccharide and/or beta-glucan supplementation to diets containing organic zinc on performance and some blood indices in broilers. *Pakistan Veterinary Journal*; 32 (1):15-19. [http://www.pvj.com.pk/pdf-files/32\\_1/15-19.pdf](http://www.pvj.com.pk/pdf-files/32_1/15-19.pdf) (Access: 15.10.2022)
- Khambualai O, Yamauchi K, Tangtawewipat S, Isarakul B. (2008) Effects of dietary chitosan on growth performance in broiler chickens. *The Journal of Poultry Science*; 45 (3):206-209. <https://doi.org/10.2141/jpsa.45.206>
- Khambualai O, Yamauchi K, Tangtawewipat S, Isarakul B. (2009) Growth performance and intestinal histology in broiler chicken fed with dietary chitosan. *British Poultry Science*; 50 (5):592-597. <https://doi.org/10.1080/00071660903247182>
- Khurana, SK. (2005) Effect of probiotics supplementation on immuno-competence and in prevention of experimental salmonella gallinarum infection in broiler chicken. In: 15th European Symposium On Poultry Nutrition; p. 270-272.
- Kırkpınar F, Ayhan V, Bozkurt M. (1999) The effects of organic acid mixture and probiotic use on performance, intestinal pH and viscosity of broiler chickens. In: International Livestock Congress; İzmir, Türkiye; p. 463-467.
- Kobayashi S, Terashima Y, Itoh H. (2006a) The effects of dietary chitosan or glucosamine HCl on liver lipid concentrations and fat deposition in broiler chickens. *The Journal of Poultry Science*; 43 (2):156-161. <https://doi.org/10.2141/jpsa.43.156> (Access: 15.10.2022)
- Leblebici ÖDY, Aydoğan İ. (2018) The effects of mannan oligosaccharide and chitosan oligosaccharide on performance and blood parameters of broilers. *Journal of Poultry Research*; 15 (1):18-22. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/512235> (Access: 15.10.2022)
- Li XJ, Piao XS, Kim SW, Liu P, Wang L et al. (2007) Effects of chito-oligosaccharide supplementation on performance nutrient digestibility and serum composition in broiler chickens. *Poultry Science*; 86 (6):1107-1114. <https://doi.org/10.1093/ps/86.6.1107>
- Li QP, Gooneratne SR, Wang RL, Zhang R, An LL et al. (2016) Effect of different molecular weight of chitosans on performance and lipid metabolism in chicken. *Animal Feed Science and Technology*; 211:174-180. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds-2015.11.013>
- Loddi MM, Gonzales E, Takita TS, Mendes AA, Roca RO et al. (2000) Effect of the use of probiotic and antibiotic on the performance, yield and carcass quality of broilers. *Revista Brasileira De Zootecnia*; 29 (4):1124-1131. <https://doi.org/10.1590/S1516-3598200000400025>
- Manning T, Gibson G. (2004) Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*; 18 (2):287-298. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2003.10.008>
- Mathis GF, Dam Van JTP, Fernandez CA, Hofacre CL. (2005) Effect of an organic acids and medium chain fatty acids containing product in feed on the course of artificial necrotic enteritis infection in broiler chickens. In: 15th European Symposium On Poultry Nutrition; p. 357-359.
- Nir İ, Şenköylü N. (2000) *Feed additives that support digestion for poultry*. ISBN 975-93691-0-9. Tekirdağ, Türkiye,
- Nuengjamnong C, Angkanaporn K. (2017) Efficacy of dietary chitosan on growth performance, haematological parameters and gut function in broilers. *Italian Journal of Animal Science*; 17 (2):428-435. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1373609>
- Özden A. (2010) *Beneficial friendly bacteria for healthy life*. Ankara, Turkey; Fersa Printing Limited Company; ISBN:9786056107610
- Öztürk E, Yıldırım A. (2005) It can be said that the addition of prebiotics (Bio-MOS) to the mixed feed does not affect the performance of broilers and its effects on intestinal microbiological properties. In: 3rd Animal Nutrition Congress; Adana, Türkiye,
- Parks CW, Grimes JL, Ferket PR, Fairchild AS. (2001) The effect of mannanoligosaccharides, bambarmycins and virginiamycin on performance of large white male market turkeys. *Poultry Science*; 80 (6):718-723. <https://doi.org/10.1093/ps/80.6.718>
- Razdan A, Pettersson D, Pettersson J. (1997) Broiler chicken body weights, feed intakes, plasma lipid and small-intestinal bile acid concentrations in response to feeding of chitosan and pectin. *British Journal of Nutrition*; 78 (2):283-291. <https://doi.org/10.1079/bjn19970146>
- Roberfroid MB. (1999) Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. *The Journal of Nutrition*; 129 (7):1398-1401. <https://doi.org/10.1093/jn/129.7.1398>
- Santos A, San Mauro M, Diaz DM. (2005) Probiotics and their long term influence on the microbial populations of the mouse bowel. *Food Microbiol*; 23 (5):498-503. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.07.004>
- Sayed M, Islam M, Haque M, Shah MJ, Ahmed R. (2015) Dietary effects of chitosan and buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) on the performance and serum lipid profile of broiler chicks.

- South African Journal of Animal Science*; 45 (4):429-440. <https://doi.org/10.4314/sajas.v45i4.9>
- Shashidhara RG, Devegovva G. (2003) Effect of dietary mannan oligosaccharide on broiler breeder production traits and immunity. *Poultry Science*; 82 (8):1319-1325 <https://doi.org/10.1093/ps/82.8.1319>
- Shi-Bin Y, Hong C. (2012) Effects of dietary supplementation of chitosan on growth performance and immune index in ducks. *African Journal of Biotechnology*; 11 (14):3490-3495. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1648>
- Soğancı E. (2018) The effects of chitooligosaccharide (KOS) use on performance, carcass yield, visceral weights and some blood parameters in broiler diets. PhD, Kırıkkale University, Institute of Health Sciences, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Kırıkkale, Türkiye,
- Swiatkiewicz S, Arczewska-Wlosek A, Jozefiak D. (2014) Feed enzymes, probiotic or chitosan can improve the nutritional efficacy of broiler chicken diets containing a high level of distillers dried grains with solubles. *Livestock Science*; 163:110-119. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.03.001>
- Şenköylü N. (1991) *Modern Chicken Production*. Trakya University, Tekirdag Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, Tekirdağ, Türkiye,
- Şimşek İ, Bilgili A. (2014) Prebiotics, synbiotics and their use in veterinary medicine. *Journal of the Turkish Veterinary Medical Association*; (3-4):97-110 <https://cmabiotechnology.com/wp-content/uploads/2017/09/Prebiyotikler-Makale.pdf> (Access: 11.10.2022)
- Tufan T, Arslan C. (2012) Effects of chitosan oligosaccharide addition to broiler diets on fattening performance, carcass characteristics, nutrient digestibility, serum lipids and breast meat fatty acid profile. PhD, Kafkas University, Institute of Health Sciences, Kars, Türkiye,
- Tufan T, Arslan C, Erman H, Sarı M, Deprem T et al. (2015) Effects of chitosan oligosaccharides addition to japanese quail's diets on growth, carcass traits, liver and intestinal histology, and intestinal microflora. *Kafkas University, Journal of Veterinary Faculty*; 21 (5):665-671. [http://vetdergikafkas.org/uploads/pdf/pdf\\_KVFD\\_L\\_1804.pdf](http://vetdergikafkas.org/uploads/pdf/pdf_KVFD_L_1804.pdf) (Access: 15.10.2022)
- Türkoğlu M, Arda M, Yetişir R, Sarıca M, Erensayın C. (1997) *Poultry Science, Breeding and Diseases*, Samsun, Türkiye,
- Ur Rehman Z, Ul Haq A, Akram N, El Hack MEA, Saeed M et al. (2016) Growth performance, intestinal histomorphology, blood hematology and serum metabolites of broiler chickens fed diet supplemented with graded levels of acetic acid. *International Journal of Pharmacology*; 12 (8):874-883. <https://doi.org/10.3923/ijp.2016.874.883>
- Wang XW, Du YG, Bai XF, Li SG. (2003) The effects of oligosaccharides on broiler gut flora, microvilli density, immune function and growth performance. *Acta Zoonutrition*; 15:32-45. Corpus ID: 87511082 (Access: 11.10.2022)
- Yabancı N. (2010) Effects of inulin and oligofructose on human health and nutrition. Gazi University, Faculty of Vocational Education, *Department of Food and Nutrition Education, Academic Food*; 8 (1):49-54 <https://dergipark.org.tr/tr/pub/akademik-gida/issue/55835/764830> (Access: 11.10.2022)
- Yaşınkaya İ, Güngör T, Başalan M, Erdem E. (2008) Mannan oligosaccharides (MOS) from *saccharomyces cerevisiae* in broilers: effects on performance and blood biochemistry. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*; 32 (1):43-48. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/132469> (Access: 15.10.2022)
- Yaşınkaya İ, Çınar M, Yıldırım E, Erat S, Başalan M. (2012) The effect of prebiotic and organic zinc alone and in combination in broiler diets on the performance and some blood parameters. *Italian Journal of Animal Science*; 11 (3):298-302. <https://doi.org/10.4081/ijas.2012.e55>
- Yan L, Lee JH, Meng QW, Ao X, Kim IH. (2010) Evaluation of dietary supplementation of delta-aminolevulinic acid and chito-oligosaccharide on production performance, egg quality and hematological characteristics in laying hens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*; 23 (8):1028-1033. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.90639>
- Yenilmez F. (2005) A research on the breeding, technical and structural characteristics of broiler and layer hen farms in Çukurova region (Adana and İçel provinces). PhD, Çukurova University, Institute of Science and Technology, Adana, Türkiye,
- Yeşilbağ D, Çolpan I. (2006) Effects of organic acid supplemented diets on growth performance, egg production and quality and on serum parameters in laying hens. *Revue Medecine Veterinaire*; 157: (5):280-284. Corpus ID: 28184835 (Access: 11.10.2022)
- Yusrizal C, Chen TC. (2003) Effect of adding chicory fructans in feed on broiler growth performance, serum cholesterol, and intestinal length. *International Journal of Poultry Science*; 2 (3):214-219. <https://doi.org/10.3923/ijps.2003.214.219>
- Yüzbaşı Ş. (2012) Structural and functional characteristics of butchery chicken farms in Bandırma district. MSc, Ankara University, Institute of Science and Technology, Department of Agricultural Structures and Irrigation, Ankara, Türkiye,
- Zhou TX, Chen YJ, Yoo JS, Huang Y, Lee JH. (2009) Effect of chitooligosaccharide supplementation on performance, blood characteristics, relative organ weight, and meat quality in broiler chickens. *Poultry Science*; 88 (3):593-600. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00285>



# Kanatlılarda kronik solunum yolu hastalığının (CRD) serolojik tanısı için in-House Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA) geliştirilmesi

Sevil Erdenliğ Gürbilek<sup>1</sup>, Ayfer Güllü Yüce-tepe<sup>2</sup>, Ahmet Murat Saytekin<sup>3</sup>,  
Oktay Keskin<sup>4</sup>, Osman Yaşar Tel<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 21.07.2023, Kabul Tarihi / Accepted: 04.10.2023

**Özet:** Tavukların üst solunum yollarında *Mycoplasma gallisepticum* (MG)'un oluşturduğu kronik solunum sistemi hastalığı (CRD), dünyanın birçok ülkesinde kanatlı sağlığı ve hayvansal üretim üzerinde büyük etkileri olan, ciddi ekonomik kayıplara sebebiyet veren bulaşıcı bir enfeksiyondur. Hem hastalığın teşhisinde hem de antikor titresinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) sensitivite ve spesifitesi yüksek olan bir testtir. Bu çalışmada, CRD enfeksiyonuna karşı gelişen antikorları saptamak için farklı suşların antijen olarak kullanıldığı "in house" bir ELISA prototipi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 1 standart suş (MG S6), 1 aşı suşu (MG 6/85) ve 3 saha suşu (MG HMA 9, MG HMA 79, MG HMA 120) olmak üzere 5 suş ile hazırlanan ELISA'ların referans serumlar (125 gerçek pozitif ve 44 gerçek negatif) kullanılarak duyarlılığı ve özgüllüğü saptanmıştır. Buna göre MG 6/85, MG HMA 9, MG HMA 79, MG HMA 120 ve MG S6 suşlarından hazırlanan ELISA'ların duyarlılığı sırası ile % 92, %94, %95, % 96,8 ve % 92 olarak belirlenmiştir. Testlerin özgüllüğü aynı sıra ile % 95,6 %95,6, %95,6, %96,7 ve % 93,6 olarak hesaplanmıştır. Özgüllüğü ve duyarlılığı diğerlerine göre daha yüksek olan MG HMA 120 suşundan hazırlanan ELISA prototipi ticari üretim için seçilmiştir. *M. gallisepticum* ile infekte bir sürüden alınan 35 serumun MG HMA 120 ELISA ile test edilmesi sonucunda serumların 28'i pozitif, 5'i şüpheli ve 2'si negatif olarak saptanmıştır. Optik Dansite (OD) değerlerine bağlı olarak aynı serumların ticari MG ELISA ile test edilmesi ile alınan sonuçlar yerli MG HMA 120 ELISA ile alınan sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. İki kit arasında yüksek bir korelasyon katsayısı bulunmuştur (Pearson's korelasyon katsayısı (r)=0,78, p=0,01). Bu çalışmada yerli bir suştan yeni geliştirilen in house ELISA' nın *M. gallisepticum*'un neden olduğu CRD vakalarında güvenle kullanılabileceği, ticari muadillerine göre benzer özgüllük ve duyarlılık gösterdiği ve saha kullanımı için pratik ve ucuz bir alternatif olduğu gösterilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** CRD, ÇLAT, in house ELISA, *Mycoplasma gallisepticum*, Serolojik tanı.

## Preparation of in House Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for serologic diagnosis of chronic respiratory disease (CRD) in poultry

**Abstract:** Chronic respiratory disease (CRD) significant, caused by *Mycoplasma gallisepticum* (MG) in the upper respiratory tract of chickens, is a contagious infection that causes severe economic losses in many countries of the world, greatly impacting poultry health and animal production. Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) has high sensitivity and specificity which is widely used for both diagnosis of the disease and antibody titer determination. This study aimed to develop an "in-house" ELISA prototype in which different strains are used as antigens to detect antibodies to CRD infection. For this purpose, the sensitivity and specificity of ELISAs prepared with a total of 5 strains, including one standard strain (MG S6), one vaccine strain (MG 6/85) and 3 field strains (MG HMA 9, MG HMA 79, MG HMA 120), were determined using 125 true positive and 44 true negative reference sera. Sensitivity rates were found as 92%, 94%, 95%, 96.8% and 92%, respectively. Specificities were found as 95.6%, 95.6%, 95.6%, 96.7% and 93.6%, respectively. According to the results, MG HMA 120 local strain based in-house ELISA was chosen for commercial production for a later stage. A total of 35 sera from the *M. gallisepticum* infected flock were tested by commercial ELISA and our in-house MG HMA120 ELISA for comparison based on OD values. 28 out of 35 were found positive, five suspected and two negative by using MG HMA 120 ELISA. A high correlation coefficient (r)=0.78, p=0.01) was determined between commercial and in-house ELISA. It was concluded that newly developed in-house ELISA using local whole cell antigen could be used safely, giving similar sensitivity and specificity to commercial ELISA kit, for serologic diagnosis of *M. gallisepticum* infections. It is a practical and cheap alternative for field use.

**Keywords:** CRD, in-house ELISA, *Mycoplasma gallisepticum*, RSAT, Serologic diagnosis.

## Giriş

Türkiye, kanatlı hayvancılık sektörünün önemli bir üreticisi, tüketicisi ve ihracatçısıdır. Kanatlı yetiştiriciliği, yarattığı istihdam, modern entegre tesis yatırımları,

uzman üretim, işleme ve pazarlama mekanizması, dış ticarete sahip olduğu yüksek pay, sağlıklı ürün arzı ile Türkiye için önemli bir sektördür. Türkiye'de hem sektörde hem de yan dallarda yaklaşık 600 bin

**Yazışma adresi / Correspondence:** Oktay Keskin, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Eyyübiye Yerleşkesi Eyyübiye, Şanlıurfa, Türkiye e-posta: okeskin@harran.edu.tr

**ORCID IDs of the authors:** <sup>1</sup>0000-0002-0377-2650 • <sup>2</sup>0000-0002-9842-3305 • <sup>3</sup>0000-0001-7486-8054 • <sup>4</sup>0000-0002-5977-7872 • <sup>5</sup>0000-0001-7848-3899

kişi istihdam edilmektedir. Üretici çiftçi, sektörle ilgili esnaf, yem, ilaç, yan sanayi, nakliye, pazarlama dahil sektörden elde edilen gelirle hayatını sürdüren kişi sayısı yaklaşık 2,4 milyondur (Koca 2017).

Kronik solunum sistemi hastalığı (CRD), tavukların üst solunum yollarında *Mycoplasma gallisepticum* (MG)'un neden olduğu bir hastalıktır. MG, *Mollicutes* sınıfı, *Mycoplasmatales* takımı ve *Mycoplasmataceae* ailesi, *Mycoplasma* cinsinde yer alır. Kanatlı hayvanlarda hastalığa neden olan en önemli mikoplazma türleri MG ve *M. synovia* (MS)'dir. *M. meleagridis* ve *M. iowae* etkenleri de kanatlılarda hastalık yapsa da MG patojenik mikoplazmalar içinde en önemlisi olarak kabul edilmekte ve dünyanın birçok ülkesinde görülen kanatlı sağlığını yakından ilgilendiren ve hayvansal üretim üzerine başta yemin ete dönüşümünü, karkas kalitesini ve yumurta verimini düşürerek önemli ekonomik kayıplara neden olan bulaşıcı bir enfeksiyondur (WOAH 2021).

Kanatlı hayvanlarda enfeksiyondan dolayı komplike vakalarda ölüm oranında ciddi artışlar, ilaç ve tedavi masrafları, broilerlerde karkas ağırlığının düşmesi, yüksek iskarta oranı, damızlık ve yumurtacı sürülerde yumurta veriminde ve yem tüketiminde düşme, yumurta kabuk kalitesinde bozulma, yumurta üretiminde azalma, kuluçka verimliliğinde azalma, artırılmış biyogüvenlik önlemleri ve aşılama masraflarında artış gözlenir (Esendal 2002). Ayrıca, diğer enfeksiyonlar, yerleşim yeri, kalabalık ortam, zayıf hijyen ve enfeksiyöz bursal hastalık (IBD), enfeksiyöz bronşitis (IB), enfeksiyöz laringotraheitis (ILT) aşılama programları kayıpları arttırabilir. Broilerlerde ekonomik kayıplar canlı ağırlık artışında azalma (%20-30), yemden yararlanmada düşüş (%10-20), mortalite (%10-20) ve karkas kaybı (%10-20) olduğu bildirilmiştir (Özdemir 2013).

MG hindilerde enfeksiyöz sinuzitis nedenidir. MS enfeksiyonları genellikle tavuklarda subklinik üst solunum yolu enfeksiyonları şeklinde gözükür (Swayne 2013). CRD, Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi (WOAH)'de yer alan bir enfeksiyondur. Klinik olarak CRD enfeksiyonlarında, konjunktivitis, nazal akıntı, solunum güçlüğü öksürük, hapşırma, tracheal sesler, göz ve burun akıntısı görülmektedir (WOAH 2021). Nekropside, sinus, trachea, bronşlar, akciğer ve hava keselerinde kataral eksudat, hava keselerinde opaklaşma, hava keseleri ve oviduktta kazeöz eksudat, perikarditis, perihepatitis, salpingitis bulunur.

Enfeksiyonun yaygınlığı ülkelere göre farklılık göstermektedir. ABD'de yumurtacı sürülerin %50'den fazlasının infekte olduğu ve MG'nin yumurtacılar da endemik olduğu bildirilmiştir (Evans ve ark. 2005). Asya'da yapılan çalışmalarda MG preva-

lansı %17,2-%79,0 (Sato 1996), İran'da %10 (Haghghi-Khoshkhoo ve ark. 2011), Mısır'da %33,3 (Osman ve ark. 2009) olarak bildirilmiştir. Kapetanov ve ark. (2010), Sırbistan'daki 77 sürünün MG seroprevalansının 2000 yılında %9,01 ve 2009 yılında %11,59 olduğunu ve MG prevalansının arttığını bildirmişlerdir.

Türkiye'de tavuklarda mikoplazma yaygınlığı ile ilgili yapılan çalışmalarda Akan ve ark. (2008), serolojik ve moleküler inceleme sonucunda 43 broyler damızlık işletmesinin % 16,3'ünü MG pozitif, %20,9 MS pozitif olarak saptamışlardır. Özdemir (2013), Konya ve çevresindeki yumurtacı tavuk işletmelerinde solunum sistemi problemi olan ya da enfeksiyonu geçirmiş 33 sürüden 192 tavuğa ait solunum sistemi organlarını immunoperoksidaz ile incelemiş ve 20 (%60,6) kümeşte MG tespit etmiştir. Türkiye'nin batısında bulunan 3 ildeki 60 kümeşten toplanan 1060 kan örneğinin ELISA ile taranmasında %39,5 MG ve %67,9 MS seropozitifliği bulunmuştur (Özgül ve Türkyılmaz 2016).

Kanatlılarda CRD kontrolü ve önlenmesi etkili, spesifik, duyarlı ve ucuz tanı yöntemlerine bağlıdır. MG enfeksiyonunda görülen solunum sistemine ait klinik belirtiler diğer solunum sistemi hastalıklarıyla karışabildiğinden dolayı, günümüzde teşhiste, kültür, serolojik testler ve moleküler metodlar (polimeraz zincir reaksiyonu-PCR, Real-Time PZR ve nested PZR, loop-mediated isothermal amplification-LAMP) kullanılmaktadır. Kültürün sensitivitesi besiyerine ve numunenin alım zamanına göre değişmektedir. Kültür ile sonuç alınması ard arda pasajlar gerektirdiğinden 3-4 hafta gibi uzun süre almaktadır. Ayrıca uzmanlık gerektirmesi ve kullanılan antibiyotiklerin mikoplazmaların üremesini baskılaması da kültürün bir diğer dezavantajıdır. Etkenin varlığını tespit etmek için kullanılan PZR temelli moleküler metodlar daha fazla sarf malzeme gerektirmekte ve özel ekipmanlara ihtiyaç duymakta, dolayısıyla daha yüksek maliyet gerektirmektedir. Serolojik test olarak çabuk lam aglütinasyon testi (ÇLAT), hemaglütinasyon inhibisyon (HI) ve ELISA en çok kullanılan testlerdir (Kleven 2008; WOAH 2021). ÇLAT sürü bazında kullanılan çabuk bir tarama testidir ve MG enfeksiyonunu diğer ELISA ve HI testlerine göre daha erken saptasa da yanlış pozitif reaksiyonlara eğilimli bir testtir. Farklı kaynaklardan ve farklı serilerdeki antijenlerin sensitivite ve spesifitede farklı sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Kleven 1998). MG majör membran proteinlerindeki farklılığın suş varyasyonuna neden olduğu ve bunun da heterolog suşlara karşı gelişen antikor yanıtının zayıf olmasına yol açtığı bildirilmiştir (Noormohammadi ve ark. 2002). ELISA yüksek özgünlük ve duyarlılığa sahip, hızlı,

ekonomik ve çok sayıda serumun test edilmesine olanak sağlayan, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yaygın kullanım alanı bulan bir testtir (Miao ve ark. 2000; Peng ve ark. 2022). Serolojik testlerde otolog antijenlerin kullanımı, anti-*Mycoplasma* antikorlarını test eden serolojik testlerin duyarlılığını artıracaktır (Noormohammadive ark. 2002; Hosseini ve ark. 2018). Bu nedenle de MG ve MS teşhisi için ticari ELISA kitleri mevcut olsa da ELISA'da antijen olarak yerel suş kullanımının testin duyarlılığını artıracacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, CRD infeksiyonuna karşı gelişen antikorları saptamak için farklı suşların antijen olarak kullanıldığı "in house" bir ELISA prototipi geliştirilmesi ve sonuçların mevcut ticari kitle karşılaştırılarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### Standart suş

ELISA pleytlerini kaplamak için antijen hazırlanmasında kullanılan *M. gallisepticum* S6 suşu Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, WOAH Mycoplasma Referans Laboratuvarı, Pendik, İstanbul'dan temin edildi.

### Aşı suşu

Antijen olarak kullanılan *M. gallisepticum* 6/85 aşı suşu ise MSD Hayvan Sağlığı (ABD)'nden temin edildi.

### Saha suşları

Çalışmada Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan ve HMA olarak kodlanan 3 adet saha suşu (MG HMA 9, MG HMA 79 ve MG HMA 120) ELISA pleytlerini kaplamak için antijen hazırlanmasında kullanıldı.

**Kontrol ve saha serum örnekleri:** Testin duyarlılık ve özgüllüğünün saptanmasında, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarı serum koleksiyonunda bulunan CRD yönünden pozitif oldukları PZR ve kültür ile doğrulanmış 125 gerçek pozitif serum ve bu hastalık yönünden gerçek negatif olan 44 kontrol serumu kullanıldı. Ayrıca hazırlanan ELISA prototipinin ticari kitle karşılaştırılması için infekte olduğu teyit edilen bir sürüden teşhis amacıyla gönderilen 35 adet saha serum örneği kullanıldı.

### İmmünolojik test prosedürleri

**Çabuk lam aglütinasyon testi:** Ticari olarak Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsünden temin edildi. Testin uygulanışında oda ısısına getirilen antijen ve serum

örneklerinden birer damla temiz bir pleyt üzerinde karıştırıldı. İki dakika içerisinde oluşan aglütinasyon test sonucu açısından pozitif olarak değerlendirildi.

### in house ELISA için antijen hazırlamada kullanılacak suşların kültürü

Etken izolasyonu, Uluslararası Hayvan Sağlığı Örgütü (WOAH) Manuel'de belirtilen yöntemlere göre yapıldı. Frey Mycoplasma Broth Base (Himedia, Hindistan) üretici firmanın protokolü doğrultusunda hazırlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dk steril edildi. Besiyeri, 50-55°C soğutulduktan sonra steril şartlar altında besiyerine Mycoplasma Supplement G (Oxoid, Amerika Birleşik Devletleri) ve son konsantrasyonu %20 olacak şekilde at serumu (Himedia, Hindistan) ilave edilerek hazırlandı. Steril cam tüplere (her biri 5 ml) aktarılan Frey's sıvı besiyerlerine, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarı suş bankasında bulunan *M. gallisepticum* saha izolatları (MG HMA 9, MG HMA 79, MG HMA 120), standart *M. gallisepticum* S6 suşu ve *M. gallisepticum* 6/85 aşı suşu ekildikten sonra 37°C'de mikroaerobik şartlarda (%5 CO<sub>2</sub>) 72 saat inkübasyona bırakıldı.

### in house ELISA antijeninin hazırlanması

Antijen hazırlamak için, ilk olarak her suş için 1 ml *M. gallisepticum* kültürü, 10 ml Frey's besi yerine eklenerek (1:10 oranında) 37°C'de (%5 CO<sub>2</sub>) 72 saat inkübasyona bırakıldı. Aynı prosedür 100 ml sıvı besi yeri (1:10 oran) ve daha sonra 1000 ml Frey's sıvı besi yeri (1:10 oranı) elde etmek için uygulanarak alt kültürü sağlandı. Üreyen kültür (1000 ml) daha sonra 4°C'de 12.000 g'de 30 dakika santrifüj edildi Süpernatant atıldıktan sonra pelet, 3 kez 150 ml steril phosphate-buffered saline-PBS (Bioshop, Kanada) ile yıkandıktan sonra 4°C'de 18.000 g'de 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pelet PBS içinde süspanse edildi ve oluşan bakteriyel süspanسیون ELISA solid faz antijeni olarak kullanılmak üzere -20°C ye kaldırıldı. (Frey ve ark. 1968; WOAH 2021).

### in house ELISA

Kaplama antijenlerinin ve kontrol serumlarının farklı dilüsyonları ile yapılan checkerboard analizi sonrasında, pozitif ve negatif kontrol serumları arasındaki en büyük farkın olduğu antijen dilüsyonu pleytlerin kaplanmasında kullanıldı. Kaplama çözümü olarak karbonat-bikarbonat buffer (pH 9,6) kullanıldı. Antijen kaplama dilüsyonu, 96 gözlü pleytin (NUNC, 269620, Denmark) her kuyucuğuna 100µl olarak konuldu. Pleytler +4°C de bir gece bekletildikten sonra, 3 kez yıkandı ve ardından bağlanmanın olmadığı

yerleri bloklamak için %5 sütozu (Merck, Almanya), %0,05 Tween (Merck, Almanya) içeren PBS (BLOTTO) solüsyonu pleytleri bloklamak üzere kullanıldı. Oda ısısında 2 saat bloklamadan sonra pleytler bir kez yıkandı ve pozitif ve negatif kontrol ve test serumlarının BLOTTO içinde 1/100'lük dilüsyonu farklı gözlemlere 100 µl olarak konuldu. Oda ısısında 1 saat inkübasyonu takiben pleytler üç kez yıkandı ve yıkama işleminin ardından HRPO ile işaretli Anti-Chicken IgY yine BLOTTO içinde daha önceden checkerboard ile saptanan uygun dilüsyonda hazırlanarak her kuyucuğa 100 µl eklenip karanlık ortamda etüvde (37°C) yarım saat inkübe edildi ve 4 kez yıkamanın ardından pleytlerin her gözüne 100 µl substrat (0.1 M sitrat tamponu (Merck, Almanya) (pH 5,5) içinde 2 µg ortho-phenylenediamine (Sigma, Amerika Birleşik Devletleri) ve %0,03 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edildi. Pleytler oda ısısında 10-15 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100 µl 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Tekkim, Türkiye) ilave edilerek pleytler otomatik ELISA okuyucusu (VERSAmax 3.13/B2573, Amerika Birleşik Devletleri) ile 490 nm'de absorbans değerleri okundu. Negatif serum OD'lerinin ortalamasına 3 standart deviasyon (SD) eklenerek ELISA eşik değeri olarak belirlendi. Bu eşik değerinin üstünde bulunan serumlar hastalık antikorlarını taşıyan pozitif serumlar olarak belirlendi.

### in house ELISA tekniğinde sensitivite ve spesifitenin belirlenmesi

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarı serum koleksiyonunda bulunan CRD yönünden pozitif oldukları PCR ve kültür ile doğrulanmış 125 gerçek pozitif serum ve bu hastalık yönünden negatif olan 44 kontrol serumu farklı antijenlerle hazırlanmış ELISA'ların duyarlılık ve

özgüllüğünün saptanmasında kullanıldı. Duyarlılık ve özgüllüğün hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanıldı.

Duyarlılık; (Gerçek Pozitif Sayısı) / (Gerçek Pozitif Sayısı+Yanlış Negatif Sayısı) X 100

Özgüllük; (Gerçek Negatif Sayısı) / (Gerçek Negatif Sayısı+Yanlış Pozitif Sayısı) X 100

**Ticari ELISA:** Geliştirilen test kitinin sensitivite ve spesifitesini karşılaştırmak için ticari olarak satın alınan ELISA kiti (BioChek MG ELISA kit, İngiltere), kitin prospektüsünde belirtilen talimatlara göre uygulandı.

### İstatiksel Analiz

Ticari ve homemade ELISA'nın OD değerlerinin karşılaştırılması Pearson's correlation katsayısı (coefficient) (*r*) ile hesaplandı. Hesaplamalarda IBM SPSS istatistik programı (versiyon 16) istatiksel hesaplamalar için kullanıldı (IBM Corp. 2020).

### Bulgular

Çabuk Lam aglütinasyon testi ile 125 gerçek pozitif referans serumun 107'si (%85,6) pozitif, 18'i (%14,4) negatif olarak değerlendirildi. Gerçek negatif olarak kullanılan 44 serumun tümü negatif olarak saptandı.

Bu çalışmada, 1 referans, 1 aşı ve 3 yerel saha suş olmak üzere toplam 5 ayrı MG suşundan hazırlanan tüm hücre antijeni ile kaplanan 5 ayrı in-house ELISA prototipinin duyarlılık ve özgüllüğü, 125 gerçek pozitif ve 44 gerçek negatif serum ile test edildi.

Alınan sonuçlara göre MG 6/85, MG HMA 9, MG HMA 79, MG HMA 120 ve MG S6 suşlarından hazırlanan ELISA prototiplerinin duyarlılığı sırası ile %92, %94, %95, %96,8 ve %92 olarak hesaplandı (Tablo-1).

**Tablo 1.** Gerçek pozitif serumların farklı MG suşları ile ELISA ve duyarlılık sonuçları

Toplam gerçek pozitif serum sayısı	Farklı suşlarla uygulanan ELISA sonuçlarına göre pozitif çıkan serum sayıları				
	MG 6/85	MG HMA 9	MG HMA 79	MG HMA 120	MG S6
125	114	117	119	121	114
% Sensitivite	92	94	95	96,8	92

Elde edilen verilere göre MG 6/85, MG HMA 9, MG HMA 79, MG HMA 120 ve MG S6 suşlarından

hazırlanan ELISA prototiplerinin özgüllüğü %95,6, %95,6, %95,6, %96,7 ve %93,6 olarak belirlendi (Tablo-2).

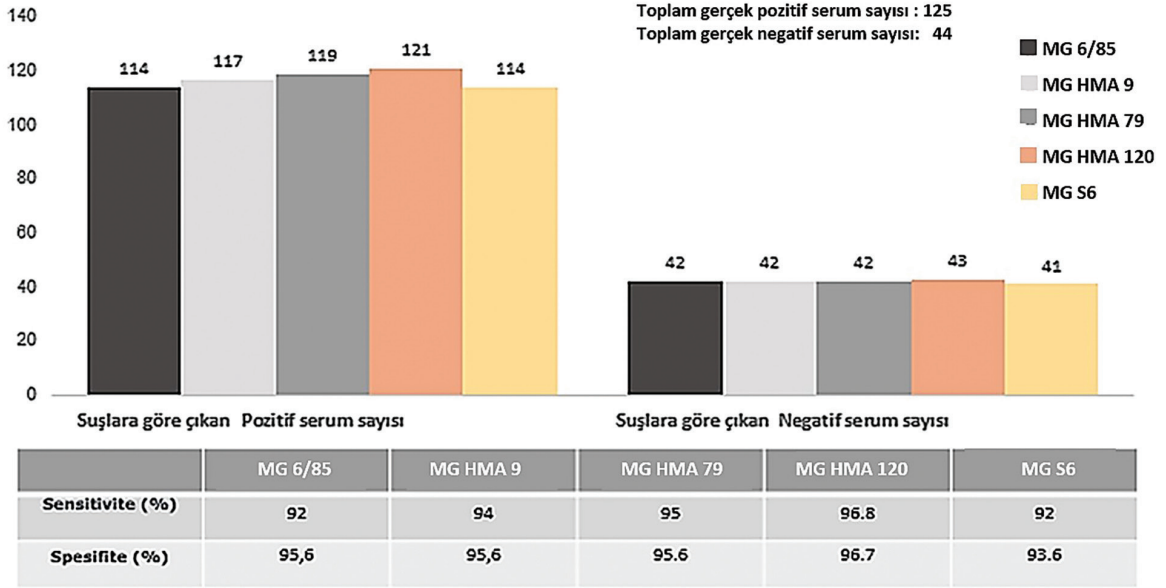
**Tablo 2.** Gerçek negatif serumların farklı MG suşları ile ELISA ve özgüllük sonuçları

Toplam gerçek negatif sayısı	Farklı suşlarla uygulanan ELISA sonuçlarına göre negatif çıkan serum sayıları				
	MG 6/85	MG HMA 9	MG HMA 79	MG HMA 120	MG S6
44	42	42	42	43	41
% Spesifite	95,6	95,6	95,6	96,7	93,6



ELISA için kullanılan 5 farklı suştan hazırlanmış antijenlerle pozitif ve negatif referans serumlardan elde edilmiş pozitiflik ve negatiflik sayıları ile sensitivite ve spesifite oranları grafik olarak Şekil-1'de verilmiştir.

Bu sonuçlara göre in-house ELISA için MG HMA 120 yerel saha suşu ile ELISA denemelerine devam edilmesine karar verildi.



**Şekil 1.** Farklı MG suşlarından hazırlanan ELISA ile kontrol serumlarının sonuçları ve sensitivite ve spesifite yüzdeleri.

**Tablo 3.** Çabuk lam aglütinasyon ile MG HMA 120 ELISA'nın karşılaştırılması

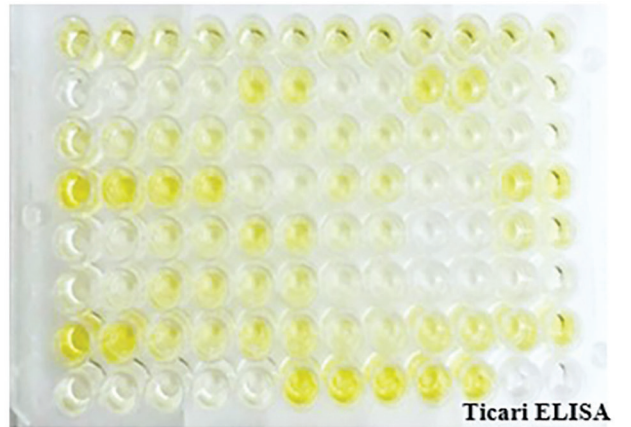
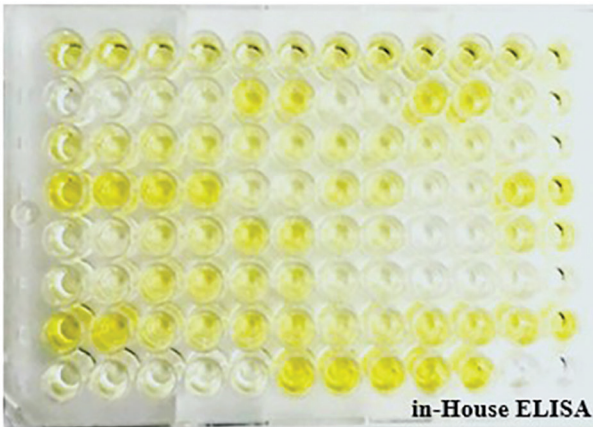
Serolojik test (n=125)	Pozitif (%)	Negatif (%)
Çabuk Lam aglütinasyon testi	107 (85,6)	18 (14,4)
ELISA MG HMA120	121 (96,8)	4 (3,2)

Gerçek pozitif serumların ÇLAT ile %85,6 MG HMA 120 ELISA ile %96,8 oranında pozitif sonuç verdiği belirlendi (Tablo-3). Bu suşla hazırlanan ELI-

SA prototipini test etmek için *M. gallisepticum* ile infekte olduğu belirlenen bir sürüden alınan 35 serum kullanıldı ve %80 pozitif, %14,7 şüpheli, %5,7 negatif olarak değerlendirildi (Tablo-4).

**Tablo 4.** in-House MG HMA 120 ELISA ile pozitif sürü serumlarına ait sonuçlar

Serolojik test (n=35)	Pozitif (%)	Şüpheli (%)	Negatif (%)
ELISA MG HMA120	28 (80)	5 (14,3)	2 (5,7)



**Şekil 2.** in-House ELISA ile ve Ticari ELISA ile test serumlarının sonuçları

İnfekte sürüden elde edilen bu 35 serum aynı zamanda ticari ELISA kiti ile de test edildi ve sonuçları karşılaştırıldı (Şekil-2).

Pearson's korelasyon katsayısı  $r=0,78$  ( $p=0,01$ ) olarak hesaplandı ve iki ELISA sonuçları arasında doğru yönlü yüksek bir uyum olduğu belirlendi (Tablo-5).

**Tablo 5.** Pearson Korelasyon katsayısı (Pearson correlation coefficient kullanarak in-House ELISA ve ticari ELISA arasındaki karşılaştırma

		Ticari ELISA	in-House ELISA
Ticari ELISA	Pearson korelasyon	1	0,78
	Significance (2 tailed)		0,010
	N	35	35
in-House ELISA	Pearson korelasyon	0,78	1
	Significance (2 tailed)	0,010	
	N	35	35

## Tartışma ve Sonuç

MG özellikle tavuk ve hindilerde kronik solunum yolu hastalığına et ve yumurta üretiminde kayıplara neden olan önemli bir ajandır. Bu hastalıkta klinik semptomların gözleendiği vakaları tespit etmek kolay olmasına rağmen, subklinik vakalarda, bu vakaların görüldüğü kümeslerin izlenmesinde serolojik tekniklerden sıklıkla faydalanılmaktadır (Esendal 2002). Mikoplazmosis gibi vertikal bulaşan hastalıklarda, damızlıkların ve bunların civcivlerinin periyodik olarak izlenmesi, ülkede infeksiyonun durumu hakkında fikir vermesi açısından çok önemlidir ve böylece sektör de hastalık hakkında bilgi sahibi olur.

Hastalığın serolojik teşhisinde çabuk lam aglütinasyon, hemaglütinasyon inhibisyon ve ELISA en sıklıkla kullanılan serolojik testlerdir (WOAH 2021).

Ali ve ark. (2017), farklı yaşlarda ve farklı popülasyon hacmine sahip 12 farklı işletmeden toplanan 563 tavuk serum örneğinde ÇLAT ile %56,13, ELISA ile %64,47 seroprevalans saptadıklarını bildirmiştir. Malik ve ark. (2019) Pakistan'da aşılammış broyler sürülerinde MG seroprevalansını araştırdıkları çalışmada IgM antikorlarını saptayan ÇLAT tekniğinin enfeksiyonun sadece başlangıç aşamasıyla sınırlıyken, ELISA daha spesifik bulunmuş ve IgG antikorlarını saptayarak yanlış pozitif sonuçları ortadan kaldırdığı bildirilmiştir. Osman ve ark. (2009) 4 haftalık tavuk serumlarında ÇLAT ile %48,7, ELISA ile %60 pozitiflik saptarlarken 14 haftalık yumurtacılar da ÇLAT ile %69,9 ve ELISA ile %58,9 oranında

pozitiflik belirlemişlerdir. Bu çalışmada da ÇLAT ile 125 gerçek pozitif serumun 107'si (%85,6) pozitif bulunurken, MG HMA 120 ELISA 121'ini (%96,8) pozitif bulmuştur. ELISA ile ÇLAT'a göre daha yüksek oranlarda pozitiflik saptanması araştırıcının bildirimleri ile uyumludur. Osman ve ark. (2009)'nın 14 haftalık grupta seropozitifliğin ÇLAT'da ELISA'ya göre yüksek olmasının nedeni kanatlıların yaşı ile yalnızca pozitifliğin daha fazla görülebilmesi ve dolayısı ile araştırcıların çalışmalarında belirttiği üzere ÇLAT'ın düşük spesifitesine bağılı olabilir.

Wanasawaeng ve ark. (2015), Tayland'dan izole edilmiş yerel bir suş ile MG'a karşı oluşan antikorları saptamak amacıyla ELISA ve ÇLAT geliştirmek için yaptıkları çalışmada in-house ELISA ve ticari ELISA sonuçlarını karşılaştırmışlar sensitivitesini %67, spesifitesini %95 olarak saptamışlardır. Çalışmada solunum problemi bulunan ve ÇLAT pozitif bulunan 10 kümeden alınan 15'er serum test edilerek yerel suşla hazırlanan in-house ELISA'nın uluslararası pazarda bulunan benzeri ticari kitlelere göre uygulanabilir olduğunu bildirmişler ve bunun nedeninin saha suşu ile hazırlanan ELISA'nın ticari muadillerine yakın bir spesifite göstermesi olduğunu belirtmişlerdir. Rasool ve ark. (2017), 47 serum ile test ettikleri lokal bir suşdan hazırlanmış olan antijenle kaplı ELISA ile %89,13, ticari ELISA ile %80,43 oranında pozitiflik bulmuşlar ve aradaki farkın anlamlı olduğunu ( $p<0,05$ ) bildirmişlerdir. Elyazeed ve ark. (2020), tam hücre ve sonike hücre antijenleri ile hazırladıkları iki farklı in-house ELISA sonuçlarını ticari bir ELISA kiti sonuçları ile karşılaştırmışlar Pearson's korelasyon katsayılarını sırasıyla ( $r=0,80$ ,  $p=0,009$  ve ( $r=0,79$ ,  $p=0,011$ ) olarak hesaplamışlardır. Elde ettikleri bu yüksek korelasyonu gösteren değerler sonucunda her iki in-house ELISA tekniğinin de kullanılabilir olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada, yapılan testlerle seçilen yerel MG HMA 120 olarak kodlanmış MG suşundan elde edilen tüm hücre antijeni ile hazırlanan in-house ELISA prototipi ile test edilen infekte bir sürüye ait 35 serum örneği aynı zamanda ticari bir kitle de test edilerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. Sonuçlar iki kit arasındaki korelasyon katsayısının yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Pearson's korelasyon katsayısı ( $r=0,78$ ,  $p=0,01$ )). Bu durum, yerli bir suştan geliştirilen in house ELISA'nın MG'un neden olduğu CRD vakalarında güvenle kullanılabileceği, ticari muadillerine göre benzer özgüllük ve duyarlılık gösteren, ucuz ve ekonomik bir test olduğunu düşündürdü. Noormohammadi ve ark. (2002), serolojik testlerde yerel suşlardan hazırlanan antijenlerin kullanımının mycoplasma antikorlarını tespit etmeyi hedef alan testlerin duyarlılığını artıracaklarını bildir-

mektedir. Çalışmada elde edilen bulgular da araştırıcıların (Noormohammadi ve ark. 2002; Rasool ve ark. 2017; Elyazeed ve ark. 2020) bulguları ile uyum göstermektedir.

Sonuç olarak, kanatlı sektöründe önemli kayıplar oluşturan ve sıkı kontrol altında tutulması gereken CRD varlığının belirlenmesi için, yerel bir izolat ile hazırlanan in-house ELISA tekniğinin daha yüksek sensitivite ve spesifite ile ticari ithal kitlerden çok daha ucuz olacak şekilde kullanılabileceği, böylece enfeksiyonun yayılmasını önlemek için enfekte sürülerin doğru ve zamanında teşhis edilerek kontrol programlarında başarıyı artıracadığı kanısına varıldı.

**Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler:** Bu araştırma için etik kurulu izni alınmasına gerek yoktur. Ayrıca yazarlar Araştırma ve Yayın Etiğine uyulduğunu beyan etmişlerdir.

**Teşekkürler:** Makale XV. Ulusal (uluslararası katılımlı) Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi'inde (22-26 Ekim 2022 şanlıurfa-Türkiye) sözlü olarak sunulmuştur. Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, WOAH Mycoplasma Referens Laboratuvarı ve MSD Hayvan Sağlığı'na teşekkür ederiz.

**Maddi destek ve çıkar ilişkisi:** Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Kurulu Başkanlığı tarafından 21304 proje numarası ile desteklenmiştir. Yazarların beyan edecek çıkar çatışması yoktur.

## Kaynaklar

Akan M. (2008) Tavuklarda Mikoplazma İnfeksiyonları: Koruma ve Kontrol. *Veteriner Tavukçuluk Derneği Mektup Ankara*. 6, 21-24.

Ali Z, Sultana S, Karim R, Hassan Z, Yousuf A, Hossen A, Samad MA, Giasuddin M, Rahman M. (2017) Compared the effect of indirect ELISA and serum plate agglutination (SPA) test for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken. *Int J Health Animal Sci Food Saf*, 4, 59-66. <https://doi.org/10.13130/2283-3927/8975>

Elyazeed HA, Al-Atfeehy NM, Abotaleb R, Sayed R, Marouf S. (2020) Preparation of ELISA and Lateral Flow Kits for rapid Diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* in Poultry. *Sci Rep*, 10, 9056. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65848-7>

Esendal ÖM. (2002) Mikoplazma Enfeksiyonları "Kanatlı Hayvan Hastalıkları". Ed; Müjgan İzgür ve Mehmet Akan, 1. baskı, 79-94. Medisan, Ankara, Türkiye.

Evans JD, Leigh SA, Branton SL, Collier SD, Pharr GT, Bearson SMD. (2005) *Mycoplasma gallisepticum*: current and developing means to control the avian pathogen. *Poult Sci*. 14, 757-763. <https://doi.org/10.1093/japr/14.4.757>

Frey ML, Hanson RP, Anderson DP. (1968) A Medium for the Isolation of Avian Mycoplasmas. *Am J Vet Res*. 29, 2163-2171.

Haghighi-Khoshkhou P, Akbariazad G, Roohi M, Inanlo J, Masoumi M, Sami-Yousefi P. (2011) Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in the commercial layer flocks of the centernorth of Iran. *Afr J Microbiol Res*, 5(18), 2834-2837. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.647>

Hosseini S, Rito-Palomares M, Vazquez-Villegas P, Martinez-Chapa SO. (2018) Enzyme-linked Immunosorbent Assay From A to Z. Springer, India. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-6766-2>

IBM Corp. (2020) IBM SPSS Statistics for Windows (Version 16.0) [Computer software]. IBM Corp.

Kapetanov M, Orlić D, Potkonjak D, Velhner M, Stojanov I, Milanov D, Stojanovic D. (2010) *Mycoplasma* in poultry flocks in the year 2009 compared to the year 2000 and significance of the control measures. *Lucr. řtiinđ. - Univ. Agron. "Ion Ionescu de la Brad" Iași, Ser. zooteh.-med. vet.*, 43(1), 249-253.

Kleven SH. (1998) *Mycoplasmosis*. In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. 4th ed. DE Swayne, JR Glisson, MW Jackwood, JE Pearson and WM Reed (eds). American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, New Bolton Center, Kennett Square, PA. 74-80.

Kleven SH. (2008) Control of Avian *Mycoplasma* Infections in Commercial Poultry. *Avian Dis*. 52, 367-374. <https://doi.org/10.1637/8323-041808-Review.1>

Koca S. (2017) Türkiye'de Broiler Et Üretimi: Hedefler ve Potansiyel Problemler. *Veteriner Tavukçuluk Derneği Mektup Ankara*. 15(1), 4-10.

Malik M, Sohail M, Sajid M, Hammidullah, Bibi F, Shoaib M. (2019) Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* in non Vaccinated broiler flocks in Abbottabad Khyberpakhtunkhwa, Pakistan. *Research in: Agricultural & Veterinary Sciences*, 3(1), 36-42.

Miao D, Zhang P, Gong Y, Yamaguchi T, Iritani Y, Blackall PJ (2000) The development and application of a blocking ELISA kit for the diagnosis of infectious coryza. *Avian Pathol*. 29: 219-225. <https://doi.org/10.1080/03079450050045477>

Noormohammadi AH, Browning GF, Cowling PJ, O'Rourke D, Whitehear WG, Markham PF (2002) Detection of antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* vaccine ts-11 by an autologous pMGA enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis*. 46, 405-411. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0405:DOATM-G\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0405:DOATM-G]2.0.CO;2)

Osman KM, Aly MM, Amin ZMS, Hasan BS. (2009): *Mycoplasma gallisepticum*: an emerging challenge to the poultry industry in Egypt. *Rev Sci tech Off int Epiz*. 28 (3), 1015-1023. <http://dx.doi.org/10.20506/rst.28.3.1940>

Özdemir Ö. (2013) Tavukçuluk Sektöründe Devam Eden Sorun: *Mycoplasma gallisepticum* (MG) İnfeksiyonuna Genel Bir Bakış. *Veteriner Tavukçuluk Derneği Mektup Ankara*. 11(2), 5-10.

Özgün MR, Türkyılmaz S. (2016) The Determination of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* antibodies in poultry blood sera with ELISA. *Kocatepe Vet J*. 9(1), 19-23. DOI: 10.5578/kvj.10870

Peng P, Liu C, Li Z, Xue X, Mao P, Hu J, Xu F, Yao C, You M. (2022) Emerging ELISA derived technologies for in vitro diagnostics. *Trens Anal Chem*, 152, 116605. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116605>

Rasool A, Anjum AA, Rabbani M, Lateef M, Nawaz M, Akhtar F, Kanwal A, Sattar S. (2017) Preparation of *Mycoplasma synoviae* antigens and evaluation by rapid slide agglutination and enzyme linked immunosorbent assay. *The J Anim Plant Sci*. 27(3), 841-847.

Sato S. (1996) Avian mycoplasmosis in Asia. *Rev Sci tech Off int Epiz*. 15(4), 1555-1567. <https://doi.org/10.20506/rst.15.4.984>

Swayne DE. (2013) Diseases of Poultry, 13<sup>th</sup> Edt. John Wiley & Sons, Inc. UK.

Wanasawaeng W, Chaichote S, Chansiripornchai N. (2015) Development of ELISA and Serum Plate Agglutination for Detecting Antibodies of *Mycoplasma gallisepticum* using Strain of Thai Isolate. *Thai. J Vet Med*, 45(4), 499-507.

WOAH Terrestrial Manual. (2021) Avian mycoplasmosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Chapter 3.3.5.



## Multietiological abortion due to *Brucella melitensis* and *Chlamydia abortus* in a sheep fetus

İbrahim Deniz<sup>1\*</sup>, Ertan Oruç<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Konya Veterinary Control Institute Directorate, Bacteriology Laboratory, Konya, Türkiye

<sup>2</sup> Selçuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Konya, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 28.04.2023, Kabul Tarihi / Accepted: 16.10.2023

**Abstract:** In this case report, multietiological abortion due to *Brucella melitensis* (*B. melitensis*) and *Chlamydia abortus* (*C. abortus*) agents defined in sheep abortion. Agents, was defined in sheep abortion, fetus of which was submitted to Konya Veterinary Control Institute (KVCI) from a sheep farm in Niğde province *Brucella spp.* presence was determined by bacterial isolation method and confirmed by slide agglutination test with monospecific A and M sera. *C. abortus* was detected by real-time PCR and immunohistochemistry (IHC) methods. In histopathological examinations, hyperemia, haemorrhage and bronchopneumonia were observed in the lung; degeneration and necrosis of heart muscle cells were observed in the heart; hyperemia, haemorrhage, oedema, necrosis and mononuclear cell infiltrations were observed in the placenta. In this case report, it was emphasized that multietiological abortions involving more than one factor should be taken into consideration, as well as an etiological agent in the fight against sheep abortions, In this context, It would be appropriate to use multidisciplinary diagnostic methods to determine the abortion factors, thus contributing to the prevention of abortions, which is still an essential problem in sheep breeding.

**Keywords:** *Brucella melitensis*, *Chlamydia abortus*, histopathology, immunohistochemistry, multietiological abortion, PCR.

### Bir koyun fetusunda *Brucella melitensis* ve *Chlamydia abortus* nedeniyle oluşan multietiyolojik abort

**Özet:** Bu olgu raporunda, Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğüne (KVKEM) 2021 yılında, Niğde ilindeki bir koyun işletmesinden gönderilen koyun abort olgusunda *Brucella melitensis* (*B. melitensis*) ve *Chlamydia abortus* (*C. abortus*) etkenlerine bağlı multietiyolojik abort tanımlandı. *Brucella spp.* varlığı bakteriyel izolasyon yöntemi ile belirlendi ve monospesifik A ve M serumları ile yapılan lam aglutinasyon testi ile doğrulandı. *C. abortus* ise real time PZR ve immunohistokimya (IHK) yöntemleri ile tespit edildi. Histopatolojik incelemelerde ise akciğerde; hiperemi, kanama ve bronkopnömoni; Kalpte kalp kası hücrelerinde dejenerasyon ve nekroz ile plasentada hiperemi, kanama, ödem, nekroz ve mononükleer hücre infiltrasyonları dikkati çekti. Bu olgu raporunun, koyun abortları ile mücadelede tek bir etiyolojik ajanın yanında birden fazla etkenin karıştığı multietiyolojik abortların da dikkate alınması gerektiği, abort etkenlerini belirlemek için de multidisipliner teşhis yöntemlerinin kullanılmasının uygun olacağını belirtmek ve böylelikle koyun yetiştiriciliğinde halen önemli bir sorun olan abortların önlenmesine katkı sağlaması açısından yayımlanması uygun bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** *Brucella melitensis*, *Chlamydia abortus*, histopatoloji, immunohistokimya, multietiyolojik abort, PZR.

## Introduction

To maintain profitability in small cattle breeding, it is aimed to have at least one offspring per year. Abortion is one of the most important factors that negatively affect this aim and cause significant economic losses in ovine breeding (Wu et al. 2014). The fact that the abortion rate is more than 5% in a flock reveals the necessity of significant measures (Ay 2017). Abortion factors that can occur at any stage of pregnancy are classified as infectious and non-

infectious causes (Brom et al. 2012). Non-infectious causes include care and nutritional disorders, environmental conditions, and misuse of hormones and drugs (Ay 2017). Among the infectious causes that play a much more significant role in the aetiology of abortion there are bacterial, viral, parasitic, and fungal factors. Despite the different prevalences between countries, the most important infectious abortion factors in sheep in Türkiye are *Brucella melitensis*, *Campylobacter fetus subsp. fetus*, *Chla-*

*mydia abortus*, *Salmonella abortusovis*, *Akabane virus*, *Border Disease virus (BDV)*, *Blue Tongue Virus*, *Toxoplasma gondii*, *Coxiella burnetii*, and *Neospora caninum*. Some of these pathogens are zoonotic agents that cause abortion and stillbirth, not only in domestic animals but also in humans (Gulaydin et al. 2023).

In addition to abortions caused by an etiological agent, sometimes abortions caused by more than one factor can be seen (Gulaydin et al. 2023). De Angelis et al. (2022) detected a co-infection caused by *Listeria monocytogenes* and *Toxoplasma gondii* in abortion and lamb deaths in a flock of sheep. Ramo et al. (2022) reported abortions with other abortion factors accompanying *Coxiella burnetii* in small ruminant flocks. In the reports prepared in Türkiye, Sevik et al. (2017a) revealed co-infection of *Peste des Petits Ruminants Virus (PPR)* and *Brucella melitensis* in an aborted sheep fetus, and in another report (Sevik et al. 2017b) co-infection of *Border Disease Virus (BDV)* and *Brucella melitensis* in a sheep abortion.

The aim of this case report was to describe a multietiological abortion case due to *B. melitensis* and *C. abortus* detected in a sheep and to draw attention to multietiological abortions in the abortion struggle.

## Materials and Methods

### The sample selection

Aborted fetus and fetal placenta were brought to KVCI in 2021 from a sheep herd in Nigde province. According to the information given by the herd owner, it was stated that abortions occurred in the enterprise, especially in the last period of pregnancy. A systemic necropsy was performed on the aborted fetus, and gastric contents, lung, heart, and placenta samples were taken for laboratory studies.

### Bacteriological examination

Stomach contents were inoculated into blood agar (CM0271) in which *Brucella* selective supplement (Oxoid, SR0083A) was added. It was then incubated at 37°C and 10% CO<sub>2</sub> in an oven for 8-10 days (Woah 2022a). Gram staining was performed on the colonies observed because of incubation, and they were classified according to their morphological characteristics at the genus level. Results were confirmed by a slide agglutination test with monospecific A and M antisera (A+M Positive Control Antiserum, Pendik Veterinary Control Institute Directorate, Istanbul). A Vitek 2 device was used to determine the isolate at the species level.

### DNA extraction and real-time PCR analysis

Lung, heart, and placental tissues were frozen at -20°C after necropsy. Then, the frozen tissues were cut into small pieces and placed in an Eppendorf tube containing 450 µl of ultrapure water (Lonza, Belgium). Then, the tissues were fragmented with the help of a tissue shredding device (Qiagene, Germany). Eppendorf tubes with fragmented tissue were centrifuged at 5.000 rpm for 4-5 min. DNA extraction was performed from the supernatant part in an automatic extraction device (QIAcube, Qiagene, Germany) in accordance with the kit protocol (IndiSpin Pathogen Kit, Indical Bioscience, Germany).

Real-time PCR was performed on a Qiagen Rotor-Gene Q (Qiagen, Germany) device. Analysis was performed according to modified company protocols using the primer-probe set (Pantchev et al. 2009) and LightCycler 480 Probe Master Kit (Roche, USA) targeting the *ompA* gene indicated in Table 1.

### Procedures performed for differential diagnosis

*Brucella spp.* in order to reveal the presence of other aerobic and microaerophilic bacterial abortion factors (*Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*) other than stomach contents, lung, heart, and placenta samples were cultured (Aydin et al. 2007; Dhama et al. 2015; Woah 2022b). Molecular tests were applied to investigate the presence of *Akabane*, *Border disease*, and *Blue tongue virus* as well as *PPRV*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* (Muller et al. 1996; Akashi et al. 1999; Costa et al. 2000; Vilček and Paton 2000; Hofmann et al. 2008; Li et al. 2016).

### Histopathological examination

Necropsy of the sheep fetus was performed and tissue samples were collected, fixed in 10% buffered formalin solution, embedded in paraffin, sectioned at 5 µm and stained routinely with Hematoxylin-Eosin (H-E). All sections of the tissues were examined under a light microscope, and pathomorphological changes were determined according to the organs.

### Immunohistochemical examination

Sections of 4-5 µm thickness were taken from the paraffin tissue blocks on polylysine slides (Isotherm, Türkiye). After this stage, staining was performed automatically on the Ventana Benchmark XT device with the biotin-free indirect IHC staining method in accordance with the kit procedure (ultraVIEW Universal DAB Detection Kit, USA). Mouse monoclonal antibody specific to the *Chlamydiaceae* family (Progen Biotechnic GmbH, Germany) was used

as an antibody in IHC staining. Mayer's hematoxylin included in the kit was used for background staining. All tissue sections were examined under a light microscope. Positive control preparations obtained from the pathology laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Zurich, were used as IHC positive controls. Accordingly, cellular-associated granular or homogeneous brown staining on a blue background, sometimes in the nucleus, in the cytoplasm and sometimes in both areas, was considered positive. PBS-treated preparations were used as negative controls instead of antibodies.

## Results

### Gross pathology

Necropsy of the aborted fetus revealed macroscopic autolysis of the brain, liver and intestines. Apart

from this, during necropsy, subcutaneous oedema and watery or bloody contents in the abdominal and thoracic cavities were observed. Necrosis was found mainly in the cotyledons and the intercotyledonous region in the placental tissue of the fetus.

### Bacteriological isolation

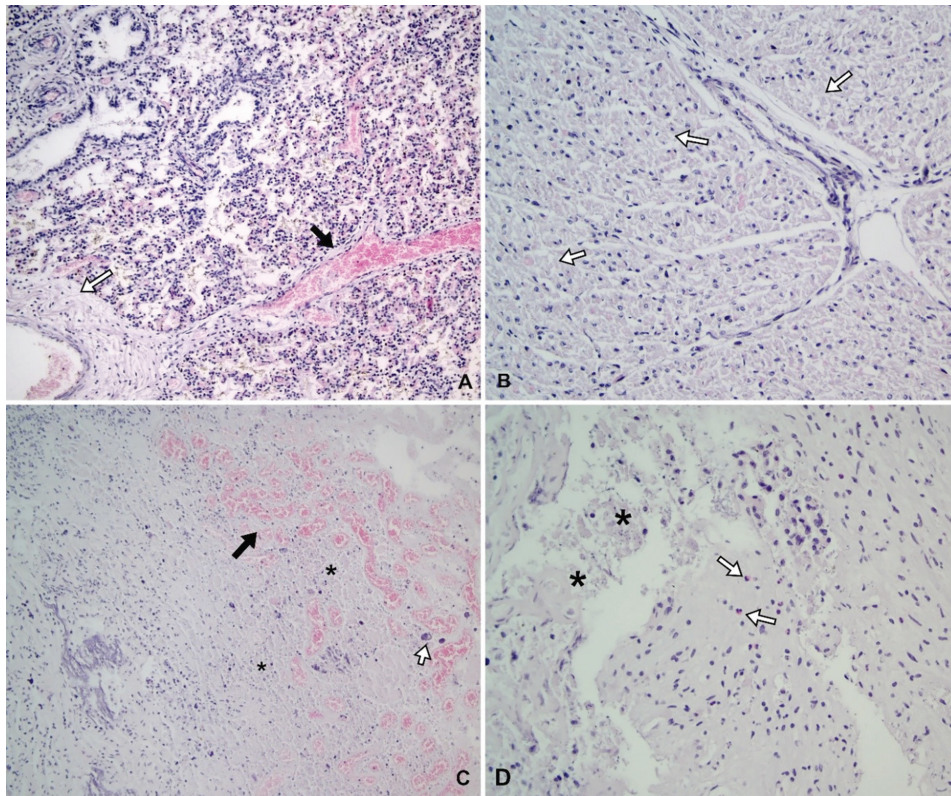
In this case, *Brucella spp.* was isolated. The result was confirmed by a slide agglutination test with monospecific A and M antisera (A+M Positive Control Antiserum, Pendik Veterinary Control Institute Directorate, Istanbul). The isolate was determined to be *Brucella melitensis* on the Vitek 2 device.

### Real-time PCR analysis

*C. abortus* DNA was detected in PCR performed using the extract prepared from fetal tissues (Table 1).

**Table 1.** Primer-probe sets used in real-time PCR (Pantchev et al. 2009).

Primary / Probe Name	Primer and Probe (FAM/TAMRA) Index 5'-3'	Amplicon Size (bp)
<i>C. abortus</i>	F: (5' - GCAACTGACACTAAGTCGGCTACA - 3') R: (5' - ACAAGCATGTTCAATCGATAAGAGA - 3') P:(FAM - AAATACCACGAATGGCAAGTTGTTTAGCG - TAMRA)	82



**Figure 1.** A) Lung. Dilated and hyperemic vessels (black arrow) and perivascular oedema (white arrow), H-E, 100X. B) Heart. Degenerative and necrotic areas (arrows), H-E, 200X. C) Placenta. Severe hyperemia (black arrow), necrosis (\*), and a trophoblast with inclusion body (white arrow) H-E, 100X. D) Placenta. Necrotic areas (\*) and granulocytes (white arrows), H-E, 200X.

### Differential diagnosis for other abortion agents:

As a result of bacteriological culture and molecular analysis, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Akabane virus*, *Border disease virus*, *Bluetongue virus*, *PPRV*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* were found negative.

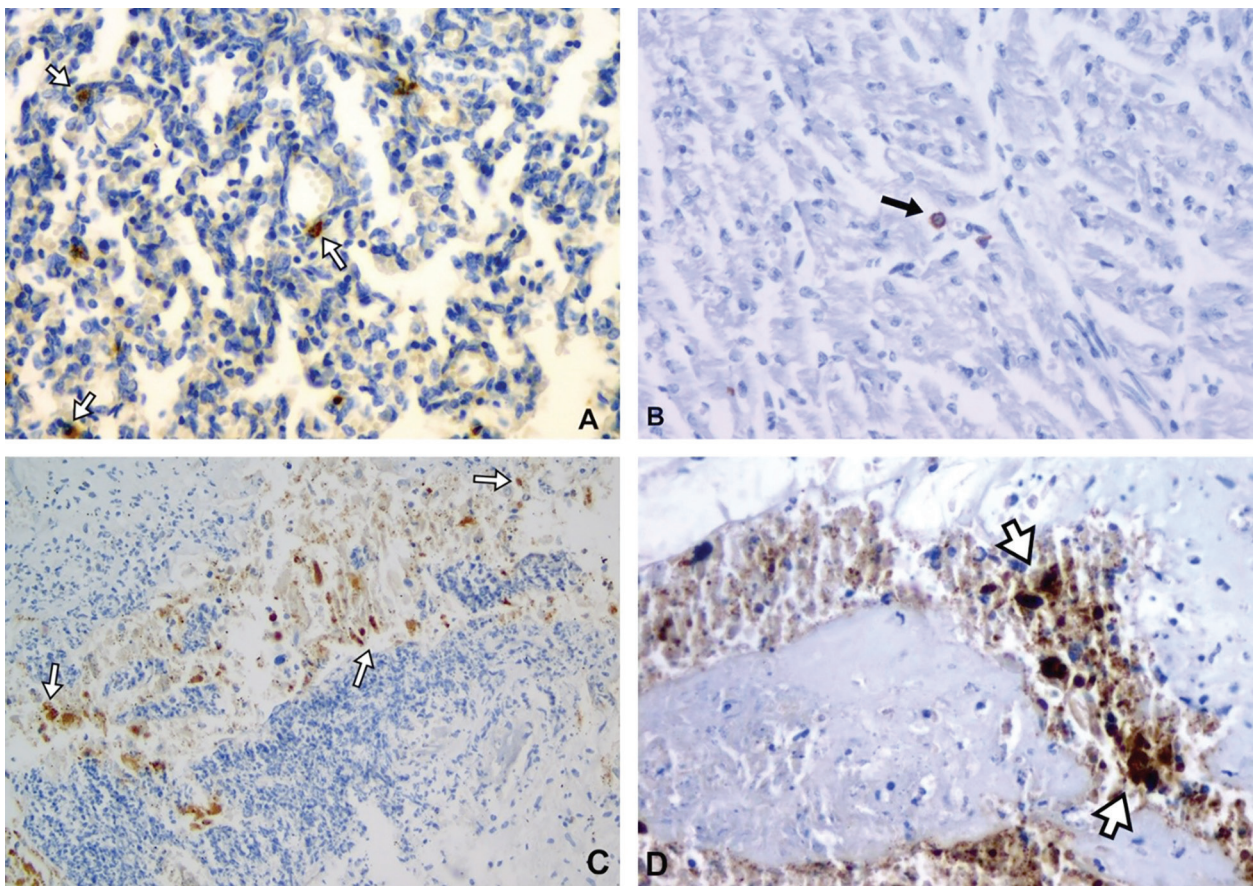
### Histopathology

The fetal lung showed catarrhal or mucopurulent bronchopneumonia with varying degrees of hyperemia, oedema and desquamation of bronchial/bronchiolar epithelium. The heart showed myocarditis with degeneration and necrosis of varying severity in the heart muscle cells, hyperemia, haemorrhage and mononuclear cell infiltration in interstitial areas. The placenta showed acute placentitis

dominated by granulocytes and chronic placentitis dominated by mononuclear cells, including necrosis, hyperemia, oedema and haemorrhage of varying severity. Histopathological findings of the lung, heart and placenta are presented in Figure 1.

### Immunohistochemistry

In IHC staining of aborted fetus lung, heart, and placenta, *Chlamydia spp.* immunopositivity was found. Localization of *Chlamydial* antigen was determined in alveolar and peribronchiolar macrophages in the lung, inflammatory infiltration in the interstitial area of the heart, and trophoblasts in the placenta. Figures of positive staining for *Chlamydial* antigen are presented in Figure 2.



**Figure 2.** Immunopositive staining of *Chlamydia spp.* in alveolar macrophages of the lung (A), in inflammatory cells of the heart (B) and trophoblasts in the placenta (C and D). Original magnifications: A, B, D=400X, C=200X, Indirect IHC staining.

### Discussion and conclusion

*B. melitensis* is one of the most common causes of sheep abortions in Türkiye (Sakmanoglu et al. 2021;

Gulaydın et al. 2023). Although studies on *C. abortus* are fewer compared to *B. melitensis*, *C. abortus* is also one of the essential abortion factors in Türkiye (Malal and Turkyilmaz 2021; Yeni 2022). Due to

the inability to obtain healthy offspring, abortions continue despite strict vaccination programs in Türkiye as well as all over the world and cause severe economic losses by disrupting sustainable livestock breeding. This suggests that multietiological abortions are more than predicted, and abortions belong to a single etiologic agent. As a matter of fact, as mentioned in the introduction, abortion cases in which different etiologic agents are seen together have been reported recently (Sevik et al. 2017a; Sevik et al. 2017b; De Angelis et al. 2022; Ramo et al. 2022).

In this case report, a multietiological abortion caused by *B. melitensis* and *C. abortus* was described in a sheep abortion.

When the studies on sheep abortions in Türkiye were examined, no multietiological abortion case was reported together with *B. melitensis* and *C. abortus*. In the studies carried out worldwide Hailat et al. (2018), both *B. melitensis* and *C. abortus* positivity were reported in 5 placenta samples in the study performed by IHC and PCR on placenta samples of small ruminants. The histopathological findings obtained in this case were found to be compatible with previous data (Yesilmen et al. 2018; Westermann et al. 2021; Filikci 2022; Kanat 2022). In addition, experimental and field studies were conducted in terms of *Chlamydial* antigen localization in IHC staining (Maley et al. 2009; Longbottom et al. 2013; Livingstone et al. 2017).

In line with the studies and our report presented, it should not be overlooked that pets are not constantly exposed to a single abortion factor and that different etiological agents may play a role together and lead to multietiological abortions. Therefore, in the diagnosis of abortion cases, it is thought that a multidisciplinary approach in terms of multiple factors rather than an etiologic agent is essential in diagnosis. Knowing this situation and making a complete diagnosis will ensure that more perfect protection measures are taken in terms of human and animal health.

In this case, *B. melitensis* was diagnosed by bacteriological isolation, and *C. abortus* was diagnosed by real-time PCR and IHC methods. For this reason, it would be helpful to test many factors with multidisciplinary diagnostic methods in an abortion case.

In conclusion, a multiethological abortion case due to *B. melitensis* and *C. abortus* in sheep abortions was described for the first time in Türkiye, and it was evaluated that similar abortion patterns should be considered in the fight for abortion. Con-

sidering that these infectious agents are also essential zoonoses, it was concluded that it would be appropriate to focus on them seriously and to investigate the agents one by one with more comprehensive diagnostic methods without depending on limited methods in laboratory diagnosis.

#### **Ethics committee for the use of experimental animals and other ethical committee decisions and permissions:**

It has been understood that there is no need for the permission of the Ethics Committee in accordance with the article "Procedures performed with dead animals or their tissues, slaughterhouse materials, waste fetuses are not subject to the permission of HADMEK" in the legislation on the Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees.

With the official letter of the Ministry of Agriculture and Forestry, General Directorate of Food and Control, dated 31.03.2023 and numbered E-71037622-399-9408343, this case report was allowed to be published.

**Acknowledgements:** We would like to thank the Ministry of Agriculture and Forestry General Directorate of Food and Control for permission to publish the case report and the Konya Veterinary Control Institute Directorate for their support.

**Financial support and conflict of interest:** No person/organization financially supports the study, and the authors do not have any conflict of interest.

## Reference

- Akashi H, Onuma S, Nagano H, Ohta M, Fukutomi T. (1999) Detection and differentiation of Aino and Akabane Simbu serogroup bunyaviruses by nested polymerase chain reaction. *Archives of virology*. 144, 2101-2109.
- Ay SS. (2017) Küçük ruminantlarda abortus sorunu ve reprodüktif aşılama programları. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Obstet Gynecol-Special Topics*. 3,2, 129-136.
- Aydin F, Gumussoy, KS, Atabay HI, Iça T, Abay S. (2007) Prevalence and distribution of Arcobacter species in various sources in Türkiye and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. *Journal of applied microbiology*. 103, 1, 27-35.
- Costa JM, Pautas C, Ernault P, Foulet F, Cordonnier C, Bretagne S. (2000) Real-time PCR for diagnosis and follow-up of Toxoplasma reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *Journal of clinical microbiology*. 38, 8, 2929-2932.
- De Angelis ME, Martino C, Chiaverini A, Di Pancrazio C, Di Marzio V, Bosica S, Malatesta D, Salucci S, Sulli N, Acciari VA, Pomilio F. (2022) Co-Infection of *L. monocytogenes* and *Toxoplasma gondii* in a Sheep Flock Causing Abortion and Lamb Deaths. *Microorganisms*. 10, 8, 1647. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081647>.
- Dhama K, Karthik K, Tiwari R, Shabbir MZ, Barbuddhe S, Malik SVS, Singh RK. (2015) Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagno-



- sis and control: a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*. 35, 4, 211-235.
- Filicki K. (2022) Pathomorphology of Sheep and Goat *Chlamydial* Abortions. PhD Thesis, Erişim Adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp> AU Institute of Health Sciences, Ankara.
- Gulaydın O, Ozturk C, Ekin İH, İlhan Z, İlhan F. (2023) Investigation of selected bacterial agents causing sheep abortion in the Van Province by RT-PCR and histopathological methods. *Acta Veterinaria Brno*. 92, 1, 69-77.
- Hailat N, Shereen K, Mustafa A, Corrie B. (2018) Pathological, Immunohistochemical and Molecular Diagnosis of Abortions in Small Ruminants in Jordan with Reference to *Chlamydia abortus* and *Brucella melitensis*. *Pakistan Veterinary Journal*. 38, 01, 109-112.
- Hofmann M, Griot C, Chaigat V, Perler L, Thur B. (2008) Blue-tongue disease reaches Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*. <https://doi.org/10.1024/0036-7281.150.2.49>, 150, 2, 49-56.
- Kanat O. (2022) Molecular and histopathologic investigation of *Pestivirus*, *Chlamydia abortus* and *Listeria monocytogenes* infections in aborted sheep fetuses. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 73, 1, 3889-3896.
- Li L, Wu X, Liu F, Wang Z, Liu C, Wang Q, Bao J. (2016) Rapid detection of lineage IV peste des petits ruminants virus by real-time RT-PCR. *Journal of virological methods*. 235, 131-133.
- Livingstone M, Wheelhouse N, Ensor H, Rocchi M, Maley S, Aitchison K, Wattedegera S, Wilson K, Sait M, Siarkou V, Vretou E, Entrican G, Dagleish M, Longbottom D. (2017) Pathogenic outcome following experimental infection of sheep with *Chlamydia abortus* variant strains LLG and POS. *PLoS One*. 12, 5, e0177653.
- Longbottom D, Livingstone M, Maley S, Van Der Zon A, Rocchi M, Wilson K, Wheelhouse N, Dagleish M, Aitchison K, Wattedegera S, Nath M, Entrican G, Buxton D. (2013) Intranasal infection with *Chlamydia abortus* induces dose-dependent latency and abortion in sheep. *PLoS One*. 8, 2, e57950.
- Malal ME, Turkyilmaz S. (2021) Identification and genotyping of *Chlamydia abortus* with MLVA from ruminant abortions in the Marmara region of Türkiye. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 51, 1, 169-175.
- Maley SW, Livingstone M, Rodger SM, Longbottom D, Buxton D. (2009) Identification of *Chlamydia abortus* and the development of lesions in placental tissues of experimentally infected sheep. *Vet Microbiol*. 135, 1-2, 122-127.
- Muller N, Zimmermann V, Hentrich B, Gottstein B. (1996) Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*. 34, 11, 2850-2852.
- Pantchev A, Sting R, Bauerfeind R, Tyczka J, Sachse K. (2009) New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia abortus* from tissue samples. *Vet J*. 181, 2, 145-150.
- Ramo MD, LA, Benito AA, Quilez J, Monteagudo LV, Baselga C, Tejedor MT. (2022) *Coxiella burnetii* and Co-Infections with Other Major Pathogens Causing Abortion in Small Ruminant Flocks in the Iberian Peninsula. *Animals*. 12, 24, 3454.
- Sakmanoğlu A, Uslu A, Sayın Z, Golen GS, İlban A, Padron-Perez B, Karyeyen Y, Gök A, Tekindal MA, Erganis O. (2021) A one-year descriptive epidemiology of zoonotic abortifacient pathogen bacteria in farm animals in Türkiye. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 77, 101665.
- Şevik M, Gulcu Y, Dogan M. (2017a) Dual Infection of Sheep Aborted Foetus with *Peste des Petits Ruminants Virus* and *Brucella melitensis*. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 28, 2, 61-64.
- Şevik M, Gulcu Y, Dogan M. (2017b) Co-infection with *Border Disease Virus* and *Brucella melitensis* in an aborted sheep foetus. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 28, 2, 65-68.
- Van den Brom R, Lievaart-Peterson K, Lutikholt S, Peperkamp K, Wouda W, Vellema P. (2012) Abortion in small ruminants in the Netherlands between 2006 and 2011. *Tijdschrift voor diergeeneeskunde*. 137,7, 450-457.
- Vilček Š, Paton D. (2000) A RT-PCR assay for the rapid recognition of border disease virus. *Veterinary Research*. 31, 4, 437-445.
- Westermann T, Jenkins C, Onizawa E, Gestier S, McNally J, Kirkland P, Zhang J, Bogema D, Manning LK, Walker K, Pinczowski P. (2021) *Chlamydia pecorum*-Associated Sporadic Ovine Abortion. *Vet Pathol*. 58, 1, 114-122.
- Woah. (2022a) Brucellosis (infection with *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*). Date of access: 04.05.2023, Access address: [https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.04\\_BRUCELLOSIS.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELLOSIS.pdf)
- Woah. (2022b) Salmonellosis. Date of access: 04.05.2023, Access address: [https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.10.07\\_SALMONELLOSIS.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.10.07_SALMONELLOSIS.pdf)
- Wu Z, Sippy R, Sahin O, Plummer P, Vidal A, Newell D, Zhang Q. (2014) Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolates associated with sheep abortion in the United States and Great Britain. *Journal of clinical microbiology*. 52, 6, 1853-1861.
- Yeni DK. (2022) Molecular diagnosis of neglected infectious agents of sheep and cattle abortions: the prevalences of *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* and *Chlamydia abortus* at a glance. *Ankara Univ Vet Fak Derg*. 69, 425-430.
- Yeşilmen S, Yaman T, Sağsöz H, Bademkiran S. (2018) Diagnosis of Q fever and Brucellosis in aborted ovine fetuses by microbiological, pathological and immunohistochemical methods. *Acta Veterinaria-Beograd*. 68, 2, 168-177.



# Yarasa kaynaklı zoonotik viruslar

Müge Fırat<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Çankırı Karatekin Üniversitesi, Eldivan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Şabanözü Kampüsü,  
Laborant Veteriner Sağlık Programı, Çankırı, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 02.07.2023, Kabul Tarihi / Accepted: 05.07.2023

**Özet:** Yarasalar böcek popülasyonlarının dengelenmesi, bitkilerin tozlaşması ve tohumların yayılması gibi önemli ekolojik katkıları bulunan, çok farklı habitatlarda yaşayabilen ve rodentlerden sonra Memeliler sınıfının en fazla çeşitlilik gösteren takımıdır. Yarasalar vücut büyüklüklerine oranla oldukça uzun yaşamaları, uzak mesafelere uçabilme ve göç etme yetenekleri, tüneme, sosyal organizasyon, hibernasyon, termoregülasyon, ekolojasyon, torpor ve kuvvetli bağışıklık sistemi mekanizmaları sonucu zoonotik viral hastalıklar da dahil olmak üzere pek çok mikroorganizma için rezervuar konaktır. Virusların pek çoğunun doğal yaşam döngüsünde yer alan ve bünyelerinde zengin bir virus çeşitliliğine sahip olan yarasalardan insanlara virusların bulaşması, doğrudan veya yabani ve çiftlik hayvanları ara konaklığıyla olmaktadır. Yarasaların eskiden beri *Rhabdoviridae* ailesinden kuduz lyssavirüsü ve diğer kuduz-ilişkili lyssavirüsleri taşıdıkları bilgisine ek olarak, *Coronaviridae* ailesinden SARS-CoV ve MERS-CoV, *Filoviridae* ailesinden Ebola ve Marburg virusları ile *Paramyxoviridae* ailesinden Nipah ve Hendra virusları gibi önemli viral zoonoz etkenlerin de doğal taşıyıcıları oldukları tespit edilmiştir. Bu derlemede yarasaların diğer hayvan türleri ile karşılaştırıldığında tür başına daha yüksek oranda zoonotik virusları taşımalarına katkıda bulunan çeşitli faktörler ve önemli bazı yarasa kaynaklı zoonotik viral hastalıklar hakkında genel bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Yarasa, yarasa biyolojisi, yarasa kaynaklı viruslar, yarasa kaynaklı zoonotik viruslar, yarasa kaynaklı zoonotik viral hastalıklar.

## Bat-borne zoonotic viruses

**Abstract:** Bats are the most diverse order of Mammalia class after rodents, having important ecological contributions such as stabilization of insect populations, pollination of plants and dispersal of seeds, and can live in very different habitats. Bats are reservoir hosts for many microorganisms, including zoonotic viral diseases, as a result of their relatively long lifespan, ability to fly long distances and migrate, roost, social organization, hibernation, thermoregulation, echolocation, torpor, and strong immune system mechanisms. The transmission of viruses from bats which have a rich virus diversity in their body and most of them take place in their natural life cycle, to human occurs directly or through the intermediate host of wild and farm animals. In addition to the information that bats have been carrying Lyssavirus rabies and other rabies-related lyssaviruses from the *Rhabdoviridae* family, which has been known for a long time, it has been determined that they are also natural carriers of important viral zoonotic agents such as SARS-CoV and MERS-CoV from the *Coronaviridae* family, Ebola and Marburg viruses from the *Filoviridae* family and Nipah and Hendra viruses from the *Paramyxoviridae* family. In this review, it is aimed to give general information about various factors that contribute to the fact that bats carry a higher rate of zoonotic viruses per species compared to other animal species and some important bat-borne zoonotic viral diseases.

**Keywords:** Bat, bat biology, bat-borne viruses, bat-borne zoonotic viruses, bat-borne zoonotic viral diseases.

## Giriş

Yarasalar, Memeli (Mammalia) sınıfının Chiroptera takımı içinde yer almakta ve yaklaşık 1400 tür ile kemirgenlerden (Rodentia) sonra dünyada coğrafi olarak yaygın en önemli ve çeşitli canlı grubunu oluşturmaktadır (Wilson ve Reeder 2005; Calisher ve ark. 2006). Chiroptera adı Yunanca kökenli olup "el kanat" anlamına gelmektedir (Woo ve Lau 2019). Memeli sınıfı içinde gerçek uçuş özelliği gösteren tek grup olan yarasalar, kutuplar ve bazı izole ada-

lar hariç çok geniş coğrafi yayılım gösteren ve çok farklı ekosistemlerde yaşayabilme özelliğine sahip canlılardır (Kunz ve Fenton 2003). Beslenme açısından birçok yarasa türü böceklerle ve bazıları meyvelerle beslenirken, daha azı kan emicidir (Rodhain 2015). Ülkemizde şimdiye kadar biri meyve ve 38'i böceklerle beslenen toplam 39 yarasa türüne ait kayıt verilmiştir (Yorulmaz ve ark. 2018). İnsanların yaşam alanlarında ya da insana yakın alanlarda beslenme ve tüneme özellikleri gösteren yarasa türleri bulun-

makla birlikte, insanla doğrudan teması olan canlılar değillerdir (Kunz ve Fenton 2003). Yarasalar yaklaşık 52,5 milyon yıldır var olan canlılardır (Clyde ve ark. 2001) ve bu uzun sürecin doğal rezervuarları olarak yarasaları kullanan virüslere, yarasalar ile birlikte gelişme ve değişme olanağını sağlamış olduğu belirtilmektedir (Dobson 2005).

Yarasalar kuduz lyssavirusu ve kuduz-ilişkili lyssaviruslar hariç genellikle klinik belirti göstermeden virüslerin doğal rezervuarlığını yapmaktadırlar (Moratelli ve Calisher 2015). Viral enfeksiyonların çoğu yarasalarda asemptomatik seyretmektedir (Rodhain, 2015). Virüslerin yarasalardan uçamayan canlı türlerine bulaşması, dolaylı olarak yarasalardan fomitlere veya yüzeylere saçılan serbest virus parçacıkları ve virus yüklü aerosolize yarasa idrarı veya dışkısı yoluyla gerçekleşmektedir (Plowright ve ark. 2015). Kontamine olmuş habitatların duyarlı konaklar tarafından kullanılması yoluyla şekillenen çevresel bulaşma ya da dolaylı bulaşma, yaban hayatı hastalıklarının ana mekanizması olarak tarif edilmektedir (Fogarty ve ark. 2008; Piercy ve ark. 2010). Virüsler yeryüzünde hemen hemen tüm canlı türlerinde bulunmakla birlikte, yarasaların diğer hayvan türleri ile karşılaştırıldığında virüsler açısından daha fazla doğal rezervuar oldukları ve tür başına daha yüksek oranda zoonotik virüsleri taşıdıkları ve bu duruma katkıda bulunan çeşitli faktörler (Şekil1) bulunduğu belirtilmektedir (Luis ve ark. 2013, Olival ve ark. 2017). Bu faktörlerin başında, yarasaların aynı boyuttaki diğer memelilere kıyasla on kat daha yüksek olan son derece uzun bir yaşam süresine sahip olmaları gelmektedir (Salmon ve ark. 2009). Yarasaların uzun yaşam süresine sahip olmaları, rezervuar oldukları virüsler için sürdürülebilir persiste virus replikasyonu ve hayatta kalmaları için istikrarlı bir ortam sağlamaktadır. Ayrıca uzun hayat süresine sahip olmaları, birkaç nesil boyunca çoklu yatay ve dikey bulaşma yolu ile popülasyonda zaman içinde virüslerin devamlılığına olanak sağlamaktadır (Olival ve ark. 2017).

Yarasalar, uçma yeteneğine adapte olmuş tek memeli takımıdır ve bu sayede yiyecek arama veya göçleri esnasında uzun mesafeler boyunca hareket edebilmektedirler (Richter ve Cumming 2006). Yarasaların kanatlarında parmak benzeri uzun kemikler vardır ve bu nedenle kuşların kanatlarına göre daha fazla manevra kabiliyetine sahiptirler ancak kuşların aksine çok fazla kaldırma güçleri yoktur. Ayrıca geceleri aktif olmaları, kuşlarla doğrudan rekabetten kaçınmalarına yardımcı olmaktadır. Uçma yeteneği, yarasaları tohumların ve polenlerin olduğu gibi virüslerin yayılması için de önemli araçlar haline getirmektedir (Woo ve Lau 2019). Uzun mesafe uçuş

yeteneğine sahip olmalarından dolayı diğer hayvan türleri ile temaslarının artmasının da virüslerin geniş coğrafi bölgelere yayılması açısından türler arası virus bulaşma potansiyelini artırdığı belirtilmektedir (Wang ve ark. 2011). Ayrıca küresel ısınmanın da yarasa türlerinin coğrafik dağılımında ve hastalıkların yeni alanlara girmesi açısından değişikliklere sebep olacağı tahmin edilmektedir (Sherwin ve ark. 2013; Hayes ve Piaggio 2018).

Yarasaların tünek seçimleri yarasa türleri arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Mağaralar, yarıklar, yuvalar, ağaçlar ve diğer bitkiler gibi doğal oluşumlar yanında binalar ve menfezler gibi insan yapımı yapılarda da tünenebilmektedirler. Tünek seçimi türlere, mevsime ve yarasaların cinsiyetine göre değişiklik göstermektedir. Yarasalar dinlenme ve uyku esnasında çoğunlukla baş aşağı pozisyonunda bulunmaktadırlar. Yarasaların genellikle koloniler olarak bilinen yüzlerce ila binlerce bireyden oluşan gruplar halinde yaşamaları, virüslerin tür içi bulaşmasını kolaylaştırmaktadır. Yıl boyunca aynı mağarada tünene ve sürü halinde yaşayan yarasalarda çiftleşme veya tükrük, kan, dışkı ve idrar gibi vücut sıvıları yolu ile birbirine temas sebebiyle virüslerin aynı yarasa türü içinde veya türler arasında bulaşma oranı da yükselmektedir. Yarasaların insan yapımı yapıları kullanması sonucu ise, virüsle kontamine dışkıları yoluyla insanlarla temas ve insanların yarasa kaynaklı virüslere maruz kalma riski artmaktadır (Chege ve ark. 2015; Luis ve ark. 2015; Woo ve Lau 2019).

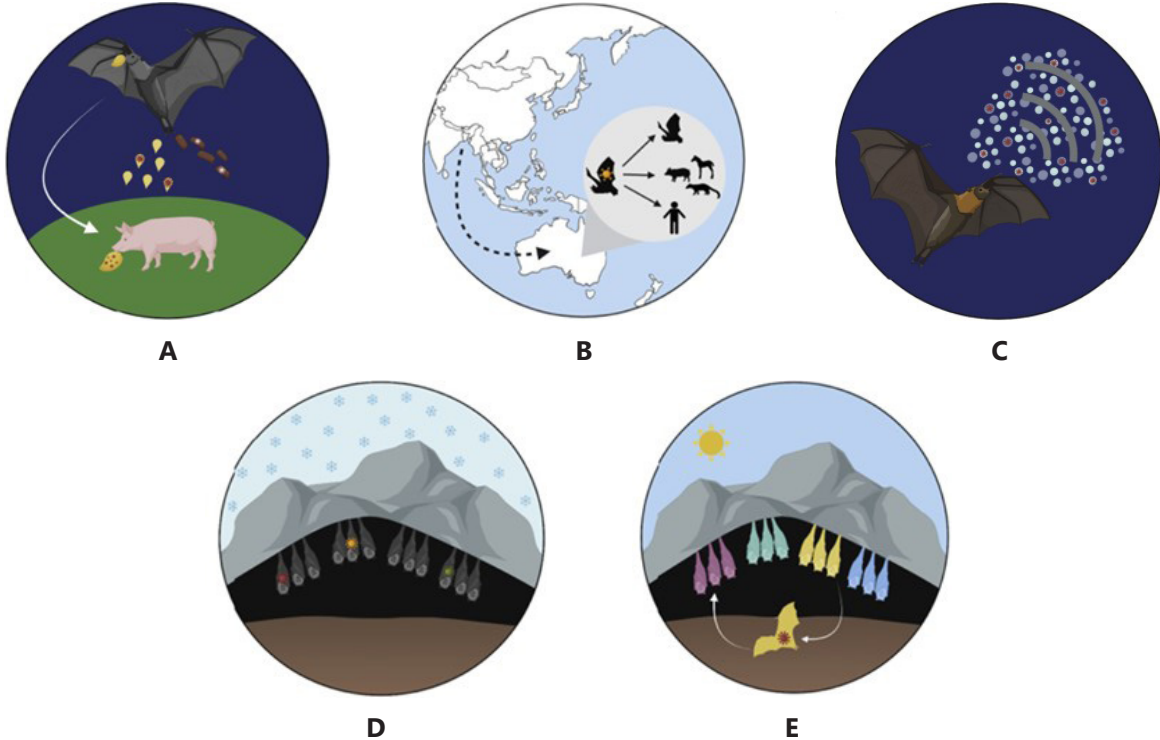
Yarasalar, diğer memelilere kıyasla benzer bağışıklık organları, dokuları, hücreleri ve immünoglobulin türlerine sahip olmakla beraber bazı benzersiz farklılıklarla hem doğuştan gelen bir bağışıklık hem de edinsel bağışıklık yanıtı göstermektedir (Schountz ve ark. 2017). Yarasa genom verilerinin, mitokondriyal DNA'nın hasar ve onarım yollarının evrimi ile zamanlaması örtüşen şekilde yarasalarda uçuş evrimini gösterdiği belirtilmektedir (Zhang ve ark. 2013; O'Shea ve ark. 2014). Bunun sonucunda diğer hiperaktif memelilere kıyasla daha yüksek metabolik hıza ve buna bağlı olarak daha yüksek vücut ısısına sahip oldukları bildirilmektedir. Yarasaların, yarasa kaynaklı virüsler için bir kontrol mekanizması olarak tipik immün aracılı ateşli tepkiye benzer şekilde yüksek vücut ısısına karşı daha toleranslı davranabilecekleri önerilmektedir (O'Shea ve ark. 2014). Filovirüsler için çelişkili bulgular olmakla birlikte, deneysel olarak kanıtlanmamış bu hipoteze göre yarasa kaynaklı virüslerin yüksek vücut ısısına karşı daha toleranslı olabileceği ve bu sebeple insanlar gibi doğal olmayan konakçılara bulaştıkları

zaman bu canlılarda çok daha virulent tablolar oluşturabilecekleri bildirilmiştir (Miller ve ark. 2016). Bazı çalışmalar, yarasalarda tip I interferon sisteminin sürekli olarak eksprese edilmesi sonucu viral replikasyonu kontrol eden ekstra bağışıklık genlerinin düzenlendiğini bildirmektedir (Zhou ve ark. 2016). Ayrıca, yarasalarda insanlar için bildirilmiş olan birleştirici immunglobulin segmentleri çeşitliliğinin beş kat daha fazla olduğu ve bu sayede birçok farklı antikor molekülünün ortaya çıkması ile yarasa virüs enfeksiyonlarına karşı daha güçlü tepkiler verdikleri belirtilmektedir (Schountz ve ark. 2017). Buna karşılık *Rousettus aegyptiacus* meyve yarasasının genom analizinin yapıldığı başka bir çalışmada, yarasa virüs ve diğer memelilerin antiviral mekanizmaları arasında çok önemli farklar olduğu ve yarasalarda viral enfeksiyonu kontrol etme yeteneğinin gelişmiş immün savunma yerine gelişmiş enfeksiyon toleransı ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Pavlovich ve ark. 2018). Bu hipotezi destekleyen başka bir çalışmanın sonuçlarına göre de; doğal yollardan Marburg virüs bulaşmış olan enfekte *R. aegyptiacus* yarasa virüslerinde uzamış bir inkubasyon süresi görüldüğü (Amman

ve ark. 2015; Schuh ve ark. 2017), enfekte yarasa virüsünün viremik kalarak virüsün tamamen temizlenmesinden önce üç haftaya kadar uzayan sürede virüs saçabildikleri ve uzayan enfeksiyona rağmen yüksek düzeyde enfekte dokularında bile sınırlı inflamasyon gösterdikleri belirtilmektedir (Towner ve ark. 2009; Jones ve ark. 2015).

Tüm yarasalarda görülmemekle birlikte bazılarında ekolokasyon yeteneği bulunduğu ve bu yarasa virüslerinin dillerini tıklatarak yüksek frekanslı ses dalgaları ürettikleri (Nowak ve ark. 1994), bu esnada hapşırma ile orofarengeal sıvı, mukus veya tükürük damlacıklarının dışarı saçılması sonucu virüslerin potansiyel yayılma mekanizmasına katkıda buldukları bildirilmektedir (Calisher ve ark. 2006). Ekolokasyon, yarasa virüslerinin karanlık yerlerde uçmasını da sağlayan bir özelliktir (Woo ve Lau 2019).

Hibernasyon ve torpor özelliği bulunan bazı yarasalarda ise azalan metabolik ve immünolojik aktiviteye bağlı olarak viral persistens ve bunu izleyen viral reaktivasyon tespit edildiği belirtilmektedir (Gerow ve ark. 2019).



**Şekil 1.** Yarasa virüsünün uçuş yeteneklerine bağlı olarak, bünyelerindeki virüsleri diğer canlı türlerine bulaştırabilmesini (A, B) ve uzak mesafelere taşıyabilmesini (B), ekolokasyon yeteneklerine bağlı olarak virus partiküllerini saçabilmesini (C), yıl boyunca farklı mevsimlerde (D, E) aynı mağarada yaşaması, hibernasyon ve torpor sonucu virüslerin aynı yarasa türü içinde veya türler arasında bulaşabilmesini gösteren illüstratif görseller (Gonzalez ve Banerjee 2022)

### Yarasa kaynaklı viruslar

Yarasaların 200'den fazla (Moratelli ve Calisher 2015; Letko ve ark. 2020) ve Baltimore sınıflandırma sistemine göre sınıflandırılmış olan her tür genomik yapıya ve replikasyon stratejisine sahip virusları bünyelerinde barındırdıkları bildirilmiştir (Hayman 2016). Bu virusların çoğunluğunu, daha yüksek genetik değişkenliğe sahip ve değişen çevresel koşullara uyum sağlamada daha yetenekli olan RNA'lı viruslar oluşturmaktadır (Hayman ve ark. 2013; Moratelli ve Calisher 2015). Yarasa virusları çoğu muhtemel konakçıya özgü asemptomatik, daha azı ise zoonotik potansiyele sahip viruslardır (Letko ve ark. 2020) İlerleyen süreçte yarasa kaynaklı viruslardan kaynaklanan hastalık salgınları ile daha fazla karşılaşılacağı öngörülmektedir (Wang ve Anderson 2019). İnsanların doğaya müdahalesi sonucu meydana gelen ekolojik değişiklikler ile yarasalar arasındaki etkileşimler hakkında daha iyi bilgi sahibi olunması için yarasa popülasyonlarının ve taşıdıkları virusların dikkatle takip edilmesi gerektiği, böylece yarasa kaynaklı viral hastalıkların ortaya çıkma mekanizmalarının anlaşılması, öngörülmesi ve belki de çıkışlarının önlenmesinin mümkün olabileceği belirtilmektedir (Rodhain 2015).

Baltimore sınıflandırma sistemine göre yarasalarda tespit edilmiş olan virus aileleri: Grup I çift iplikçikli DNA virus ailelerinden; *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Papillomaviridae*, *Polyomaviridae* ve *Poxviridae*, Grup II tek iplikçikli DNA virus ailelerinden; *Anelloviridae*, *Circoviridae* ve *Parvoviridae*, Grup III çift iplikçikli RNA virus ailelerinden; *Reoviridae*, Grup IV pozitif polariteli tek iplikçikli RNA virus ailelerinden *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Hepeviridae*, *Picornaviridae* ve *Togaviridae*, Grup V negatif polariteli tek iplikçikli RNA virus ailelerinden; *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae* ve *Rhabdoviridae*, Grup VI DNA aracılı replike olan tek iplikçikli RNA virus ailelerinden; *Retroviridae* ve Grup VII RNA aracılı replike olan çift iplikçikli DNA virus ailelerinden *Hepadnaviridae* olarak bildirilmiştir (Hayman 2016).

### Yarasa kaynaklı zoonotik viruslar

Yarasa viruslarının keşfi yarasalarda kuduz virusunun bulunmasıyla başlamıştır. Etken; RNA'lı viruslar olan *Mononegavirales* takımı, *Rhabdoviridae* ailesi, *Alpharhabdovirinae* alt ailesi, *Lyssavirus* cinsinde yer almaktadır Lyssaviruslar, kuduz virusu (RABV; *Lyssavirus rabies*) ve 16 adet kuduz-ilişkili lyssavirus türlerini kapsamaktadır. Lyssaviruslar, memelilerde tedavisi bulunmayan akut progresif ensefalomyelitle neden olmakta ve insanlar dahil duyarlı diğer

memeliler arasında doğrudan ısırıklar, çizikler veya enfekte tükrük ile mukoza zarlarının kontaminasyonu yoluyla bulaşmaktadır. Yarasalar çoğu kuduz-ilişkili lyssavirus için başlıca rezervuar konakçı iken, kuduz virusunun (RABV) doğada dolaşımı sadece etoburlar (Carnivora takımı) ve yarasalar tarafından sağlanmaktadır (Calisher 2015; Anonim 2023a). Yaklaşık iki bin yıldır kuduz hastalığının insanlara sadece kuduz köpeğin ısırmasıyla bulaştığı düşünülmekte iken yirminci yüzyılın başlarında köpek kuduzunun etkili yöntemlerle kontrol altına alınmasından sonra vahşi yaşam türlerinin, özellikle de etoburların kuduzun doğal vektörleri oldukları belirlenmiştir. On altıncı yüzyılda, Karayipler'deki ilk İspanyol kaşifler yaptıkları gözlemler sonucunda yarasaların kuduzla ilişkili ilk yaban hayatı türleri olduğunu keşfetmişlerdir (Greenhall 1993). On sekizinci yüzyılda kan emen yarasalar vampir yarasa olarak adlandırılmıştır ve bundan iki yüz yıl sonra da Trinidad ve Güney Amerika'da görülen *Desmodus rotundus* türü vampir yarasalarda kuduzun ilk bilimsel tanımlaması yapılmıştır (Pawan 1936). Yarasa ısırığı ile diğer canlılara yarasa viruslarının bulaşması sadece kuduz virusu için gösterilmiştir fakat kasıtlı bir temas oluşmadıkça yarasa türleri genellikle insanları ısırılmamaktadır (Joffrin ve ark. 2018). Kuduz virusunun ilk izolasyonu 1931'de yapılmıştır (Pawan 1936). Daha sonra, meyve yiyen yarasalar ve paralitık kuduz arasındaki bağlantı kurulmuştur (Pawan 1948). Bu çalışmalar, kuduz virusu ve yarasa ilişkisi araştırmalarını ileriye taşımıştır (Calisher 2015).

*Mononegavirales* takımında yer alan bir başka virus ailesi olan *Filoviridae* ailesinde bulunan Ebola virusu hastalığı etkeni *Orthoebolavirus* (6 tür) ve Marburg virusu hastalığı etkeni *Orthomarburgvirus* (1 tür) cinsleri, insanlarda ve primatlarda şiddetli ve çoğu zaman öldürücü hemorajik ateş ile seyreden hastalıklardan sorumlu olan viruslardır (Olival ve Hayman 2014; Anonim 2023b). Marburg virusu hastalığı yüksek derecede virulent ve %88'e varan ölüm oranıyla oldukça öldürücü bir hastalıktır. 1967'de Almanya'da Marburg ve Frankfurt'ta, Sırbistan'da ise Belgrad'da aynı anda meydana gelen iki büyük salgın, hastalığın ilk kez tanınmasına neden olmuş ve salgın laboratuvar çalışmasında kullanılan Uganda'dan ithal edilmiş Afrika yeşil maymunları ile ilişkilendirilmiştir (Anonim 2023c). Marburg virusu ile enfekte olan birçok insanın hasta olmadan önce *Rousettus aegyptiacus* türü meyve yarasalarının mağaralarına girdikleri ve yarasalar veya onların sekresyonları ile düzenli temasta oldukları bildirilmiştir (Adjemian ve ark. 2011). 1976 yılında Kuzey Demokratik Kongo Cumhuriyeti'nde, benzer özellik-

ler gösteren fakat immünolojik olarak farklılık sergileyen Ebola virusu bildirilmiştir (Beer ve ark. 1999). Meyve ve böceklerle beslenen yarasalar türleri Marburg virusu ve Ebola virusu için doğal konaklardır. Bu viruslar, çoğunlukla virus taşıyan insanların kan ve dışkı gibi vücut sıvıları ve ölü yarasalar ile temas sonucu insanlara geçmektedir. Ayrıca hastalık taşıyan maymunlardan da insanlara geçiş olabilmektedir. Epidemiler ise genellikle insandan insana virus bulaşması ile şekillenmektedir (Olival ve Hayman 2014; Leendertz ve ark. 2016). Ebola hastalığında ilk olarak aniden yükselen ateş, yorgunluk, kas ağrısı, baş ağrısı ve boğaz ağrısı görülmekte ve daha sonra kusma, ishal, döküntü, iç ve dış kanamalar klinik tabloya katılmaktadır (Anonim 2023d). Yarasaların avlanılması ve protein kaynağı olarak tüketilmesi özellikle Ebola virus için potansiyel enfeksiyon kaynağı olarak işaret edilmiştir. 1976 yılındaki ilk olası insan vakasının, avcılardan alınan taze yarasalar etinin tüketimi sonucu olduğu bildirilmiştir (Leroy ve ark. 2009).

*Mononegavirales* takımında yer alan diğer bir virus ailesi olan *Paramyxoviridae* ailesi de *Henipavirus* cinsinde yer alan Nipah virusu (*Henipavirus nipahense*) ve Hendra virusu (*Henipavirus hendraense*) da insanlarda ciddi ve potansiyel olarak ölümcül hastalıklara neden olmaktadır. Pteropus cinsi yarasalar, Nipah ve Hendra viruslarının genel rezervuar konakları olarak tanımlanmıştır (Clayton ve ark. 2013; Anonim 2023b). İlk olarak 1998'de Malezya'da ortaya çıkmış olan Nipah virusu domuzlarda solunum yolu hastalıklarına ve ensefalit salgınına neden olmuştur. Şiddetli ateşli ensefalit ile ilişkili Nipah virusunun, meyve ağaçları bulunan ticari domuz çiftliklerinde, bu meyvelerle beslenen yarasaların virusu meyvelere bulaştırması ve bu meyvelerin domuz ağıllarına düşerek domuzlar tarafından tüketilmesi ile domuzlarda enfeksiyon oluşturduğu, domuzlar aracılığı ile de virusun enfekte hayvanlarla yakın temas halindeki insanlara bulaştığı belirlenmiştir (Pulliam ve ark. 2012). Bangladeş'teki ve Hindistan'daki diğer iki salgında ise bir ara konakçı hayvan tanımlanmamıştır. Bulaşmanın meyve yarasalarının tükürüğü ve idrarı ile kontamine olmuş hurma ağacı meyvelerinin tüketilmesi ile yarasadan insana ve insandan insana olduğu düşünülmektedir (Clayton ve ark. 2013; Luby ve ark. 2006). Hendra virusu ise insanlar ve atlarda ölümcül solunum yolu hastalığına neden olmaktadır (Plowright ve ark. 2011). Avustralya'da görülmüş olan salgınlarda atlar ara konaktır ve virus büyük olasılıkla enfekte yarasalar idrarı, tükürüğü ve dışkısı ile kontamine yem, mera veya su alımı yoluyla atlara bulaşmaktadır. Atlardan insanlara, hasta hayvanlarla yakın temas olması durumunda bulaşma meydana

gelmektedir. Bugüne kadar, insandan insana bulaşma bildirilmemiştir (Clayton ve ark. 2013).

Koronaviruslar (CoV), hayvanlarda veya insanlarda solunum, sindirim ve sinir sistemlerinde ve karaciğerde hastalığa neden olabilen büyük bir virus grubudur (Decaro ve Buonavoglia 2008). RNA genomuna sahip CoV'lar; *Nidovirales* takımı, *Cornidovirinae* alt takımı içinde bulunan *Coronaviridae* ailesi, *Orthocoronavirinae* alt ailesinde yer almaktadır. CoV'lar filogenetik olarak Alpha, Beta, Delta ve Gamma olmak üzere dört cinse ayrılmaktadır (Anonim 2023b). Bilinen yedi insan CoV'undan HCoV-229E ve HCoV-NL63 Alpha-CoV cinsinde, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2 ise Beta-CoV cinsinde yer almaktadır. Yarasalardan, insanlardan, kuşlardan ve diğer omurgalı canlılardan elde edilmiş tamamlanmış CoV genom dizilerinin filogenetik analizleri, yarasaların bütün CoV dallarının köken aldığı rezervuar konaklar olabileceğini göstermiştir (Vijaykrishna ve ark. 2007; Woo ve ark. 2009). Koronavirüsler türler arası bulaşmada yüksek bir potansiyele sahiptir ve mutasyona duyarlı genetik yapıları sebebiyle kolayca yeni alt tipleri ortaya çıkmakta, yeni ortaya çıkan CoV'lar da türler arası geçiş yaparak hayvanlardan insanlara bulaşmakta ve yayılmaktadır (Decaro ve Buonavoglia 2008). Yirmi birinci yüzyılda ortaya çıkan ve insanlarda beklenmedik salgınlara neden olan SARS-CoV ve MERS-CoV'un yarasalardan köken aldıkları tespit edilmiştir (Hu ve ark. 2015). Şubat 2003'te Çin'de tanımlanmış olan SARS-CoV, 4 ay içinde 27 farklı ülkede tespit edilmiştir (Weinstein 2004). SARS-CoV olgusunda, Nalburunlu yarasalar arasında sirküle olan virusla enfekte misk kedilerinin virusun çoğaldığı ara konak olabilecekleri bildirilmiştir (Hu ve ark. 2017). Çin'de bulunan çeşitli Rhinolophidae ailesindeki yarasaların genetik olarak çeşitli SARS-benzeri-CoV'ları barındırdıkları ve hücreye giriş için SARS-CoV ile aynı reseptörü kullanabildikleri tespit edilmiştir (Ge ve ark. 2013). İlk olarak 2012 yılında Arap Yarımadası'nda bildirilen MERS ise günümüze kadar 27 ülkede görülmüştür (Chafekar ve Fielding 2018). Dünya çapında pek çok yarasalar türünde bazıları MERS-CoV ile filogenetik olarak aynı, bazıları da benzer çeşitli koronavirüsler keşfedilmiştir (Yang ve ark. 2014). Ara konakların yarasalardan insanlara koronavirüslerin iletilmesinde ve ortaya çıkmasında önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır (Hu ve ark. 2015). MERS-CoV salgınında olduğu gibi, virusların insanlara bulaşmadan önce çiftlik hayvanları arasında uzun süre belirti vermeden sirkülasyonu mümkün olabilmektedir. MERS-benzeri-CoV'ların, virusun insanlarda tespitinden önce rezervuar konak olarak

çöl develerinde 30 yıldan daha uzun bir süre sirküle olmuş olabileceği belirtilmiştir (Müller ve ark. 2014). Lama ve yaban domuzu gibi diğer hayvanların da MERS-CoV enfeksiyonuna duyarlı olması MERS-CoV için daha geniş bir konak spektrumunu akla getirmektedir (Joffrin ve ark. 2018). Yarasalarda ayrıca, insan HCoV-229E ve HCoV-NL63 ile genetik olarak ilişkili olan koronavirüsler da bulunmuştur (Hu ve ark. 2015).

Yarasa ilişkili DNA'lı virüslere *Herpesviridae* ve *Adenoviridae* ailelerine dahil türler örnek olarak gösterilebilir. Yarasa herpesvirüsleri zoonotik özellikte olmamasına rağmen Myotis yarasa hücre hattından izole edilen bir gammaherpesvirüsün insan kökenli hücre hatlarında üreme gösterdiği bildirilmiştir (Shabman ve ark. 2016). Yarasa adenovirüslerinin ise kurumuş dışkı materyalinden aerosol yolla potansiyel olarak bulaşabildiği belirtilmiş olmakla birlikte, insanlar için potansiyel zoonotik riski düşük görülmektedir (Benkő ve ark. 2014).

## Sonuç

Özellikle geçtiğimiz yüzyıl boyunca sanayileşmede yaşanan hızlı gelişmeler ile birlikte dünyadaki insan nüfusunun hızla artması, beslenme ve barınma konusundaki ihtiyaçları beraberinde getirmiş ve gün geçtikçe de daha çok getirmektedir. Buna bağlı olarak kentleşme, yoğun tarım uygulamaları, ormanların tahribatı, eskiden girilmeyen yaban hayat bölgelerine giriş, yaban hayvanları ile temasın artması ve iklim değişikliği gibi çeşitli faktörler nedeniyle bilinen ve bilinmeyen patojenlerin türler arasında bulaşma riski, insan ve hayvan popülasyonları için hastalıklar açısından tehdit haline gelmiştir. Bu durum zoonotik hastalıkların sayısında ve görülme sıklığında da artışa sebep olmuştur. Küreselleşen ulaşım ile birlikte dünyada birbirinden uzak coğrafyalar arasında yer değiştirmenin kolaylaşması da hastalıkların kısa sürede farklı kıtalar ve ülkeler arasında yayılmasını kolaylaştıran ve salgınların hatta pandemilerin görülme olasılığını artıran bir diğer faktördür. Bu faktörlerin sonucu olarak çok eski zamanlardan beri çoğu zoonotik hastalığın etkeni olarak önemini korumakta olan ve halk sağlığı açısından yüksek düzeyde önem arz eden viral hastalıklara da gün geçtikçe yenileri eklenmiş ve eklenmektedir. Diğer memeli takımlarına ait olan virüslere göre daha büyük bir virus çeşitliliğine sahip olan yarasalar ise hem sebep oldukları hem de gelecekte sebep olabilecekleri çeşitli viral zoonotik hastalıklar açısından Tek Sağlık yaklaşımı çerçevesinde global olarak çok farklı meslek grupları tarafından yoğun olarak araştırılmaktadır.

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

## Kaynaklar

- Adjemian J, Farnon EC, Tschioke F, Wamala JF, Byaruhanga E, Bwire GS, Kansiime E, Kagirita A, Ahimbisibwe S, Katunguka F, Jeffs B, Lutwama JJ, Downing R, Tappero JW, Formenty P, Amman B, Manning C, Towner J, Nichol ST, Rollin PE. (2011) Outbreak of Marburg hemorrhagic fever among miners in Kamwenge and Ibanda districts, Uganda, 2007. *J. Infect. Dis.* 204, 796-799.
- Amman BR, Jones ME, Sealy TK, Uebelhoer LS, Schuh AJ, Bird BH, Coleman-McCray JD, Martin BE, Nichol ST, Towner JS. (2015) Oral shedding of Marburg virus in experimentally infected Egyptian fruit bats (*Rousettus aegyptiacus*). *J. Wildl. Dis.* 51(1), 113-124.
- Anonim. (2023a) Subfamily: *Alpharhabdovirinae* Genus: *Lyssavirus*. Erişim adresi: <https://ictv.global/report/chapter/rhabdoviridae/rhabdoviridae/lyssavirus>, Erişim tarihi: 24.06.2023.
- Anonim. (2023b) Current ICTV Taxonomy Release. Erişim adresi: <https://ictv.global/taxonomy>, Erişim tarihi: 24.06.2023.
- Anonim. (2023c) Marburg virus disease. Erişim adresi: [https://www.who.int/health-topics/marburg-virus-disease#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/marburg-virus-disease#tab=tab_1), Erişim tarihi: 24.06.2023.
- Anonim. (2023d) Ebola virus disease. Erişim adresi: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ebola-virus-disease?gclid=Cj0KCQjwnf-kBhCnARIsAFIq493Vnw1A6CScGPZe-42c5w8Cwn-5p-ugK8V3CpNX7Kii1L9eljWdlimgaAvdmEALw\\_wcB](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ebola-virus-disease?gclid=Cj0KCQjwnf-kBhCnARIsAFIq493Vnw1A6CScGPZe-42c5w8Cwn-5p-ugK8V3CpNX7Kii1L9eljWdlimgaAvdmEALw_wcB), Erişim tarihi: 24.06.2023.
- Ber B, Kurth R, Bukreyev A. (1999) Characteristics of Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. *Naturwissenschaften.* 86(1), 8-17.
- Benkő M, Harrach B, Kremer EJ. (2014) Do nonhuman primate or bat adenoviruses pose a risk for human health?. *Future Microbiol.* 9(3), 269-272.
- Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. (2006) Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev.* 19(3), 531-545.
- Calisher C.H. (2015) Viruses In Bats: A Historic Review. Wang LF, Cowled C. eds. *Bats and Viruses A New Frontier of Emerging Infectious Diseases*. John Wiley & Sons, Canada.
- Chafekar A, Fielding BC. (2018) MERS-CoV: Understanding the Latest Human Coronavirus Threat. *Viruses.* 10(2), 93.
- Chege HN, Schepers C, Wolfaardt GJJ. (2015) Documenting the bat species assemblages of the Meletse Bat Research and Conservation Training Centre in Limpopo Province, Thabazimbi. *South Africa African Bat Conserv News.* 38, 5-8.
- Clayton BA, Wang LF, Marsh GA. (2013) Henipaviruses: an updated review focusing on the pteropid reservoir and features of transmission. *Zoonoses Public Health.* 60(1), 69-83.
- Clyde WC, Koch SN, Gunnell PL, Bartels GFWS. (2001) Linking the Wasatchian/Bridgerian boundary to the Cenozoic Global Climate Optimum: new magnetostratigraphic and isotopic results from South Pass, Wyoming. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol.* 167(1-2), 175-199.
- Decaro N, Buonavoglia C. (2008) An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. *Vet Microbiol.* 132(3-4), 221-234.
- Dobson AP. (2005) What links bats to emerging infectious diseases?. *Science.* 310(5748), 628-629.

- Fogarty R, Halpin K, Hyatt AD, Daszak P, Mungall BA. (2008) Heparin susceptibility to environmental variables. *Virus Res.* 132(1-2), 140-144.
- Ge XY, Li JL, Yang XL, Chmura AA, Zhu G, Epstein JH, Mazet JK, Hu B, Zhang W, Peng C, Zhang YJ, Luo CM, Tan B, Wang N, Zhu Y, Cramer G, Zhang SY, Wang LF, Daszak P, Shi ZL. (2013) Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature.* 503(7477), 535-538.
- Gerow CM, Rapin N, Voordouw MJ, Elliot M, Misra V, Subudhi S. (2019) Arousal from hibernation and reactivation of Eptesicus fuscus gammaherpesvirus (EfHV) in big brown bats. *Transbound Emerg Dis.* 66, 1054-1062.
- Gonzalez V, Banerjee A. (2022) Molecular, ecological, and behavioral drivers of the bat-virus relationship. *iScience.* 25(8), 104779.
- Greenhall AM. (1993) Ecology and bionomics of vampire bats in Latin America. Greenhall AM, Artois M, Fekadu M. eds. Bats and Rabies. Fondation Marcel Mérieux, Lyon.
- Hayes MA, Piaggio AJ. (2018) Assessing the potential impacts of a changing climate on the distribution of a rabies virus vector. *PLoS One.* 13, e0192887.
- Hayman DT, Bowen RA, Cryan PM, McCracken GF, O'Shea TJ, Peel AJ, Gilbert A, Webb CT, Wood JLN. (2013) Ecology of zoonotic infectious diseases in bats: current knowledge and future directions. *Zoonoses Public Hlth.* 60(1), 2-21.
- Hayman DT. (2016) Bats as viral reservoirs. *Annu Rev Virol.* 3(1), 77-99.
- Hu B, Ge X, Wang LF, Shi Z. (2015) Bat origin of human coronaviruses. *Virol J.* 12(1), 221.
- Hu B, Zeng L, Yang X, Ge X, Zhang W, Li B, Xie JZ, Shen XR, Zhang YZ, Wang N, Luo DS, Zheng X, Wang M, Daszak P, Wang L, Cui J, Shi Z. (2017) Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathog.* 13(11), e1006698.
- Joffrin L, Dietrich M, Mavingui P, Lebarbenchon C. (2018) Bat pathogens hit the road: But which one?. *PLoS Pathog.* 14(8), e1007134.
- Jones ME, Schuh AJ, Amman BR, Sealy TK, Zaki SR, Nichol S, Towner JS. (2015) Experimental inoculation of Egyptian Rousette bats (*Rousettus aegyptiacus*) with viruses of the Ebolavirus and Marburgvirus Genera. *Viruses.* 7, 3420-3442.
- Kunz T, Fenton, MB, eds. (2003) Bat Ecology. Bibliovault OAI Repository: the University of Chicago Press.
- Leendertz SA, Gogarten JF, Dux A, Calvignac-Spencer S, Leendertz FH. (2016) Assessing the evidence supporting fruit bats as the primary reservoirs for Ebola viruses. *Ecohealth.* 13(1), 18-25.
- Leroy EM, Rouquet P, Formenty P, Souquière S, Kilbourne A, Froment JM, Bermejo M, Smit S, Karesh W, Swanepoel R, Zaki SR, Rollin PE. (2004) Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife. *Science.* 303(5656), 387-390.
- Letko M, Seifert SN, Olival KJ, Plowright RK, Munster VJ. (2020) Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. *Nat Rev Microbiol.* 18(8), 461-471.
- Luby S, Rahman M, Hossain M, Blum L, Husain M, Gurley E, Khan R, Ahmed BN, Rahman, S, Nahar N, Kenah E, Comer JA, Ksiazek TG. (2006) Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. *Emerging Infect Dis.* 12(12), 1888-1894.
- Luis AD, Hayman DT, O'Shea TJ, Cryan PM, Gilbert AT, Pulliam JR, Mills JN, Timonin ME, Willis CK, Cunningham AA, Fooks AR, Rupprecht CE, Wood JLN, Webb CT. (2013) A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc R Soc B: Biol Sci.* 280(1756), 20122753.
- Luis AD, O'Shea TJ, Hayman DTS, Wood JLN, Cunningham AA, Gilbert AT, Mills JN, Webb CT. (2015) Network analysis of host-virus communities in bats and rodents reveals determinants of cross-species transmission. *Ecol Lett.* 18, 1153-1162.
- Miller MR, McMinn RJ, Misra V, Schountz T, Müller MA, Kurth A, Munster VJ. (2016) Broad and temperature independent replication potential of Filoviruses on cells derived from old and new world bat species. *J Infect Dis.* 214, S297-S302.
- Moratelli R, Calisher CH. (2015) Bats and zoonotic viruses: Can we confidently link bats with emerging deadly viruses?. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 110(1), 1-22.
- Müller MA, Corman VM, Jores J, Meyer B, Younan M, Liljander A, Bosch BJ, Lattwein E, Hilali M, Musa BE, Bornstein S, Drosten C. (2014) MERS Coronavirus neutralizing antibodies in camels, Eastern Africa, 1983-1997. *Emerging Infect Dis.* 20(12), 2093-2095.
- Nowak RM, Walker EP, Kunz TH, Pierson ED, eds. (1994) Walker's Bats of the World. Baltimore: JHU Press.
- Olival KJ, Hayman DT. (2014) Filoviruses in bats: current knowledge and future directions. *Viruses.* 6(4), 1759-1788.
- Olival KJ, Hosseini PR, Zambrana-Torrelío C, Ross N, Bogich TL, Daszak P. (2017) Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature.* 546(7660), 646-650.
- O'Shea TJ, Cryan PM, Cunningham AA, Fooks AR, Hayman DTSS, Luis AD, Peel AJ,
- Plowright RK, Wood, JLN. (2014) Bat flight and zoonotic viruses. *Emerg Infect Dis.* 20, 741-745.
- Pawan JL. (1936) The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bat (*Desmodus rotundus murinus* Wagner, 1840). *Ann trop med parasitol.* 30(1), 101-130.
- Pawan JL. (1948) Fruit-eating bats and paralytic rabies in Trinidad. *Ann. trop. med. parasitol.* 42(2), 173-177.
- Pavlovich SS, Lovett SP, Koroleva G, Guito JC, Arnold, CE, Nagle ER, Kulcsar K, Lee A, Thibaud-Nissen F, Hume AJ, Mühlberger E, Uebelhoer LS, Towner JS, Rabadan R, Sanchez-Lockhart M, Kepler TB, Palacios G. (2018) The Egyptian rousette genome reveals unexpected features of bat antiviral immunity. *Cell.* 173, 1-13.
- Piercy TJ, Smither SJ, Steward JA, Eastaugh L, Lever MS. (2010) The survival of filoviruses in liquids, on solid substrates and in a dynamic aerosol. *J Appl Microbiol.* 109(5), 1531-1539.
- Plowright RK, Foley P, Field HE, Dobson AP, Foley JE, Eby P, Daszak P. (2011) Urban habituation, ecological connectivity and epidemic dampening: the emergence of Hendra virus from flying foxes (*Pteropus* spp.). *Proc R Soc B: Biol Sci.* 278(1725), 3703-3712.
- Plowright RK, Eby P, Hudson PJ, Smith IL, Westcott D, Bryden WL, Middleton D, Reid PA, McFarlane RA, Martin G, Tabor GM, Skerratt LF, Anderson DL, Cramer G, Quammen D, Jordan D, Freeman P, Wang LF, Epstein JH, Marsh GA, Kung NY, McCallum H. (2015) Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proc R Soc B: Biol Sci.* 282(1798), 20142124.
- Pulliam JRC, Epstein JH, Dushoff J, Rahman SA, Bunning M, Jamaluddin AA, Hyatt AD, Field HE, Dobson AP, Daszak P. (2012) Agricultural intensification, priming for persistence and the emergence of Nipah virus: a lethal bat-borne zoonosis. *J R Soc Interface.* 9(66), 89-101.
- Richter HV, Cumming GS. (2006) Food availability and annual migration of the straw-colored fruit bat (*Eidolon helvum*). *J Zool.* 268, 35-44.
- Rodhain F. (2015) Bats and Viruses: complex relationships. *Bull Soc Pathol Exot.* 108(4), 272-289.



- Salmon AB, Leonard S, Masamsetti V, Pierce A, Podlutzky AJ, Podlutzkaya N, Richardson A, Austad SN, Chaudhuri AR. (2009) The long lifespan of two bat species is correlated with resistance to protein oxidation and enhanced protein homeostasis. *FASEB J.* 23, 2317-2326.
- Schountz T, Baker ML, Butler J, Munster V. (2017) Immunological control of viral infections in bats and the emergence of viruses highly pathogenic to humans. *Front Immunol.* 8, 1098.
- Schuh AJ, Amman BR, Sealy TK, Spengler JR, Nichol ST, Towner JS. (2017) Egyptian rousette bats maintain long-term protective immunity against Marburg virus infection despite diminished antibody levels. *Sci Rep.* 7(1), 8763.
- Shabman RS, Shrivastava S, Tsibane T, Attie O, Jayaprakash A, Mire CE, Dilley KE, Puri V, Stockwell TB, Geisbert TW, Sachidanandam R, Basler CF (2016) Isolation and characterization of a novel Gammaherpesvirus from a microbat cell line. *mSphere.* 1(1), e00070-15.
- Sherwin HA, Montgomery WI, Lundy MG. (2013) The impact and implications of climate change for bats. *Mamm. Rev.* 43, 171-182.
- Towner JS, Amman BR, Sealy TK, Reeder Carroll SA, Comer JA, Kemp A, Swanepoel R, Paddock CD, Balinandi S, Khristova ML, Formenty PBH, Albarino CG, Miller DM, Reed ZD, Kayiwa JT, Mills JN, Cannon DL, Greer PW, Byaruhanga E, Farnon EC, Atimnedi P, Okware S, Katongole-Mbidde E, Downing R, Tappero JW, Zaki SR, Ksiazek TG, Nichol ST, Rollin PE. (2009) Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats. *PLoS Pathog.* 5, 1-9.
- Vijaykrishna D, Smith GJ, Zhang JX, Peiris JS, Chen H, Guan Y. (2007) Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses. *J Virol.* 81(8), 4012-4020.
- Wang LF, Walker PJ, Poon LLM. (2011) Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: Are bats "special" as reservoirs for emerging viruses?. *Curr Opin Virol.* 1, 649-657.
- Wang LF, Anderson DE. (2019) Viruses in bats and potential spillover to animals and humans. *Curr Opin Virol.* 34, 79-89.
- Weinstein RA. (2004) Planning for epidemics-the lessons of SARS. *N Engl J Med.* 350(3), 2332-2334.
- Wilson DE, Reeder DAM, eds. (2005) Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. Baltimore: JHU Press, Volume 2.
- Woo PC, Lau SK, Huang Y, Yuen KY. (2009) Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med.* 234(10), 1117-1127.
- Woo PCY, Lau SKP. (2019) Viruses and Bats. *Viruses.* 11(10), 884. <https://doi.org/10.3390/v11100884>.
- Yang L, Wu Z, Ren X, Yang F, Zhang J, He G, Dong J, Sun L, Zhu Y, Zhang S, Jin Q. (2014) MERS-related betacoronavirus in *Vespertilio superans* bats, China. *Emerging Infect Dis.* 20(7), 1260-1262.
- Zhang G, Cowled C, Shi Z, Huang Z, Bishop-Lilly KA, Fang X, Wynne JW, Xiong Z, Baker ML, Zhao W, Tachedjian M, Zhu Y, Zhou P, Jiang X, Ng J, Yang L, Wu L, Xiao J, Feng Y, Chen Y, Sun X, Zhang Y, Marsh GA, Cramer G, Broder CC, Frey KG, Wang LF, Wang J. (2013) Comparative analysis of bat genomes. *Science.* 339, 456-460.
- Zhou P, Tachedjian M, Wynne JW, Boyd V, Cui J, Smith I, Cowled C, Ng JHJ, Mok L, Michalski WP, Mendenhall IH, Tachedjian G, Wang LF, Baker ML. (2016) Contraction of the type I IFN locus and unusual constitutive expression of IFN- $\alpha$  in bats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 113, 2696-2701.