

e- ISSN : 2757-5179



Bozok Veterinary Sciences



Volume 5

Issue 2

December

2024

**ON BEHALF ON YOZGAT BOZOK UNIVERSITY FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
OWNER**

Prof. Dr. Evren YAŞAR, Rektör

EDITOR-IN-CHIEF (BAŞ EDİTÖR)

Dr. Zafer GÖNÜLALAN, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ

ISSUE EDITORS (SAYI EDİTÖRLERİ)

Dr. Zafer GÖNÜLALAN, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ

Dr. Serkan KÖKKAYA, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi- YOZGAT

ASSISTANT EDITORS (EDİTÖR YARDIMCILARI)

Dr. Elmas ULUTAŞ, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Dr. Güvenç GÖKALP, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Dr. Seçil SEVİNÇ TEMİZKAN, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi- YOZGAT

Dr. Sema ÇAKIR BAYRAK, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

BASIC SCIENCE EDITORS (TEMEL BİLİM EDİTÖRLERİ)

Dr. Elmas ULUTAŞ, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

**PRECLINICAL SCIENCES- FOOD HYGIENE AND TECHNOLOGY EDITORS
(KLİNİK ÖNCESİ BİLİMLERİ- GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ EDİTÖRLERİ)**

Dr. Seçil SEVİNÇ TEMİZKAN, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Dr. İmran GARİP, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

CLINICAL SCIENCES EDITORS (KLİNİK BİLİMLERİ EDİTÖRLERİ)

Dr. Sema ÇAKIR BAYRAK, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

**ZOOTECHNICS- ANIMAL NUTRITION AND NUTRITION DISEASES EDITORS
(ZOOTEKNİ- HAYVAN BESLEME VE BESLEME HASTALIKLARI EDİTÖRLERİ)**

Dr. Tünay KARAN, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

ENGLISH ADVISER (İNGİLİZCE DANIŞMANI)

Dr. Mehmet Ertuğ YAVUZ, Yozgat Bozok Üniversitesi Yabancı Diller Yüksekokulu-YOZGAT

STATISTICS ADVISER (İSTATİSTİK DANIŞMANI)

Araş. Gör. Güven GÜNGÖR, Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi-BİNGÖL

TYPESETTER AND DESIGN (DİZGİ VE TASARIM)

Araş. Gör. Serkan KÖKKAYA, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Araş. Gör. Nevzat Emre ASLAN, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

WEB DESIGN (WEB TASARIMI)

Dr. Güvenç GÖKALP, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Araş. Gör. Emre SAYAR, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

BROADCAST BOARD (YAYIN KURULU)

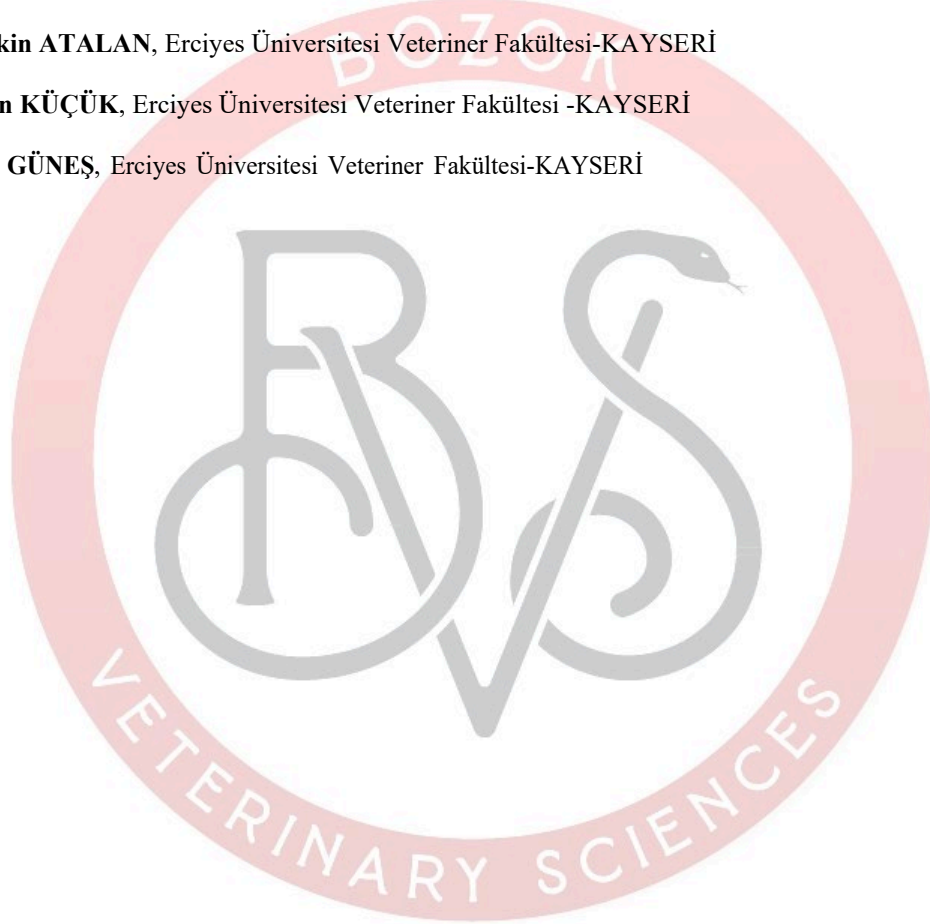
Dr. İsmail Hakkı NUR, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ

Dr. Çağrı Çağlar SİNMEZ, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ

Dr. Gültekin ATALAN, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ

Dr. Osman KÜÇÜK, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi -KAYSERİ

Dr. Vehbi GÜNEŞ, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ



NATIONAL ADVISORY BOARD (ULUSAL DANIŞMA KURULU)

- Dr. Ali Cesur ONMAZ**, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ
- Dr. Alper SEVİMLİ**, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi-AFYONKARAHİSAR
- Dr. Emin ŞENGÜL**, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi-ERZURUM
- Dr. Enver YAZAR**, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KONYA
- Dr. Didem PEKMEZCİ**, Ondokuzmayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi-SAMSUN
- Dr. Güner KÜÇÜKBAYRAM**, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ
- Dr. Kürşat ALTAY**, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi-SİVAS
- Dr. Mehmet ELMALI**, Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi- HATAY
- Dr. Muammer ELMAS**, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi- KONYA
- Dr. Mustafa Sinan AKTAŞ**, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi-ERZURUM
- Dr. Mustafa ARICAN**, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KONYA
- Dr. Mustafa İSSİ**, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi- ELAZIĞ
- Dr. Ramazan ERENLER**, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi-TOKAT
- Dr. Selim KUL**, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi, YOZGAT
- Dr. Serkan YILDIRIM**, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi-ERZURUM
- Dr. Sevgi DURNA DAŞTAN**, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi-SİVAS
- Dr. Sinan VICIL**, Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi-TEKİRDAĞ
- Dr. Siyami KARAHAN**, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KIRIKKALE
- Dr. Suat ERDOĞAN**, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi-EDİRNE

INTERNATIONAL ADVISORY BOARD (ULUSLARARASI DANIŞMA KURULU) ,

- Dr. Askarbek TULEBAYEV**, Manas University, Faculty of Veterinary Medicine-KYRGYZSTAN
- Dr. Atiqur RAHMAN**, Jamia Millia Islamia University, Faculty of Natural Sciences-INDIA
- Dr. Csilla TOTHOVA**, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Kosice-SLOVAKIA
- Dr. Levan MAKARADZE**, Georgian State Agrarian University-GEORGIA
- Dr. Maged El-ASHKER**, Mansoura University, Faculty of Veterinary Medicine-EGYPT
- Dr. Oskar NAGY**, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Kosice-SLOVAKIA
- Dr. Rais AHMAD**, Cholistan University of Veterinary and Animal Sciences-PAKISTAN
- Dr. René van den HOVEN**, Vienna Veterinary University-AUSTRIA
- Dr. Ryane E. ENGLAR**, College of Veterinary Medicine, University of Arizona-USA
- Dr. Salah AKKAL**, University of Mentouri Constantine, Phytochemistry and Physico-chemical and Biological Analysis Laboratory- ALGERIA
- Dr. Zehra HAJRULAI-MUSLIU**, Skopje Faculty of Veterinary Medicine-MACEDONIA



Bozok Veterinary Sciences

2024; 5 (2)

BU SAYININ HAKEM KURULU

Prof. Dr. İhsan KELEŞ- Erciyes Üniversitesi- KAYSERİ

Doç. Dr. Akın KIRBAŞ – Atatürk Üniversitesi-ERZURUM

Doç. Dr. Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU- Aksaray Üniversitesi -AKSARAY

Doç. Dr. Emrah ŞİMŞEK Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi-Muğla

Dr. Öğr. Üyesi Adalet DIŞHAN- Yozgat Bozok Üniversitesi-YOZGAT

Dr. Öğr. Üyesi Gencay EKİNCİ- Erciyes Üniversitesi- KAYSERİ

Dr. Öğr. Üyesi Güvenç GÖKALP- Yozgat Bozok Üniversitesi-YOZGAT

Dr. Öğr. Üyesi Hasan ABAYLI- Fırat Üniversitesi- ELAZIĞ

Dr. Öğr. Üyesi İmran GARİP- Yozgat Bozok Üniversitesi-YOZGAT

Dr. Öğr. Üyesi Murat METLİ- Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi-Muğla

Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk ŞAHİN- Sivas Cumhuriyet Üniversitesi -SİVAS

Dr. Öğr. Üyesi Özhan KARATAŞ- Sivas Cumhuriyet Üniversitesi -SİVAS

Dr. Öğr. Üyesi Sema ÇAKIR BAYRAK- Yozgat Bozok Üniversitesi-YOZGAT

Araş. Gör. Dr. Emre SAYAR-Yozgat Bozok Üniversitesi-YOZGAT

Araş. Gör. Dr. Murat TANRISEVER- Fırat Üniversitesi -ELAZIĞ

Araş. Gör. Dr. Umut ALPMAN- Erciyes Üniversitesi- KAYSERİ

Dr. Sadullah USLU- Erciyes Üniversitesi- KAYSERİ

Dr. Tuğrul ATALAY- Yozgat Bozok Üniversitesi-YOZGAT

<i>Araştırma Makaleleri/ Research Articles</i>	Sayfa / Page
❖ Aslandoğan O, Güneş V. <i>İshalli Buzağılarda Prokalsitonin ve Sitokin Düzeyleri*</i>	35-42
❖ Atalay T, Vuruş SN. <i>Sahipsiz Hayvanların İç ve Dış Parazit Mücadelesi İçin Yaş Mama-İlaç Karışımı Hazırlanması ve Uygulamasının Denenmesi*</i>	43-47
❖ Özkaya Y, Gündoğ D, Güngör C, Ertaş-Onmaz N. <i>Hayvansal Gıdalardan Elde Edilen Kocuria Varians İzolatlarının Biyofilm Üretim ve Antibakteriyel Direnç Profillerinin Araştırılması</i>	48-54
❖ Çöllü EM, Özalp T, Erdoğan S, Ural K, Erdoğan H. <i>Investigation Of Zonulin Levels in Dogs Infected with Canine Distemper Virus.</i>	55-61
❖ Karaoğlu S, Ural K. <i>Köpeklerde Atopik Dermatit, Leishmaniazis ve Demodikoziste Klinik Skorlamaların Araştırılması</i>	62-68
❖ Yılmaz E, Atıcı E. <i>İki Farklı Ağır Metalin (Bakir ve Çinko) Tıbbi Sülükler (Hirudo Verbana) ve Salya Antimikrobiyal Özellikleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması</i>	70-75
<i>Olgu Sunumu / Case Reports</i>	
❖ Tüfekçi E, Ekinci G, Tuzcu M, Güneş V, Abozaid AMA, Ersöz B, Bali B, Bendeş C. A <i>Case of Acute Lymphoblastic Leukemia in a Cat</i>	76-84
❖ Kocaman Y, Orhun ÖT, Turgut F, Gölgele-Bedir A, Okur S, Şenocak MG, Gözegir B. <i>Secondary Healing Following Trauma-Induced Partial Glossectomy: Case Report of an Arabian Horse</i>	85-88
❖ Ural K, Erdoğan H, Gültekin M, Paşa S, Erdoğan S, Balıkçı C, Tendar İ. <i>Parvoviral Gastroenteritisli Bir Köpekte İnce Bağırsakta Aşırı Bakteriyel Kolonizasyon ve İntestinal Metanojen Artışı: Laktuloz Probu Kullanılarak Nefes Testi ile Ölçüm</i>	89-94



İshalli Buzağlarda Prokalsitonin ve Sitokin Düzeyleri*

Oğuzhan ASLANDOĞAN¹ Vehbi GÜNEŞ²✉

¹ Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kayseri/Türkiye

² Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri/Türkiye

◆ Geliş Tarihi/Received: 13.06.2024

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 19.07.2024

◆ Yayın Tarihi/Published: 31.12.2024

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Aslandoğan O, Güneş V. İshalli Buzağlarda Prokalsitonin ve Sitokin Düzeyleri. Bozok Vet Sci (2024) 5, (2):35-42.

Özet: Bu çalışmada, ishalleri buzağların örneklerinde serum prokalsitonin (PCT) ve seçilmiş proinflatuar sitokin (TNF- α , IL-6) düzeyleri ile hastalığın şiddeti arasındaki ilişkilerin tanımlanması amaçlandı. Bu amaçla 1-30 günlük yaşta farklı ırklardan (holstein, simental, jersey) 45 adet ishalleri buzağı ve 15 adet 1-30 günlük sağlıklı buzağı (Grup 1) çalışmaya dahil edildi. Hasta grubu ishalleri buzağlar 3 gruba ayrıldı. Grup 2: hafif (n=15), Grup 3: şiddetli (n=15), Grup 4: ise komatöz (n=15) hasta gruplarını oluşturdu. Buzağların vena jugularis'lerinden tam kan sayımı, kan gazı analizleri ve ELISA analizleri için uygun kan örnekleri alındı. TNF- α , IL-6 ve PCT analizleri ticari ELISA kitlerinin uygulama prosedürlerine göre yapıldı. Hafif (456.54 ± 115.35 ng/ml), şiddetli (473.19 ± 120.50 ng/ml) ve komatöz (459.51 ± 99.14 ng/ml) ishalleri buzağların ortalama PCT konsantrasyonları, sağlıklı buzağlardan (315.70 ± 83.90 ng/ml) elde edilen değerlerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p \leq 0.01$). Sonuç olarak serum PCT düzeylerinin enfeksiyöz buzağı ishallerinde güvenilir bir yangısal biyobelirteç olduğu, hastalığın takibi ve şiddetinin belirlenmesinde kullanılabileceği değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Diyare, Kan, Prokalsitonin, Buzağı, Teşhis

Procalcitonin and Cytokine Levels in Calves with Diarrhoe

Abstract: This study aimed to define the relationships between procalcitonin (PCT) and selected proinflammatory cytokine (TNF- α , IL-6) levels in the serum of calves with diarrhea and the severity of the disease. For this purpose, 45 diarrheal calves of different breeds (Holstein, Simmental, Jersey) aged 1-30 days and 15 healthy calves (Group 1) aged 1-30 days were included in the study. Diarrheic calves used in the study were divided into 3 groups. Group 2: Mild (n=15), Group 3: Severe (n=15), and Group 4: Comatose (n=15) patient groups. Blood samples suitable for complete blood count, blood gas analysis and ELISA analysis were taken from the jugular vein of the calves. TNF- α , IL-6 and PCT analyzes were performed in accordance with the application procedure of commercial ELISA kits. The mean PCT concentrations of calves with mild (456.54 ± 115.35 ng/ml), severe (473.19 ± 120.50 ng/ml) and comatose (459.51 ± 99.14 ng/ml) diarrhea were statistically higher than the values obtained from healthy calves (315.70 ± 83.90 ng/ml). As a result, it was evaluated that serum PCT levels are a reliable inflammatory biomarker in infectious calf diarrhea and can be used in monitoring and determining the severity of the disease.

Keywords: Diarrhea, Blood, Procalcitonin, Calf, Diagnosis

1. Giriş

Yenidoğan buzağların immun savunma sistemi doğum anında yeterince gelişmediği için enfeksiyonlara karşı spesifik bir immun cevap veremez. O nedenle buzağların immun sistemleri tamamen gelişinceye kadar anadan gelen immunglobulinlerle (Ig) sağlanan pasif bağışıklık gereklidir (1,2). Yeterli maternal bağışıklığın sağlanmadığı ve pasif transfer yetmezliği (PTY) gelişen buzağlarda yeni doğan ölümlerine ve sonraki süreçte gelişim yetersizliklerine rastlanır. Özellikle Escherichia coli gibi bakteriyel, viral (sığır rotavirüs [BRV], sığır koronavirüs [BCoV]) ya da paraziter (Cryptosporidium spp.) enteritislere bağlı sepsisemilerde mortalite oranı oldukça yüksektir (3,4). İshaller süt emen buzağlarda morbidite ve mortalitenin en yaygın nedenidir (5,6). Neonatal buzağların sepsis olgularında veya şüpheli sindirim sistemi enfeksiyonlarında

sistemik yangısal cevap oluşur (2). Son yıllarda neonatal buzağı ishallerinde sistemik yangısal cevabın teşhisi ve prognozunda umut vadeden biyobelirteçler arasında Presepsin, TNF- α , IL-10, IL-6 ve Prokalsitonin (PCT) yer almaktadır (7,8).

Prokalsitonin, 116 amino asitten oluşan bir peptit olup, kalsiyum homeostazından sorumlu olan kalsitonin hormonunun öncüsüdür. Tiroid bezinin dışında, sepsis durumlarının yanı sıra, akciğer ve bağırsaklardan da dolaşıma salınabilir. Sağlıklı bireylerde çok düşük düzeylerde bulunurken, bakteriyel hastalıklarda TNF- α , IL-6 ve IL-8 sonrası artışı PCT'nin hızlıca yükseldiği, özellikle sepsis de, normal serum düzeylerine göre yüz kata kadar artabileceği bildirilmiştir (9). Prokalsitonin'in seviyesi özellikle bakteriyel kaynaklı proinflatuar bir uyarana yanıt olarak yükselişe geçer. Viral enfeksiyonlarda ve

✉: vgunes@erciyes.edu.tr

*Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından desteklenen TYL-2021-11113 kodlu projeden özetlenmiştir.

enfeksiyöz olmayan enflamatuvarlarda önemli bir artış göstermediği de bildirilmektedir. Yangının başlamasıyla birlikte PCT esasen iki alternatif mekanizma tarafından üretilir; birinci yol mikroorganizmalardan gelen lipopolisakarit (LPS) veya diğer toksik metabolitler tarafından indüklenen direkt yoldur. Diğeri IL-6, TNF- α , vb. gibi çeşitli inflamatuvar mediatörler tarafından indüklenen dolaylı yoldur (10,11).

Ciddi enfeksiyonlar ve sistemik cevapla birlikte insanlarda PCT seviyesi 100 ng/ml'ye kadar yükselebilmektedir. Veteriner Hekimliği alanında PCT düzeyleri köpeklerde (12-14), atlarda (15,16), koyunlarda (17), keçilerde (18) ve sığırlarda (19-21) çeşitli hastalık durumlarında araştırılmıştır. Sağlıklı ve septik buzağılar ile neonatal sepsisli buzağılarda, tedavi öncesi yüksek PCT düzeylerinin tedaviye bağlı olarak önemli oranda azaldığı ve kontrol grubu değerlerine ulaştığı tespit edilmiştir (22,23). Bununla birlikte sepsis dışında özellikle viral, bakteriyel ve paraziter kökenli buzağı ishallerinde hastalığın şiddetine bağlı olarak farklı derecelerdeki yaygın buzağı enfeksiyonlarında proinflamatuvar sitokinlerle birlikte bu parametrenin analiz edildiğine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Prokalsitonin'in analitik özellikleri hakkındaki bilgiler tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda yenidoğanlarda sepsis tanısı için PCT'nin C reaktif protein (CRP) 'den daha güvenilir olduğu belirtilmekle birlikte; enfeksiyöz buzağı ishallerinde hastalığın şiddetine göre prokalsitonin düzeylerini araştırın çalışmalara halen ihtiyaç vardır. Bu çalışmada ülkemizde yaygın seyreden buzağı ishallerinde hastalığın şiddetini ve yangısal süreçleri takip edebilmek için serum PCT ve sitokin düzeylerinin buzağılardaki öneminin araştırılması amaçlanmaktadır.

2. Materyal ve Metot

Bu araştırma, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 13.01.2016 tarih ve 16/010 nolu kararına ilişkin alınan etik kurul onayı ile gerçekleştirildi.

2.1. Hayvan Materyali

Araştırma Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Eğitim-Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Büyük Hayvan Kliniği, buzağı ünitesine teşhis ve tedavi amacıyla getirilen 45 ishelli ve farklı bir çiftlikten alınan onay ile tamamen sağlıklı 15 adet buzağı üzerinde yürütüldü. Farklı yaşlarda (1-35 günlük) ve farklı ırklardan, toplam 45 adet [Simental (n=15), Holstein (n=15), Montofon (n=5), Jersey (n=10)] ishelli buzağı (25 erkek, 20 dişi) ve 15 adet (9 erkek, 6 dişi) 1-35 günlük sağlıklı buzağı [Simental (n=5), Holstein (n=5), Jersey (n=5)] çalışmaya dahil edildi (Grup 1). Çalışmaya dahil edilen ishelli buzağılar; vücut sıcaklığı, nabız frekansı, solunum sayısı ve genel durum değerlendirmesini içeren tam bir fiziksel muayeneye tabi tutuldu. Elde edilen klinik bulgular ve dehidrasyon derecesine göre buzağılar her grupta 15 buzağı

olacak şekilde hafif (Grup 2), akut/şiddetli (Grup 3) ve komatöz (Grup 4) olarak üç gruba ayrıldı.

Emme eğilimi, buzağının davranışı (ayakta durma yeteneği), vücut ısısı, kalp atış hızı gibi klinik belirtiler ile Asit-Baz dengesi endeksleri, dehidrasyon derecesi ve asidozun ciddiyetine göre sınıflandırma yapıldı. Bu sınıflandırma yapılırken önceki benzer çalışmalarda da kullanılan invazif olmayan beş noktalı sıralı ölçek klinik değerlendirme puanlama tablosu temel alındı (24,25).

2.2. Kan Örneklerinin Toplanması ve Muhafaza Edilmesi

Çalışmaya dahil edilen buzağıların juguler ven'lerinden 5 ml kan örneği alındı. Alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüje edildi. Serum ve plazma örnekleri 500 μ l'lik alikotlar halinde -20 \pm 2.0 $^{\circ}$ C'de muhafaza edildi.

2.3. İshalin Etiyolojik Tanısı

Çalışmaya dahil edilen tüm buzağılardan ticari buzağı ishal kitleri kullanılarak ishale yol açan etiyolojik ajanlar testlerin pozitiflik durumuna göre belirlendi. Sağlıklılarda ise bu testler negatif olarak tespit edildi.

2.4. Tam Kan Sayımı Analizleri

Tüm buzağıların juguler ven'lerinden tekniğine uygun olarak vakumlu EDTA'lı kan toplama tüplerine 4 ml kan örnekleri toplandı. Alınan kan örnekleri homojenizatör ile 3 dk süreyle homojenize edildikten sonra tam kan sayım cihazı (Veterinary hematology analyzer, Boule Medical AB, Spanga, Sweden) ile analizleri yapıldı.

2.5. Kan Gazı Analizleri

Kan gazları analizi için lityum heparin içeren enjektörlere vena jugularis'ten 1 ml kan örnekleri alındı ve kan gazı analiz cihazı ile (Radiometer, ABL80 Flex, Brønshøj, Denmark) ölçümleri yapıldı.

2.6. ELISA Analizleri

Alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda PCT (Bovine PCT ELISA Kiti, SunRed, katalog no; 201-04-0183), IL-6 (Bovine IL-6 ELISA Kiti, SunRed, katalog no; 201-04-0008), ve TNF- α (Bovine TNF- α ELISA Kiti, SunRed, katalog no; 201-04-0007) düzeyleri ticari test kiti kullanılarak test prosedürüne göre analiz edildi. Sonuçlar Biotek ELx800 ELISA cihazında 450 nm'de okundu.

2.7. İstatistiksel Analizler

Veriler IBM-SPSS for Windows Release 25.0 Programı (SPSS Inc, Chicago, IL, ABD) kullanılarak analiz edildi. Verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı histogram, Q-Q grafikleri ve Shapiro-Wilk testi kullanılarak gerçekleştirildi. Normal dağılım gösteren veriler ortalama ve standart sapma (SD) olarak gösterildi. Normal dağılıma sahip olmayan veriler ise medyan (25. ve 75. yüzdelikler) olacak

şekilde ifade edildi. Normal dağılım gösteren veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile analiz edildi. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal-Wallis testi ile analize tabi tutuldu. P değerinin <0.05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. Bulgular

3.1. Fiziksel Muayene Bulguları

Hafif şiddetli hasta grubu (Grup 2); ayakta, emme eğilimini koruyan, hafif düzeyli dehidrasyon derecesi ile hafif düzeyli asidoza sahip buzağılardan oluştu. Orta derecede ishalleri buzağılar genellikle zayıf emme eğilimi gösteren ve sternal pozisyondaki, hafif- orta derecede dehidrasyon ve asidoza sahip buzağılardı (Grup 3). Şiddetli olgular ise ishal ile birlikte emme refleksi olmayan, yan yatar pozisyondaki, hipotermi, taşikardi, bilinç kaybıyla birlikte orta ila şiddetli dehidrasyon, şiddetli asidozis olan buzağılardan oluştu (Grup 4). Komatöz ishalleri buzağıların vücut sıcaklığı (°C) değeri (36.67 ± 1.81) sağlıklı (38.58 ± 0.31) hafif (38.85 ± 0.60) ve şiddetli (38.11 ± 1.23) ishalleri buzağılardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (Sırasıyla; $P=0.002$, $P<0.001$, $P=0.009$). Komatöz ishalleri buzağıların solunum sayısı ortalaması (28.0 (24.0-32.0)), sağlıklı buzağıların ortalamasından (44.0 (44.0-47.0)) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P=0.026$). Diğer gruplar arasında solunum sayısı değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark görülmedi ($P>0.05$). Gruplar arasında nabız sayısı değişkeni açısından ishalleri buzağı gruplarında sağlıklılara göre sayısal yüksek ortalama değerler dışında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark görülmedi ($P>0.05$).

3.2. Buzağı ishalleri teşhis kiti sonuçları

Çalışmaya dahil edilen ishalleri buzağıların hızlı tanı kitleri ile yapılan analiz sonucunda; %15.6'sında (7/45) sığır coronavirus (BCoV), %17.8'inde (8/45) sığır rotavirus (BRV), %33'ünde (15/45) ETEC K99+, %33.3'ünde (15/45) Cryptosporidium spp. tespit edildi.

3.3. Tam Kan Sayımı Bulguları

Komatöz ishalleri buzağıların (Grup 4) ortalama WBC değeri sağlıklı, hafif ve şiddetli ishalleri buzağılardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (Sırasıyla; $P=0.012$, $P=0.002$, $P=0.002$). Diğer gruplar arasında WBC değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark görülmedi ($P>0.05$). Komatöz ishalleri buzağıların ortalama monosit ve granülosit düzeyi hafif ve şiddetli ishalleri buzağılardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (Sırasıyla; $P=0.013$, $P=0.001$). Komatöz ishalleri buzağıların ortalama lenfosit ve monosit değerleri hafif ve şiddetli ishalleri buzağılardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (Sırasıyla; $P=0.034$, $P=0.027$).

Komatöz ishalleri buzağıların ortalama RBC, hematokrit ve hemoglobin değerleri hafif ishalleri buzağılardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P=0.020$).

3.4. Kan Gazları Analiz Bulguları

Ortalama pH, pCO₂ (mmHg), pO₂ (mmHg), K⁺ (mmol/L), Cl⁻(mmol/L), Laktat (mmol/L), HCO₃ (mmol/L), Base Excess (BE), Anyonik Gap, (mmol/L) değerleri arasında gruplar arasında istatistiksel farklılıklar belirlendi. Sağlıklı ve ishalleri buzağılarda ölçülen kan gazı parametreleri ve istatistiksel farklılıkları aşağıdaki tabloda sunuldu (Tablo 1).

Tablo 1. Sağlıklı ve ishalleri buzağılarda ölçülen ortalama kan gazı parametrelerinin karşılaştırılması.

	Gruplar				P değeri
	Grup 1 (Sağlıklı) (n=15)	Grup 2 (Hafif) (n=15)	Grup 3 (Şiddetli) (n=15)	Grup 4 (Komatöz) (n=15)	
pH	7.40 ± 0.06 A	7.37 ± 0.10 A	7.27 ± 0.13 B	7.10 ± 0.15 B	<0.001
pCO₂ (mmHg)	37.10 ± 9.78 A	38.83 ± 5.69 AB	40.34 ± 11.04 AB	42.79 ± 13.68 B	0.048
pO₂ (mmHg)	49.50 ± 7.91 A	38.33 ± 5.94 AB	35.0 ± 8.78 B	33.73 ± 11.42 B	0.045
Na⁺ (mmol/L)	137.40 ± 3.57	133.87 ± 7.55	132.27 ± 8.90	141.60 ± 14.60	0.063
K⁺ (mmol/L)	4.73 ± 0.49 A	5.36 ± 1.14 AB	5.68 ± 1.54 B	6.10 ± 1.54 B	0.047
Ca⁺⁺ (mmol/L)	1.24 ± 0.10	1.22 ± 0.10	1.23 ± 0.11	1.31 ± 0.18	0.265
Cl⁻ (mmol/L)	96.70 ± 4.37 A	94.27 ± 8.28 AB	88.73 ± 6.03 B	70.67 ± 10.82 B	0.020
Lactat (mmol/L)	2.45 ± 3.13	3.02 ± 2.69	3.82 ± 2.68	3.08 ± 2.46	0.714
HCO₃⁻ (mmol/L)	26.02 ± 1.82 A	25.51 ± 5.34 AB	22.14 ± 6.95 BC	15.10 ± 5.23 C	<0.001
Base Excess (BE)	3.23 ± 1.74 A	-0.50 ± 6.37 A	-4.01 ± 7.79 B	-15.39 ± 8.33 B	<0.001
Anyonik Gap (mmol/L)	13.14 ± 2.92 A	16.21 ± 9.84 AB	21.38 ± 4.98 BC	28.83 ± 5.69 D	<0.001

3.5. Prokalsitonin, Interlökin-6 (IL-6) ve Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) ELISA Bulguları

Gerçekleştirilen ELISA analizleri sonucunda PCT, IL-6 ve TNF- α ortalama konsantrasyonları Tablo 2’de gösterildi. Ayrıca her bir parametredeki değışimler grafiklerle ifade edildi (Şekil 1, 2 ve 3).

Hafif ishalleri buzağıların (Grup 2) ortalama PCT konsantrasyonu sağlıklı buzağılardan (Grup 1) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (P=0.011). Şiddetli ishalleri buzağıların (Grup 3) ortalama PCT konsantrasyonu sağlıklı buzağılardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (P=0.004). Komatöz ishalleri buzağıların (Grup 4) ortalama PCT konsantrasyonu sağlıklı buzağılardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu

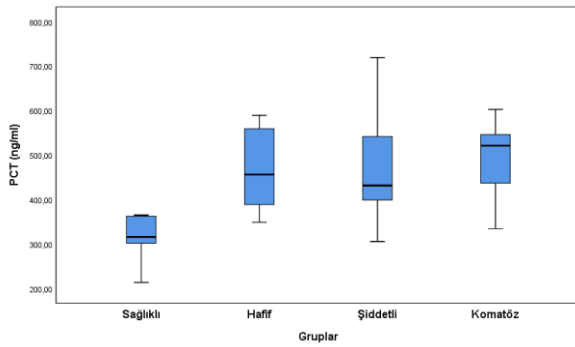
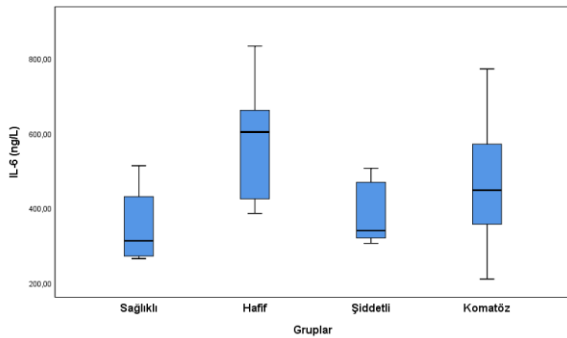
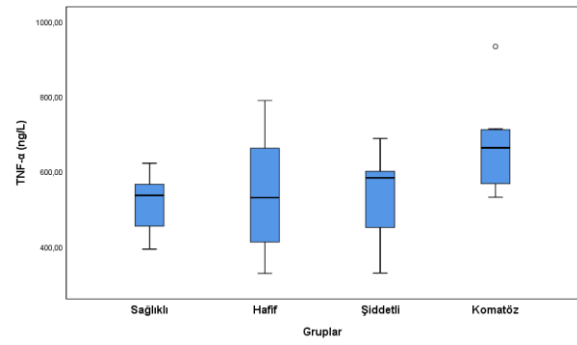
(P=0.007) (Tablo 2). Diğer gruplar arasında PCT değışkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark görölmedi (P>0.05).

Grup 2’de ortalama IL-6 (ng/L) konsantrasyonu Grup 1 ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (P=0.038). Diğer gruplar arasında IL-6 (ng/L) değışkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark görölmedi (P>0.05).

Grup 4’deki ortalama TNF- α (ng/L) konsantrasyonu Grup 1 ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (P=0.014). Diğer gruplar arasında TNF- α (ng/L) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark görölmedi (P>0.05).

Tablo 2. Sağlıklı ve ishalleri buzağıllarda olcúlen ortalama PCT, IL-6 ve TNF- α konsantrasyonlarının karşılaştırılması.

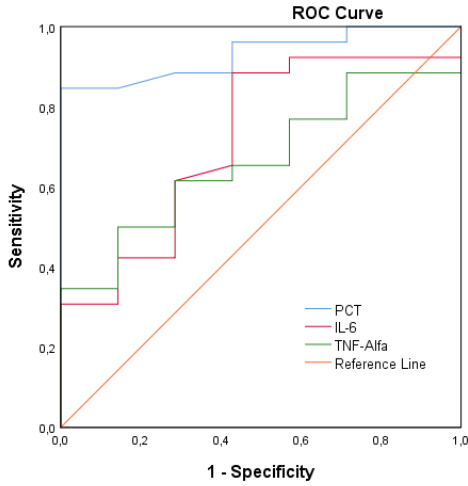
	Gruplar				P Değeri
	Grup 1 (Sağlıklı) (n=15)	Grup 2 (Hafif) (n=15)	Grup 3 (şiddetli) (n=15)	Grup 4 (Komatöz) (n=15)	
PCT (ng/ml)	315.70 \pm 83.90 A	456.54 \pm 115.35 B	473.19 \pm 120.50 B	459.51 \pm 99.14 B	0.002**
IL-6 (ng/L)	385.52 \pm 125.89 A	575.73 \pm 167.44 B	426.62 \pm 175.88 AB	435.65 \pm 165.63 AB	0.049*
TNF-α (ng/L)	489.45 \pm 91.22 A	541.96 \pm 169.23 AB	546.34 \pm 116.21 AB	662.34 \pm 137.33 B	0.018*

**şekil 1.** Sağlıklı ve ishalleri buzağıllarda olcúlen PCT (ng/mL) düzeylerinin grafik ile gösterimi**şekil 2.** Sağlıklı ve ishalleri buzağıllarda olcúlen IL-6 (ng/L) düzeylerinin grafik ile gösterimi.**şekil 3.** Sağlıklı ve ishalleri buzağıllarda olcúlen TNF- α (ng/L) düzeylerinin grafik ile gösterimi.

Prokalsitonin için kesim noktası >363.94 alındığında duyarlılık; %84.6, özgülük; %14.3, LR; 5.92, AUC; 0.931 olarak hesaplandı. Prokalsitonin, IL-6 ve TNF- α değişkenlerine ait ROC analizi sonuçları Tablo 3'de ve şekil 4'de ifade edildi.

Tablo 3. ROC analizi sonucunda PCT, IL-6 ve TNF- α için duyarlılık, özgülük, LR ve AUC değerleri.

Değişkenler	Kriter	Duyarlılık	Özgüllük	LR	AUC
PCT (ng/ml)	>363.94	%84.6	%14.3	5.92	0.931
IL-6 (ng/l)	>477.41	%42.3	%14.3	3.0	0.717
TNF- α (ng/l)	>587.60	%50.0	%14.3	3.5	0.665

**Şekil 4.** PCT, IL-6 ve TNF-alfa değişkenlerine ait ROC analizi sonuçları.

4. Tartışma ve Sonuç

Neonatal buzağı ishali bütün dünyada sığır yetiştiriciliğinin en önemli sorunlarından biridir (26,27). İshalli buzağıların genel durum kategorileri ile prognoz arasında yakın bir ilişki vardır (25,27,28). Mevcut çalışmada, ishallerli buzağıların hastalık tablosunu yansıtan genel klinik görünümünün, vital, hematolojik ve kan gazı analiz bulgularının önceki çalışmalarda ishallerli buzağılar için bildirilen sonuçlarla uyumlu olduğu gözlenmiştir. Hasta gruplarında hastalığın şiddeti ile uyumlu biçimde çeşitli derecelerde dehidrasyon, metabolik asidozis ve yüksek anyonik gap değerlerinin ishallerli buzağılardaki değerleri yansıttığı belirlenmiştir (Tablo1). Ayrıca ilgili sonuçların hastalığın şiddeti arttıkça daha önemli olduğu ve sağlıklı grup ile hafif ishallerli gruptan önemli oranda sapmalar gösterdiği de tespit edilmiştir (29).

İnterlökin IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi sitokinlerin birçok patofizyolojik durumda artabileceği gösterilmiştir (30). Bu tez çalışmasında da analiz edilen IL-6 ve TNF- α düzeylerinde hasta gruplarında sağlıklılara göre önemli oranda artışlar belirlendi. Ayrıca hastalığın şiddeti ile orantılı biçimde yapılan değerlendirmede özellikle IL-6 düzeylerinin orta ve komatöz enfeksiyon durumlarında sağlıklı ve hafif enfekte gruba göre sayısal olarak yüksek olduğu, fakat bu farklılığın istatistiksel olmadığı görülmüştür. Ortalama IL-6

düzeylerinin daha çok enfeksiyonun başlangıç dönemlerinde artış göstermesi nedeniyle, çalışma olgularının hastalığın ileri safhalarında olduğu değerlendirildi. Bu çalışmada elde edilen değerlerin Akgül ve ark. (18), tarafında yapılan çalışma ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte yukarıdaki çalışmada özellikle ortalama IL-6 düzeylerinin çalışmamızdan elde edilen ortalama değerden daha yüksek olduğu gözlenmiştir, bu durumun Akgül ve ark.'nın (18), çalışmasında hasta grubunun tamamının daha ağır hastalık tablosu sergileyen septisemili buzağılardan oluşması ile ilişkilendirilmiştir. Kontrol gruplarındaki ortalama değerlerin ise her iki çalışmada birbiri ile benzer olduğu belirlenmiştir.

Mevcut çalışmada hayatta kalma oranları ortaya konulmamış olsa da ishallerli buzağılarda kontrollere göre yüksek değerlerin elde edilmesi IL-6 düzeylerinin diyagnostik ve prognostik önemini ortaya koydu. Ayrıca buzağı ishallerinde hastalık ilerlemesinin tahmini için yararlı bir tamamlayıcı parametre olduğu bildirimleriyle de uyumluydu (22). Ayrıca ROC analizlerine göre ortalama PCT duyarlılığının IL-6 ve TNF- α için elde edilen değerlerden daha yüksek olması nedeniyle pozitif hastaların belirlenmesinde daha etkili bir parametre olduğu görüldü.

Prokalsitonin gibi AFP araştırmalarında ilişkili sitokin düzeyleri mutlaka analiz edilmelidir. Çünkü yangısal süreçte PCT salınımı hücrel immün yanıtta indirekt olarak; IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α gibi inflamatuvar sitokinler aracılığı uyarılmaktadır (11).

Sistemik yangısal enfeksiyonu olan buzağılarda PCT düzeylerinin sağlıklılara göre artışı beklenen bir sonuçtur. Bununla birlikte önceki çalışmalarda gerek sağlıklı kontrollerin gerekse ishallerli ve septisemik buzağılardaki sonuçlar ile farklılıklar gösterdiği izlenmiştir. Araştırmacılar arasındaki farklılıklar kullanılan analiz yönteminden kaynaklı olabilir. Yöntemlerin ölçüm aralığı, fonksiyonel duyarlılığı, tespit limitleri kullanılan tekniğe ve tahlile bağlı olarak değişir. Prokalsitoninin ölçüm aralığı, fonksiyonel hassasiyet ve tespit limiti sırasıyla; 0.02-500 ng/ml, 0.05-0.24 ng/ml, 0.019-0,05 ng/ml arasında değişmektedir (31).

Bu çalışmada elde edilen gerek sağlıklı (400 ng/ml) gerekse hasta grubu buzağılardan elde edilen sonuçların önceki

çalışmalardan farklı düzeyde olduğu gözlenmiştir. ELISA sonuçlarını, ELISA kitinde kullanılan antikorların bu tip analizler için hayati önemi olan validasyon ve eşik değeri gibi parametreleri etkileyecektir. Sonuçlar, daha önce atlarda, köpeklerde ve insanlarda bildirildiği gibi buzağılarda septik SIRS sırasında plazma PCT'nin arttığını doğrulayan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (32-34). Ayrıca, hem sağlıklı buzağılarda hem de septik SIRS'li buzağılarda ortalama plazma PCT konsantrasyonları, atlarda bildirilenlere benzerdi (34), fakat köpeklerden daha yüksek bulundu (14). Ancak bu farklılıklar kullanılan ticari analiz kitlerindeki farklılıklara dayandırılmaktadır. Kontrol grubunda elde edilen sonuçlar, sağlıklı buzağılar için bildirilenlere göre daha yüksekti. Ercan ve ark. (35), septisemik kolibasiloz tanısı konan yenidoğan buzağılarda PCT serum konsantrasyonlarının kolibasillozlu septisemik buzağılarda sağlıklı buzağılara göre dört kat daha yüksekti. Bu çalışma kullanılan farklı bir ELISA kitini kullandığımız çalışmada hasta ve sağlıklılar arasında yaklaşık 2 katı bir farklılık tespit edildi. Araştırmamızı diğer araştırmalardan farklı kılan diğer bir durum da septik/SIRS'li buzağıların kullanılmamasıdır. Bu nedenle akut ishalleri fakat sepsis belirtisi olmayan buzağılarda daha düşük değeri belirlenmesi olasıdır. Kontrol grubuna göre hafif, komatöz ve şiddetli grupta farklılıklar olsa da, hastalığın şiddeti açısından gruplar arasında farklılık görülmedi. Plazma PCT konsantrasyonlarının hayatta kalmayan sepsisli buzağılarda daha yüksek olduğu bilinmektedir. Bu sonuç, insanlarda sepsis, şiddetli sepsis ve septik çok için rapor edildiği gibi, septik SIRS'li buzağılarda olumsuz sonucu tahmin etmede plazma PCT'nin olası bir rolü olduğunu düşündürmektedir (36). Septik buzağıları septik olmayan buzağılardan ayırt etmek için plazma PCT (67.39 pg/mL) için sınır değeri elde edilmiştir. Fakat bu değeri çalışmalar arasında; farklı buzağıların kullanımı, farklı analiz ve yöntemlerinin kullanılması nedeniyle farklıdır. Serum PCT düzeylerinin, IL-6 ve TNF- α düzeylerinin rakamsal artışlarına rağmen hastalığın şiddeti ile istatistiksel açıdan uyumlu olmadığı fakat hastalarda daha yüksek seyrettiği bu çalışma ile de belirlenmiştir. Bu sonuçlar klinik muayene ile birlikte PCT ve sitokinlerin ölçümünün, Mannheimia haemolytica ve Histophilus somni ile doğal olarak enfekte olmuş besi danalarının değerlendirilmesi için yararlı bir teşhis ve prognostik araç olabileceğini belirten araştırma ile uyumludur (20).

Buzağılarda PCT araştırmaları daha çok sepsis olgularında araştırılmıştır. Bu araştırmada buzağılarda sepsisi tanımlayan ortak konsensusun halen sağlanamaması ve sepsisi kanıtlayacak altın standart uygulama olan kan bakteri-virüs düzeylerinin analizinin yapılamaması nedeniyle sepsis olguları kriterleri dikkate alınmamıştır. Bu nedenle araştırmamızdaki önceki bazı çalışmalardan farklı sonuçların elde edilmesi doğaldır. Farklı sonuçlara rağmen, sunulan araştırma tedaviyle birlikte sepsisli buzağılarda prokalsitonin

konsantrasyonunun azaldığı ve prokalsitonin sepsisli buzağılarda prognostik ve diagnostik olabileceğini belirten araştırma (23) ile bu yönüyle uyumlu bulunmuştur.

Bununla birlikte sunulan çalışmayı kısıtlayan ve önceki çalışmalarda da (2,37) belirtilen; kan kültürü pozitif buzağıların belirlenmemesi, sepsiste net kriterleri belirleyen bir konsensusun olmaması nedeniyle sepsis tablosu olan buzağıların dahil edilememesi, hayatta kalan ve yaşayanlar arasında PCT analizlerinin yapılamaması, ayrıca önceki olası antibiyotik tedavisi, opsonize antikorların varlığı, dolaşımdaki bakteri sayısındaki farklılıklar, nispeten düşük örnek hacmi ve farklı hastalık evresi olası faktörlerdir. Bu faktörlerin mevcut sonuçları etkileme ihtimali söz konusu olabilir.

Sonuçta; buzağılarda serum veya plazma PCT analizlerinden elde edilen değeri üretici firmaların ELISA kitlerinin farklılığına bağlı olarak değerşebileceği, PCT'nin ishalleri hasta buzağıları sağlıklılardan ayırt etmede IL-6 ile birlikte değerlendirilmesi gereken etkili bir biyobelirteç olduğu, Serum PCT düzeyinin doğal ishalleri buzağılardaki hastalığın şiddeti ile doğru orantılı olmadığı, insan tıbbında önerildiği gibi, plazma PCT'nin antibakteriyel tedavi süresini azaltmadaki rolünü araştırmak için daha fazla araştırma yapılmasının gerektiği değerlendirilmiştir.

Kaynaklar

1. Kim YB: Developmental immunity in the piglet. Birth Defects Orig Artic Seri, 1975; 11: 549-557.
2. Fecteau G, Smith BP, George LW. Septicemia and meningitis in the newborn calf. Vet Clin North Am food Anim Pract. 2009; 25(1): 195-208.
3. Pas ML, Bokma J, Lowie T, Boyen f, Pardon B. Sepsis and survival in critically ill calves: Risk factors and antimicrobial use. J Vet Intern Med. 2023; 37(1): 374-89.
4. Robison JD, Stott GH, De Nise SK. Effects of passive immunity on growth and survival in the dairy heifer. J Dairy Sci, 1988; 71: 1283-1287.
5. Mee JF Newborn dairy calf management. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 2008; 24: 1-17.
6. Uetake K. Newborn calf welfare: A review focusing on mortality rates. Anim Sci J, 2013; 84(2): 101-105.
7. Altınsoy AM, Altınok V. Neonatal buzağı septisemileri için potansiyel bir biyobelirteç adayı: Presepsin: Geleneksel derleme. Türkiye Klinikleri J Vet Sci. 2024; 15(1): 23-29
8. Guzelbektes H, Sen I, Aydoğdu u, Er C, Coşkun A. Investigation of cytokine levels in calves with sepsis. J Hellenic Vet Med Soc. 2022; 73(2): 4113-4118.
9. Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C: High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. Lancet, 1993; 341 (8844): 515-518.
10. Müller B, White JC, Nylén ES, Snider RH, Becker KL, Habener JF. Ubiquitous expression of the calcitonin-1 gene in multiple tissues in response to sepsis. J Clin Endocrinol Metab, 2001; 86: 396-404
11. Matur ve ark. (2017). Matur E, Eraslan E, Çöteliöğü Ü. (2017). Biology of Procalcitonin and its Potential Role in Veterinary Medicine. J. Istanbul vet sci. 1(1): 16-27

12. Kuzi S, Aroch I, Peleg K, Karnieli O, Klement E, Dank G. Canine procalcitonin messenger RNA expression. *J Vet Diagn Investig*, 2008; 24(5): 629-633.
13. Brkljac ic M, Torti M, Pleadin J, Mrljak V, Smit I, Kis I, Mayer I, Crnogaj M, Matijatko V. The concentrations of inflammatory markers the aminoterminal portion of C-type pronatriuretic peptide and procalcitonin in canine babesiosis caused by *Babesia canis*. *Vet Arh*, 2014; 44(6): 575-589
14. Easley F, Holowaychuk MK, Lashmits EW, Nordone SK, Marr H, Birkenheuer AJ. Serum procalcitonin concentrations in dogs with induced endotoxemia. *J Vet Intern Med*, 2020; 34(2): 653-658.
15. Rieger M, Kochleus C, Teschner D, Rascher D, Barton AK, Geerlof A, Kremmer E, Schmid M, Hartmann A, Gehlen H. A new ELISA for the quantification of equine procalcitonin in plasma as potential inflammation biomarker in horses. *Anal Bioanal Chem*, 2014; 406(22): 5507-5512
16. Teschner D, Rieger M, Koopmann C, Gehlen H. Procalcitonin in horses with an acute colic. *Pferdeheilkunde*, 2015; 31(4): 371-377.
17. Arslan S, Altuğ N, Muz MN, Yüksek N, Başbuğan Y, Orunç Kılıç Ö. Diagnostic and prognostic value of procalcitonin (PCT), C reactive protein (CRP), nitric oxide (NO) levels, and adenosine deaminase (ADA) activity in sheep with natural babesiosis before and after treatment. *Turkish J Vet Anim Sci*, 2018; 42(6): 512- 520.
18. Akgül G, Akgul MB, Ozen D, S Kahya D. Comparison of Serum Procalcitonin, Haptoglobin and C-Reactive Protein Level in Goat with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Indian J Anim Res*, 2018; 52(12): 1778-1781.
19. Başbuğ O, Yurdakul İ, Yuksel M. Evaluation of Serum Amyloid A and Procalcitonin in Some Inflammatory Diseases of Cattle. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2020; 26(3): 397-402
20. El-Deeb W, Elsohaby I, Fayez M, Mkrtychyan HV, El-Etriby D, ElGioushy M. Use of procalcitonin, neopterin, haptoglobin, serum amyloid A and proinflammatory cytokines in diagnosis and prognosis of bovine respiratory disease in feedlot calves under field conditions. *Acta Trop*, 2020; 204: 105336.
21. El-Deeb W, Fayez M, Alhumam N, Elsohaby I, Quadri SA, Mkrtychyan H. The effect of staphylococcal mastitis including resistant strains on serum procalcitonin, neopterin, acute phase response and stress biomarkers in Holstein dairy cows. *Peer J*, 2021; 9: e11511.
22. Bonelli F, Meucci V, Divers TJ, Boccardo A, Pravettoni D, Meylan M, Belloli AG, Sgorbini M. Plasma procalcitonin concentration in healthy calves and those with septic systemic inflammatory response syndrome. *Vet J*, 2018; 234: 61-65.
23. Akyüz E, Gökce G. Neopterin, procalcitonin, clinical biochemistry, and hematology in calves with neonatal sepsis. *Trop Anim Health Prod*, 2021; 53: 354.
24. Sayers RG, Kennedy A, Krump L, Sayers GP, Kennedy E: An observational study using blood gas analysis to assess neonatal calf diarrhoea and subsequent recovery with a European Commission-compliant oral electrolyte solution. *J Dairy Sci*, 2016; 99 (6): 4647-4655.
25. Keleş İ, Ekinci G, Tüfekçi E, Çitil M, Güneş V, Aslan Ö, Onmaz AC, Karaca Bekdik İ, Varol K, Deniz: Etiological and predisposing factors in calves with neonatal diarrhea: A clinical study in 270 case series. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2022; 28 (3): 315-326
26. Berber E, Çanakoglu N, Sözdutalmaz İ, Simsek E, Sursal N, Ekinci G, Kökkaya S, Arıkan E, Ambarcıoğlu P, Göksu AG, Keleş İ. Seasonal and Age-Associated Pathogen Distribution in Newborn Calves with Diarrhea Admitted to ICU. *Vet. Sci*. 2021; 8: 128.
27. Ekinci G, Tüfekçi E, Cissé Y, Bekdik İK, Onmaz AC, Aslan Ö, Güneş V, Çitil M, Keleş İ. Chloride and lactate as prognostic indicators of calf diarrhea from eighty-nine cases. *J Vet Sci*. 2024; 25(3): e38.
28. Ekinci G, Tüfekçi E, Onmaz AC, Çitil M, Keleş İ, Güneş V. Erciyes Üniversitesi Hayvan Hastanesi'ne 2019-2021 yılları arasında getirilen neonatal ishalleri buzağılarda majör enteropatojenlerin yaygınlığının araştırılması. *Erciyes Univ Vet Fak Derg*, 2022; 19(2): 113-122.
29. Özkan C, Akgül Y. Neonatal İshalleri Buzağılarda Hematolojik, Biyokimyasal ve Elektrokardiyografik Bulgular. *YYU Vet Fak Derg*, 2004; 15 (1-2): 123-129
30. Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, Olsen JR, Jeffress EJ, Moore DA, Kastelic JP. Associations among serum pro-and anti-inflammatory cytokines, metabolic mediators, body condition, and uterine disease in postpartum dairy cows. *Reprod Biol Endocrinol*, 2013; 11(1): 1-3.
31. Davies J. Procalcitonin. *J Clin Pathol*. 2015; 68(9): 675-9.
32. Yılmaz Z, Ilcol YO, Ulus IH. Endotoxin increases plasma leptin and ghrelin levels in dogs. *Crit Care Med*, 2008; 36(3): 828-833.
33. Rieger M, Kochleus C, Teschner D, Rascher D, Barton AK, Geerlof A, Kremmer E, Schmid M, Hartmann A, Gehlen H. A new ELISA for the quantification of equine procalcitonin in plasma as potential inflammation biomarker in horses. *Anal Bioanal Chem*, 2014; 406(22): 5507-5512.
34. Bonelli F, Meucci V, Divers T, Radcli E R, Jose-Cumilleras E, Corazza M, Guidi G, Tognetti R, Castagnetti C, Intorre L, Sgorbini M. Evaluation of plasma procalcitonin concentrations in healthy foals and foals affected by septic systemic inflammatory response syndrome. *J Equine Vet Sci*, 2015a; 35: 645-649.,
35. Ercan N, Tuzcu N, Başbuğ O, Tuzcu M, Alim A. Diagnostic value of serum procalcitonin, neopterin, and gamma interferon in neonatal calves with septicemic colibacillosis. *J Vet Diagn Invest*, 2016; 28(2): 180-183.
36. Huang MY, Chen CY, Chien JH, Wu KH, Chang YJ, Wu KH, Wu HP. Serum Procalcitonin and Procalcitonin Clearance as a Prognostic Biomarker in Patients with Severe Sepsis and Septic Shock. *Biomed Res Int*, 2016; 2016: 1758501.
37. Wilson WD, Madigan JE. Comparison of bacteriologic culture of blood and necropsy specimens for determining the cause of foal septicemia: 47 cases (1978-1987). *J Am Vet Med Assoc*, 1989; 195: 1759-1763.



Sahipsiz Hayvanların İç ve Dış Parazit Mücadelesi İçin Yaş Mama-İlaç Karışımı Hazırlanması ve Uygulamasının Denenmesi*

Tuğrul ATALAY ¹✉, Sıla Nur VURUŞ ¹

¹ Yozgat Bozok Üniversitesi, Şefaati Meslek Yüksekokulu, Veteriner Bölümü, Laborant ve Veteriner Sağlık Programı

◆ Geliş Tarihi/Received: 15.07.2024

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 25.08.2024

◆ Yayın Tarihi/Published: 31.12.2024

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Atalay T, Vuruş SN. Sahipsiz Hayvanların İç ve Dış Parazit Mücadelesi İçin Yaş Mama-İlaç Karışımı Hazırlanması ve Uygulamasının Denenmesi. Bozok Vet Sci (2024) 5, (2):43-47.

Özet: Sahipsiz hayvanlara ilişkin problemler dünya çapında yaygın olup, bu hayvanların zoonotik hastalıkları nakletme potansiyelleri önemli ölçüdedir. Sokak veya doğa koşullarında yaşam mücadelesi veren, hastalanan ve tedavi edilemeyen çok sayıda sahipsiz hayvan zarar görebilmekte ve ölümlerle sonuçlanan üzücü durumlar ortaya çıkabilmektedir. Hasta sahipsiz bir hayvana tedavi amacıyla klasik ilaç uygulama yöntemleri ile yaklaşıldığında, hayvanın uygulayıcıya zarar verebilme ihtimali tedaviyi olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu nedenle sahipsiz hayvanların tedavisinde, klasik ilaç uygulama yöntemleri bazen kullanım alanı bulamamaktadır. Bu araştırma sahipsiz hayvanlar için daha kolay bir antiparazitik ilaç uygulama yöntemi ortaya konulmasını ve uygulayıcının daha az risk altında tutularak hayvanların tedavisine katkılar sağlanmasını amaçlamaktadır. Bu çalışmada köpeklere bazı iç ve dış parazitlerin mücadelesinde kullanılan antiparazitik ticari bir ilaç, ticari bir yaş mama ile birlikte verilerek yeni bir oral ilaç uygulaması gerçekleştirilmiş ve demodikozis hastalığının tedavi edildiğine dair bulgulara rastlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Sahipsiz hayvan, Yaş mama, Antiparazitik ilaç, Oral uygulama

Preparation and Application of Wet Food-Medicine Mixture for Internal and External Parasite Control of Stray Animals

Abstract: Problems related to stray animals are widespread worldwide and their potential to transmit zoonotic diseases is significant. Many stray animals struggling to survive on the streets or in nature, who become ill and cannot be treated, can be harmed and sad situations resulting in death can occur. When a sick stray animal is approached with classical drug administration methods for treatment, the possibility that the animal may harm the practitioner may adversely affect the treatment. For this reason, classical drug administration methods are sometimes not used in the treatment of stray animals. This study aims to provide an easier antiparasitic drug administration method for stray animals and to contribute to the treatment of animals by keeping the practitioner at less risk. In this study, a new oral administration of a commercial antiparasitic drug used in the control of some internal and external parasites was performed by giving a commercial wet food to dogs and it was found that demodicosis disease was treated.

Keywords: Stray animal, Wet food, Antiparasitic drug, Oral administration

1. Giriş

18. yüzyılda Endüstri Devrimi'nin başlamasıyla birlikte iş imkânına ve daha kaliteli yaşam koşullarına ulaşmak amacıyla kırsal bölgelerden kentlere göç artmıştır. Kitlesel göçleri, savaş ve doğal afetler de artan yönde etkilemiştir. Yoğun göç dönemlerinde, göç eden hayvan sahipleri ticari değeri bulunan çiftlik hayvanlarını satarken, ticari değeri bulunmayan kedi ve köpek gibi hayvanlarını bırakıp gitmişlerdir. Genellikle kedi ve köpeklerden oluşan evcil hayvanlar, sahiplerinin vefatı sonucu veya terk edilerek başıboş bırakılmaları ile kimsesiz kalmaktadırlar (1). Hayvanların terk edilmesi olayının Türkiye'de de birçok örneği bulunmaktadır. Çok sayıda insan tatil bölgelerinden dönerken sahip oldukları pet hayvanlarını bırakıp

gitmektedirler (2). Bu gibi çeşitli nedenlerle sahipsiz hayvanların sayısı gitgide artmakta ve bu hayvanların yaşadığı problemler de ciddi boyutlara ulaşmaktadır (1). 2022 yılında dünya çapında yaklaşık olarak 600 milyon ve Türkiye'de 10 milyon civarında sahipsiz hayvan yer almaktadır (3). 2018 yılına ait verilere göre İstanbul'da, içinde 162.970 kedi ve 128.900 köpeğin olduğu toplam 291.870 sahipsiz hayvan yer almaktadır (4). Doğa ile ilişkisi kısmen koparılmaları nedeniyle doğada yaşama yeteneği azalmış hale gelen bu hayvanlar yerleşim alanlarında zor şartlarda yaşam kavgası vermektedirler. Sağlık problemleri de sahipsiz hayvanların karşılaştıkları önemli sorunlardandır (1). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre son on yılda insanlara etki eden ve yeni tanımlanan enfeksiyöz etkenlerin

✉: tugrul.atalay@yobu.edu.tr

*Bu proje TÜBİTAK tarafından 2009-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı kapsamında desteklenmiştir

%60'dan fazlasını hayvanlar veya hayvansal kaynaklı ürünler oluşturmaktadır. Zoonoz nitelikteki bu enfeksiyonların %70'inin kaynağı ise vahşi yaşamdır (5). 30 ila 40'ı köpek ve kedi kaynaklı olmak üzere 250'den fazla zoonoz hastalık bulunmakta ve insanlara bulaşabilmektedir (6). Sahipsiz hayvanların zoonoz hastalıkları bulaştırabilme ihtimalleri ise %50'leri bulmaktadır (7).

Günümüzde tedavi edilemeyen çok sayıda sahipsiz hayvanın sağlığı bozulmakta hatta ölümlerle sonuçlanan dramatik tablolar ortaya çıkabilmektedir. Bunu önlemek amacıyla başvuru olan klasik ilaç uygulama yöntemleri bazen yeterli olamamaktadır. Hasta sahipsiz bir hayvana tedavi açısından yardım etmek istenebilmekte fakat diğer tedavi yöntemleri ile uygulama (enjeksiyon, hap uygulaması, enseye damla, sprey vs.) yapabilmek için yaklaşmak, hayvanı tutmak veya zapturapt altına almak gerekmektedir. Sahipsiz hayvanın yardım etmek isteyen kişiye zarar verebileceği (ısırma, tırmalama vs.) düşüncesi bu tedaviyi negatif yönde etkileyebilmektedir. Dolayısı ile hayvanlar tarafından ısırılma, tırmalanma gibi

risklerin yanı sıra zoonoz bazı hastalıklar açısından da insan sağlığına yönelik riskler ortaya çıkabilmektedir. Bu olumsuz etkilerin ve risklerin önüne geçmek için yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu araştırma sahipsiz hayvanlara daha kolay bir antiparazitik ilaç uygulaması ortaya koymayı ve uygulayıcının minimum risk altında bu hayvanların tedavisine katkı sağlamayı amaçlamaktadır. Bu araştırma ile yeni bir oral ilaç uygulaması gerçekleştirilmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Hayvan Materyali

Bu çalışma Yozgat Belediye Başkanlığı Veteriner İşleri Müdürlüğü'nün 02.12.2022 tarihli, E-75532628-757.01-18176 sayılı izni ve Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 03.08.2023 tarihli, 23/148 sayılı izni çerçevesinde yürütülmüştür. Çalışmada Yozgat Belediyesi Geçici Hayvan Barınağı'na ait 6 adet dişi köpek kullanılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Köpeklere ait bilgiler, kullanılan ilaç dozu ve uyuz şüpheli köpekler.

Denekler	İrk	Yaş (ay)	Kilo	Uygulanan mama-ilaç karışımı (adet)/ ilaç dozu (g)	Uyuz şüphesi	Demodex spp. görülen	Cystoisospora spp. görülen	Tedavi
1. Köpek	Pointer	10	26	2 adet / 0,5 g ilaç	-	-	+	-
2. Köpek	Kangal Melezi	24	37	3 adet / 0,75 g ilaç	+	-	-	-
3. Köpek	Kangal Melezi	12	25	2 adet / 0,5 g ilaç	-	-	-	-
4. Köpek	Kangal Melezi	24	29	3 adet / 0,75 g ilaç	+	+	-	+
5. Köpek	Kangal Melezi	36	40	4 adet / 1 g ilaç	+	+	-	+
6. Köpek	Pointer Melezi	36	19	2 adet / 0.5 g ilaç	-	-	-	-

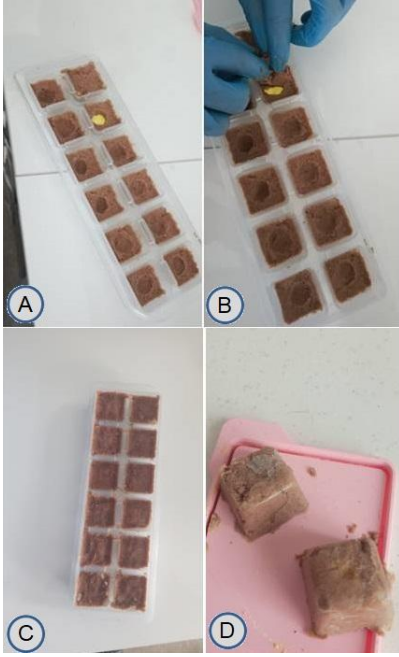
2.2. Antiparazitik yaş mama-ilaç karışımının hazırlanması

Antiparazitik karışımın hazırlanmasında cezbedici olarak ticari bir yaş mama (Royal Canin®, Exigent, Fransa) kullanılmıştır. Mamanın bir paketi 85 g ağırlığında olup 4 paket mama kullanılmıştır. Laboratuvarda yaş mama karıştırma kabına konularak üzerine 7 ml distile su katılmış ve blendır (CVS DN 1275 Mono Stick) vasıtasıyla parçalanarak daha homojen hale getirilmiştir. Sonra temin etmiş olduğumuz hem iç parazit hem de dış parazit tedavisinde kullanılmakta olan tablet formundaki 1 gramında 10 mg ivermectin, 250 mg praziquantel etken madde içeren (Dicromec®, Anadolu İlaç, Türkiye) antiparazitik ilaçlar havanda dövülerek parçalanıp toz haline getirilmiştir. Sonra

bu ilaçlar hassas terazide (Radwag PS 750.R2) 0.25 g dozlara ayrılarak ependorf tüplerine konulmuştur. Her birinde 12 adet hücre bulunan 2 adet buz kalıbı kullanılmıştır. Bir buz kalıbı için 2 paket (170 g) yaş mama kullanılmıştır. Sonrasında homojen hale getirilmiş olan yaş mama, buz kalıplarının her bir hücresinin yarısına kadar sıkıştırılarak konulmuş ve sıkışan mamaların orta yerlerine işaret parmağımız vasıtasıyla çukur açılmıştır. İlaç dozlarını kontrol altında tutabilmek için buz kalıbının her hücresindeki bu çukurlara ependorf tüplerine ayrılmış olan 0.25 g ilaçlar eklenmiş ve üzerleri tekrar yaş mama ile kapatılmıştır (Şekil 1).

Bu işlemlerin sonunda buz kalıbının her hücresinde yaklaşık olarak 15 g karışım hazır hale gelmiştir. Karışım bozulmaması ve uygulama esnasında dağılması için derin

dondurucuya kaldırılmış ve kullanıma hazır hale getirilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Yaş mamalara toz formda ilaç eklenmesi (A), ilaçların üzerlerinin kapatılması (B), dondurulmuş yaş mama-ilaç karışımı (C) ve kullanıma hazır yaş mama-ilaç karışımı (D).

2.3. Barınak ziyaretleri, barındaki ve laboratuvarındaki uygulamalar:

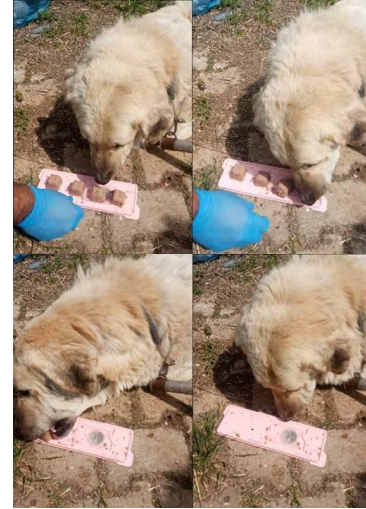
Barınak 1. gün, 2. gün ve 14. gün olmak üzere üç kez ziyaret edilmiştir. Birinci gün hazırlanmış olduğumuz yaş mama-ilaç karışımı ve gerekli araç gereçler alınarak Yozgat Belediyesi Hayvan Barınağı'na ilk ziyaret gerçekleştirilmiştir. Barınakta altı adet dişi köpek üzerinde çalışma yapılmıştır. Barındaki köpekler olası dış parazit (bit, pire, kene, uyuz vs.) ve dışkı ile atılan helmintler yönünden inspeksiyon ile makroskobik olarak incelenmiştir. İnceleme sonunda altı köpekten üçünde (2., 4. ve 5. köpekler) uyuz belirtileri görülmüştür (Tablo.1). Bunun dışında herhangi bir dış parazite (bit, pire, kene, vs.) ve dışkı ile atılan helminte rastlanmamıştır. Yaş mama-ilaç karışımı uygulanması öncesinde köpeklerin fotoğrafları çekildikten sonra uyuz şüpheli köpeklerden deri kazıntısı alınmıştır (8). İç parazit yumurta vs. varlığı yönünden incelenmek üzere her bir köpekten ayrı ayrı taze dışkılar alınarak numune kaplarına konulmuştur (9). Köpekler ilaç kullanım dozunu belirlemek üzere baskül vasıtası ile tartılmıştır. Tartım işlemi köpeklerin büyük cüsseli olması nedeniyle kişi ile birlikte kucakta tutmak şeklinde yapılmış, kişinin ağırlığı toplam ağırlıktan çıkarılarak net ağırlıkları kayıt altına alınmıştır. Yaş mama-ilaç karışımı köpeklere canlı ağırlıklarına göre ilaç prospektüsünde belirtilen doz (50 kg/ 1 g) baz alınarak verilmiştir (Tablo.1).

Köpeklerin yaş mama-ilaç karışımına olan ilgisi gözlemlenmiş ve video ile kayıt altına alınmıştır (Şekil 2).

Önce deri kazıntıları mikroskopla (Zeiss Primostar) 10x ve 40x büyütmelemlerde incelenmiştir. Sonrasında ise dışkı numunelerinde iç parazit varlığını araştırmak üzere doymuş tuzlu su ile flotasyon yöntemi uygulanmıştır (10). Dışkı numuneleri mikroskopla (Zeiss Primostar) 10x ve 40x büyütmelemlerde incelenmiştir. İkinci (ertesesi) gün Yozgat Belediyesi Hayvan Barınağı'na ikinci ziyaret gerçekleştirilmiştir. Köpeklere verilmiş olan ilaçların solucan düşürücü etkisiyle dışkıda görülmesi muhtemel olan helmintlerin varlığını araştırmak üzere inspeksiyonla makroskobik olarak inceleme yapılmıştır. Ayrıca köpekler dış parazit varlığı açısından da tekraren makroskobik olarak incelenmiştir. On dördüncü gün barınak vasıta ile yeniden ziyaret edilmiş ve tekrar köpeklerden dışkı numunesi alınmıştır (9). Ayrıca uyuz etkeni görülmüş olan iki köpekten de deri kazıntısı alınmıştır (8). Uyuz şüpheli köpeklerin tekrar fotoğrafları çekilmiştir. Geri laboratuvara dönülerek tekraren aynı şekilde dışkı ve deri kazıntıları aynı yöntemler ile incelenmiştir.

3. Bulgular

Barınağa yapılan ilk ziyarette (1. gün) köpeklerin tamamının yaş mama-ilaç karışımına olan ilgisinin olumlu yönde olduğu ve karışımı yuttukları gözlemlenmiştir (Şekil 2).



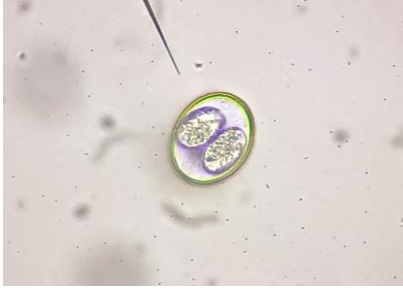
Şekil 2. Yaş mama-ilaç karışımının köpek tarafından tüketilmesinin video ile kaydı sonrası elde edilen görüntüler.

Buz formdaki yaş mama-ilaç karışımının bir kısmı köpeklere tamamen çözdürülerek verilmiş fakat bazı karışım numunelerinin dağılarak formlarının bozulabildiği gözlemlenmiştir. Bir kısmı da biraz çözdürülerek verilmiş ve karışım numunelerinin formunu koruduğu gözlemlenmiştir. Köpeklerden bazılarının daha soğuk formdaki bu karışımı biraz daha çekimsiz şekilde yediği gözlemlenmiştir. Uyuz şüpheli üç köpekten ikisinde (4. ve 5. köpekler), uyuz etkeni olan *Demodex* spp. bulunmuştur (Şekil 3).



Şekil 3. Dördüncü köpekten alınan deri kazıntısında karşılaşılan *Demodex* spp. (40x).

Bir köpekte protozoer etken olan *Cystoisospora* spp.'nin sporlanmış ve sporlanmamış ookistleri ile karşılaşılmıştır (Şekil 4, Şekil 5).



Şekil 4. Birinci köpekten alınan dışkıda rastlanan sporlanmış *Cystoisospora* spp. ookisti (40x)



Şekil 5. Birinci köpekten alınan dışkıda karşılaşılan sporlanmamış *Cystoisospora* spp. ookisti (40x)

Cystoisospora spp. dışında herhangi bir iç paraziter etken görülmemiştir. Barınağa yapılan ikinci ziyarette (2. gün) inspeksiyon ile makroskopik incelemelerde köpeklerin dışkılarında herhangi bir helmint varlığına ve farklı bir dış paraziter etkene rastlanmamıştır. Barınağa 14. gün yapılan ziyarette inspeksiyon ile makroskopik incelemelerde, daha önce deri kazıntılarında uyuz teşhis edilmiş olan köpeklerdeki deri lezyonlarında tedavi sonrası iyileşme durumu dikkati çekmiştir (Şekil 6, Şekil 7).



Şekil 6. Dördüncü köpekte görülen tedavi öncesi (A) ve tedavi sonrası (B) görüntüler.



Şekil 7. Beşinci köpekte görülen tedavi öncesi (A) ve tedavi sonrası (B) görüntüler.

Üçüncü ziyarette (14. gün) alınan numunelerde dışkıda yine birinci köpekte *Cystoisospora* spp. ookistleri görülürken deri kazıntısında önceki ziyaretimizde *Demodex* spp. görülen dördüncü ve beşinci köpeklerde herhangi bir etkene rastlanmamıştır.

4. Tartışma ve Sonuç

Köpeklerde yaş mama ile birlikte oral yolla antiparazitik ilaç uygulaması olumlu sonuçlanmıştır. Yaş mama ile verilen antiparazitik ilacın dış paraziter etken olan *Demodex* spp. uyuzu ile enfeste köpeklerin tedavisine olumlu yanıt verdiği görülmüştür. Yaş mama ile verilen antiparazitik ilacın etki edebileceği iç parazitlere rastlanmamış olup ilacın iç parazitlere etkisi üzerine herhangi bir sonuca ulaşılamamıştır. İlaçların köpeklere oral olarak verilmesinde, yaş mama ile birlikte uygulanması yöntem olarak kullanılabilir ve yeni araştırmalarla desteklenerek geliştirilebilir.

Teşekkür

Bu araştırma TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı kapsamında finansal olarak desteklenmiş olup araştırmamıza sağladığı destek için TÜBİTAK 'a şükranlarımızı sunarız.

References

1. Tamzok H, Kük M, Çobanoğlu M. Hukuki ve Etik Boyutlarıyla Sokak Hayvanları. Ankara Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi 2013; 4(1): 245-280. doi: 10.1501/sbeder_0000000056
2. Karakaya A, Çakmakkaya BY, Yılmaz Y. Hayvanlara Yönelik Şiddet Konusunda Bir Değerlendirme. Balkan & Near Eastern Journal of Social Sciences (BNEJSS) 2020; 6(Special Issue): 181-193.
3. Bulut B, Erkol M. İnsandan Hayvana ve Hayvandan İnsana Mağduriyetin Medyadaki Sunumunun Sosyolojik Analizi. Uluslararası Dorlion Akademik Sosyal Araştırmalar Dergisi (DASAD) 2023; 1(2): 418-444. doi: 10.5281/zenodo.10429361.
4. Meral M, Sarıtaş AA, Meral A, Genç A. Sokak Hayvanları İçin Nesnelerin İnterneti Tabanlı Akıllı Besleme Makinası. Int. J. of 3D Printing Tech. Dig. Ind. 2022; 6(1): 22-30. doi: 10.46519/ij3dptdi.1034375.
5. Cevizci S, Bakar C. Halk sağlığı bakışıyla *Toxoplasma gondii*. Türkiye Halk Sağlığı Dergisi 2013; 11(1): 45-58. doi: 10.20518/tjph.173076.
6. Moriello KA. Zoonotic skin diseases of dogs and cats. Animal health research reviews 2003; 4(2): 157-168. doi: 10.1079/AHRR200355
7. Toker F, Aksakal FNB. Açık Alan Rekreasyon Faaliyetleriyle İlgili Zoonoz Riski Algısı. Anatolia: Turizm Araştırmaları Dergisi 2023; 34(1): 7-20. doi: 10.17123/atad.1052492.
8. Arslan MÖ, Sarı B. Astigmata. Karaer KZ, Dumanlı, N. eds. In: Arthropodoloji. Ankara: Medisan Yayınevi, 2015; pp. 115-132.
9. Çırak VY. Parazitlerin tanı yöntemleri. Akyol, ÇV. eds. In: Temel veteriner parazitoloji. Eskişehir: Açıköğretim Yayınları, 2019; pp. 128-147.
10. Özcel MA. Genel parazitoloji. Özcel MA. eds. In: Veteriner hekimliğinde parazit hastalıkları (Vol-1). İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, 2013; pp.1-42.



Hayvansal Gıdalardan Elde Edilen *Kocuria Varians* İzolatlarının Biyofilm Üretim ve Antibakteriyel Direnç Profillerinin Araştırılması

Yasin ÖZKAYA¹ Dursun Alp GÜNDOĞ¹ Candan GÜNGÖR² Nurhan ERTAŞ ONMAZ²

¹ Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kayseri/Türkiye

² Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kayseri/Türkiye

◆ Geliş Tarihi/Received: 02.09.2024

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 30.09.2024

◆ Yayın Tarihi/Published: 31.12.2024

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Özkaya Y, Gündoğ D, Güngör C, Ertaş-Onmaz N. Hayvansal Gıdalardan Elde Edilen *Kocuria Varians* İzolatlarının Biyofilm Üretim ve Antibakteriyel Direnç Profillerinin Araştırılması. Bozok Vet Sci (2024) 5, (2):48-54.

Özet: Bu çalışmada, Kayseri ilinde bulunan perakende gıda satış merkezlerindeki et ve süt ürünlerinde doğal olarak bulunan veya starter kültür olarak kullanılan *Kocuria* spp. prevalansı, biyofilm oluşturma yetenekleri ve antibiyotik direnç profillerinin araştırılması amaçlandı. Bu kapsamda, satış merkezlerinden toplanan 70 adet hayvansal gıda örneklerinden seri dilüsyonlar halinde kanlı agar ekim yapıldı ve elde edilen farklı koloniler Phoenix otomatik sistemi (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) ile tanımlandı. Elde edilen izolatların biyofilm oluşturma yetenekleri, mikroploka yöntemi; antibiyotik duyarlılıkları ise disk difüzyon testi ile belirlendi. Analiz edilen 70 örneğin 5 (%7.14)'inde *Kocuria varians*, 1'inde (%1.42) *Corynebacterium matruchotii*, 1'inde (%1.42) *Corynebacterium jeikeium* ve 1'inde (%1.42) *Streptococcus oralis* belirlendi. Tanımlanan izolatlar arasında, et ürünlerinden izole edilen *K. varians* izolatları orta biyofilm oluşturma yeteneğine sahipken, peynirden elde edilen zayıf biyofilm özelliğine sahipti. Elde edilen *K. varians* izolatlarının tamamı oksasilin'e dirençli iken 4'ü (%80) linezolid ve rifampisine karşı da direnç göstererek çoklu ilaç direnç profili sergiledi. Bu izolatların ÇAD indeksi 0.43 olarak belirlendi. Sonuç olarak, bu çalışmada et ve süt ürünlerinden elde edilen *K. varians* izolatları biyofilm üretebilmeleri, çoklu antimikrobiyal direncine sahip olmaları ve gıda patojenlerine gen aktarımını artırabilme riski nedeniyle gıda güvenliği ve halk sağlığı sorunları oluşturabilir.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik direnç, biyofilm, gıda güvenliği, hayvansal gıda, *K. varians*

Investigation of Biofilm Production and Antibacterial Resistance Profiles of *Kocuria varians* Isolates from Animal Originated Foods

Abstract: This study aimed to determine the prevalence of *Kocuria* spp., which occur naturally or are used as starter cultures, in meat and dairy products sold in retail food outlets in Kayseri province, as well as to evaluate their biofilm formation capabilities and antibiotic resistance profiles. In this context, serial dilutions of 70 animal food samples collected from sales outlets were plated on blood agar, and the different colonies obtained were identified using the Phoenix automated system (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD). The biofilm-forming abilities of the isolates were determined using the microplate method, and their antibiotic susceptibilities were assessed by the disk diffusion test. Of the 70 analyzed samples, 5 (7.14%) were found positive for *Kocuria varians*, 1 (1.42%) for *Corynebacterium matruchotii*, 1 (1.42%) for *Corynebacterium jeikeium*, and 1 (1.42%) for *Streptococcus oralis*. Among the identified isolates, *K. varians* isolates from meat products exhibited moderate biofilm-forming ability, while those from cheese showed weak biofilm-forming ability. All *K. varians* isolates were resistant to oxacillin, and 4 isolates (80%) also exhibited resistance to linezolid and rifampicin, indicating a multidrug resistance profile. The Multiple Antibiotic Resistance index of these isolates was determined to be 0.43. In conclusion, the *K. varians* isolates obtained from meat and dairy products may pose food safety and public health concerns due to their ability to form biofilms, exhibit multidrug resistance, and the risk of gene transfer to foodborne pathogens.

Keywords: Antibiotic resistance, biofilm formation, food safety, animal products, *K. varians*

1. Giriş

Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalar, başta hayvansal gıda ürünleri olmak üzere, kontamine gıda maddelerinin tüketimi sonucunda gıda güvenliğini ve insanlarda hastalıklara neden olabildiğinden dolayı halk sağlığını olumsuz etkilemektedir (1). Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlara neden olan başta *Salmonella* ve *Campylobacter* cinsleri olmak üzere, en sık karşılaşılan bakteriler *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7,

Listeria monocytogenes, *Bacillus cereus*, *Clostridium* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp., *Brucella* spp. ve *Aeromonas* spp.'dir (1). Bu patojenlerin yanı sıra, et ve süt ürünlerinde bulunan *Kocuria* spp.'lerin bazı türleri de son zamanlarda giderek artan bir şekilde insan enfeksiyonlarının nedeni olarak bildirilmektedir (2).

Kocuria türleri, *Micrococcaceae* ailesi, *Actinomycetales* takımı ve *Actinobacteria* sınıfına ait katalaz pozitif ve koagülaz negatif Gram pozitif kokoid bakterilerdir (3).

Kocuria cinsine ait henüz 18 tür (*K. varians*, *K. rosea*, *K. kristinae*, *K. palustris*, *K. rhizophila*, *K. marina*, *K. polaris*, *K. aegyptia*, *K. carniphila*, *K. himachalensis*, *K. flava*, *K. turfanensis*, *K. atrinae*, *K. gwangalliensis*, *K. halotolerans*, *K. koreensis*, *K. coralli* ve *K. salsicia*) tanımlanmıştır (4). Çoğu *Kocuria* türü 20°C ile 37°C arasında ürerken, *K. aegyptia* ve *K. marina* ise sırasıyla 40°C ve 43°C'ye kadar üreyebilir. Buna karşılık, *K. polaris* 5°C'de büyüebilir. Çoğu suşu %5 NaCl'ye tolerans gösterir (4). Genellikle orofarenks, deri ve mukoza zarında kolonize olan bu kommensal mikroorganizmalar, et ve süt gibi gıda ürünlerinin yanı sıra, memeli derisi, tatlı su, deniz suyu, buzullar gibi soğuk habitatlardan veya derin su kaynaklarından izole edilmişlerdir (2,4,5). *Kocuria* türleri gıdalarda genellikle laktik asit bakterileriyle beraber izole edilirler (2,6). *Kocuria* cinsinde yer alan 18 tür arasında 5'inin (*K. kristinae*, *K. varians*, *K. rhizophila*, *K. rosea* ve *K. marina*) fırsatçı patojenler olduğu bilinmektedir ve daha çok bağışıklık sistemi baskılanmış, intravenöz kateter veya peritoneal diyaliz kullanan hastalarda tanımlanmıştır (7). Bu türlerden, *K. varians*, gıda endüstrisinde özellikle serbest amino asitlerin yıkımı ve yağ asitlerinin oksidasyonu ile bazı ürünlerin organoleptik benzersizliğine katkıda bulunabilir ancak aynı zamanda toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlardan da sorumludur (2,3,4,5,8,9). Etkenin en önemli virülans faktörlerinden birisi olan biyofilm oluşturma yetenekleri ve antibiyotik direnç mekanizmaları ile halk sağlığı açısından risk teşkil edebilirler (2). *K. varians* 'ın ve biyofilminin varlığının diğer mikroorganizmalardan farklı olarak, yüzeylerde *L. monocytogenes* 'in biyofilm oluşturmalarını desteklediği ortaya konmuştur (2). Buna ilaveten *Kocuria* türlerinin, oksasilin, penisilin, eritromisin, tetrasiklin gibi antibiyotiklere karşı direnç gösterdikleri rapor edilmiştir (6,10,11,12). Ayrıca bu türün bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda fırsatçı patojen olarak peritonitis ve beyin apsisi gibi hastalıklara neden olduğu bildirilmiştir (5). Bunun yanı sıra, *Kocuria* türleri ile koagülaz negatif stafilokoklar arasındaki fenotipik benzerlik nedeniyle, bu iki cins arasındaki yanlış tanımlama *Kocuria* türlerinin yetersiz tanısına yol açabilmektedir (8). Ancak matriksle desteklenmiş lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS), 16S rRNA gen sekanslama, VITEK (BioMerieux, NC, ABD), VITEK 2 (BioMerieux, NC, ABD) ve BD Phoenix™ otomatize sistemleri (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) gibi gelişmiş mikrobiyolojik tekniklerin kullanımı ile etkenin izolasyon oranı artmıştır (8,9). Ülkemizde, gıda kaynaklı mikroorganizmalardan *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* ve *L. monocytogenes* gibi mikroorganizmalara ile ilgili geniş bir bilgi yelpazesi vardır (13,14,15,16,17). Ancak, gıda kaynaklı *Kocuria spp.* gibi bazı mikroorganizmalarla ilgili yeterince bilgi bulunmamaktadır.

Bu kapsamda bu çalışma, Kayseri ilinde bulunan hayvansal ürün perakende satış merkezlerindeki et ve süt ürünlerinde

Kocuria cinsine ait türlerin Phoenix otomatik sistemi (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) ile belirlenmesi, elde edilen izolatların biyofilm oluşturma yeteneklerinin ve antibiyotik dirençlerinin belirlenerek bu mikroorganizmanın potansiyel gıda güvenliği ve halk sağlığı tehlikelerinin araştırılması amaçlandı.

2. Materyal ve Metot

Kayseri ilinde bulunan hayvansal ürün perakende satış merkezlerinden 10'ar adet kaşar peyniri, beyaz peynir, yoğurt, pastırma, salam, sosis ve sucuk olmak üzere toplam 70 örnek, aseptik koşullarda toplanarak (ISO/TS 17728:2015) soğuk zincir koşullarında Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Laboratuvarı'na getirilerek 1-2 saat içinde analiz edildi.

2.1. *Kocuria spp.* İzolasyonu

Bu amaçla, her numunedan 10 g alınarak 90 mL steril %0.1'lik peptonlu su (BPW, Oxoid, Birleşik Krallık) ilestomacher poşeti içerisinde homojenize edildikten sonra 30°C'de 5 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, kültürün on kat dilüsyonları (10⁻¹ -10⁻⁴) hazırlandı. Her bir dilüsyondan 0.1 mL alınarak kanlı agara (Merck, Almanya) ekildi ve 30° C'de 24-48 saat aerobik olarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında gelişen farklı morfolojideki koloniler kanlı agara subkültüre edilerek 30° C'de 24 saat inkübe edildi. Kanlı agarda hemoliz oluşturmayan, 2-3 mm boyutlarında, beyazımsı, küçük, yuvarlak formda olan koloniler, Gram boyama, hareket, katalaz, koagülaz testlerine tabi tutuldu (3,8). Fenotipik testler sonucunda elde edilen şüpheli koloniler BD Phoenix™ - Gram Positive ID Paneli (Becton Dickinson, ABD) kullanılarak Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesinde Phoenix sistemi (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda tür bazında tanımlandı.

2.2. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Çalışmada elde edilen izolatların antimikrobiyal duyarlılıkları, Kirby-Baur disk difüzyon yöntemi ile ticari antibiyotik diskleri (Oxoid, Basingstoke, İngiltere) kullanılarak belirlendi. Bu amaçla, doksisisiklin (30 µg), azitromisin (15 µg), penisilin (10 UI), rifamisin (5 µg), linezolid (30 µg), oksasilin (1 µg), klindamisin (2 µg) ve vankomisin (30 µg) antibiyotik kullanıldı (18). Kısaca, izolatlar kanlı agara (Merck, Almanya) ekilerek 1 gece 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, her bir izolata ait kolonilerden, bulanıklığı 0.5 McFarland standardına göre steril fizyolojik tuzlu su (%0.85 NaCl) ile ayarlandı. Elde edilen her bir süspansiyonun Mueller-Hinton agar (MHA, Merck, Almanya)'a yayma plak yöntemi ile ekilmesini takiben agarların üzerlerine antibiyotik diskler yerleştirilerek 24 saat 37°C'de inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonrasında, diskleri çevreleyen inhibisyon zon çapları ölçülerek kaydedildi. Duyarlılık yorumlanması için Klinik ve

Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) sınır değerleri kullanıldı (18). Çoklu Antibiyotik Direnç İndeksi (ÇAD indeksi), test izolatların her birinin dirençli olduğu antibiyotik sayısının çalışmada kullanılan toplam antibiyotik sayısına oranı olarak hesaplandı (19).

2.3. İzolatların Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi

İzolatların biyofilm oluşturma yetenekleri mikroplak (MP) yöntemi ile belirlendi (20). Özetle, izolatlar %2'lik glikoz içeren Tryptic Soy Broth (TSB, Merck, Almanya) içerisinde 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda bakteri kültürlerinin yoğunlukları 0,5 McFarland (~ 1 × 10⁸ kob/mL) standardına göre ayarlandı. Hazırlanan her bir bakteri süspansiyonundan 100'er µL alınarak 96 kuyucuklu, düz tabanlı ve steril polistiren mikrotitre plakasına eklendi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Kuyucukların birine pozitif kontrol olarak güçlü biyofilm üreten *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ilave edildi. Sadece steril TSB içeren kuyucuklar negatif kontrol olarak kullanıldı. İnkübasyonun ardından her bir kuyu boşaltılarak 250 µL fizyolojik tuzlu su ile üç tekrarlı şekilde yıkandı. Oluşan biyofilm yapısının fiksasyonu sağlamak için her bir kuyucuğa 200 µL %99'luk metanol (Merck, Almanya) eklendi ve 15 dakika bekletildi. Fiksasyon sonrası 30 dk boyunca kurutulan kuyucuklar, 200 µL %1'lik kristal viyole (Merck, Almanya) eklenerek 5 dakika boyunca boyandıktan sonra, tutunmayan

boyanın uzaklaştırılması amacı ile steril distile su ile yıkandı ve 30 dk kurumaya bırakıldı. Plakanın kurutulmasını takiben,

boyanın dağılması amacıyla kuyucuklara 160 µL %33'lük glasiyal asetik asit eklendi. Plakaların optik dansitesi (OD) 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucu (MultiskanFC-51119000, Thermo, ABD) kullanılarak ölçüldü. Her izolat ve kontrollerin analizleri üç tekrarlı yapıldı ve tekrarların ortalama OD'leri alınarak aşağıdaki formülde belirtildiği şekilde negatif kuyucukların cut off (sınır, OD_c) değeri ile kıyaslanarak biyofilm varlığı ve gücü belirlendi. Mikrotitre plaka testi için kesme OD (OD_c), negatif kontrolün ortalama OD'sinin üç standart sapma üzerinde olarak tanımlandı ve biyofilm özellikleri Stepanović ve ark. (20) tarafından tarif edildiği gibi şu şekilde sınıflandırıldı: OD ≤ OD_c biyofilm (-), OD_c < OD ≤ 2X OD_c zayıf biyofilm (+), 2X OD_c < OD ≤ 4X OD_c orta biyofilm (++), 4X OD_c < OD güçlü biyofilm (+++) oluşumu.

3. Bulgular

Çalışmada analiz edilen 70 hayvansal gıda örneğinden, yapılan konvensiyonel analizler sonucunda Gram pozitif, hareketsiz, katalaz pozitif ve koagülaz negatif özellikteki *Kocuria* spp. şüpheli 50 izolat elde edildi. BD Phoenix™ - Gram Pozitif ID Paneli ile analiz edilen izolatların %95-99 güven aralığında yapılan tanımlamaları sonucunda; 5 (% 10)'i *Kocuria varians*, 1 (%2)'i *Corynebacterium matruchotii*, 1 (%2)'i *Corynebacterium jeikeium* ve 1 (%2)'i *Streptococcus oralis* olarak belirlendi (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmada Analiz Edilen Örneklerde İzole Edilen Bakteriler

Analiz Edilen Örnek	İzole Edilen Bakteri ve Oranı (%)			
	<i>K. varians</i>	<i>C. matruchotii</i>	<i>C. jeikeium</i>	<i>S. oralis</i>
Kaşar peyniri (n=10)	-	-	-	-
Yoğurt (n=10)	-	-	-	-
Beyaz peynir (n=10)	1 (10)	-	-	1 (10)
Pastırma (n=10)	2 (20)	-	1 (10)	-
Salam (n=10)	1 (10)	-	-	-
Sosis (n=10)	-	1 (10)	-	-
Sucuk (n=10)	1 (10)	-	-	-
Toplam (n=70)	5 (7.14)	1 (1.42)	1 (1.42)	1 (1.42)

K. varians izolatlarının büyük çoğunluğu (%80;4/5) et ürünlerinden izole edilirken, yalnızca biri (%20;1/5) süt ürünlerinden izole edildi. Bu türün analiz edilen örneklerdeki dağılımı ise; %2 (2/10)'sı pastırma, %1 (1/10)'i sucuk, %1 (1/10)'i salamdan ve %1 (1/10)'i beyaz peynir örneği

şeklindeydi. Ayrıca, analiz edilen örneklerden beyaz peynir, pastırma ve sosiste sırasıyla *S. oralis* (n=1), *C. jeikeium* (n=1) ve *C. matruchotii* (n=1)'da belirlendi.

Çalışmada elde edilen *K. varians* izolatlarının tamamı biyofilm üretme özelliğine sahipti. Et ürünlerinden izole

edilen dört *K. varians* izolatı (%80; 4/5) orta düzeyde biyofilm oluşturma yeteneğine sahipken, peynirden elde edilen bir izolat (%20; 1/5) zayıf biyofilm oluşturma yeteneğine sahipti. Ayrıca *S. oralis* orta, *C. matruchotii* zayıf ve *C. jeikeium* güçlü biyofilm özelliği gösterdi (Tablo 2).

Çalışma kapsamında elde edilen *K. varians* izolatlarının tamamı oksasiline dirençli iken dört *K. varians* izolatı (%80) oksasilin'in yanında linezolid ve rifamisine karşı da direnç göstererek çoklu ilaç direnç (ÇAD) profili sergiledi (Tablo 2).

Tablo 2. Çalışmada elde edilen *K. Varians* izolatlarının kaynağı, biyofilm kabiliyeti ve antibiyotik direnç profili.

Bakteri Türü	İzole Edilen Kaynak	Pozitif İzolat Sayısı	İzolatlarının MPT'de Biyofilm Yapma Kabiliyeti (%)			Antibiyotik Direnç Profili	ÇAD indeksi =a/b
			Güçlü	Orta	Zayıf		
<i>K. varians</i>	Beyaz peynir	1	-	-	1 (100)	Oksasilin	-
	Pastırma	2	-	2 (100)	-	Rifamisin, Linezolid, Oksasilin	0.43
	Salam	1	-	1 (100)	-	Rifamisin, Linezolid, Oksasilin	0.43
	Sucuk	1	-	1 (100)	-	Rifamisin, Linezolid, Oksasilin	0.43
<i>S. oralis</i>	Beyaz peynir	1	-	1(100)	-	-	-
							0.43
<i>C. matruchotii</i>	Sosis	1	-	-	1(100)	Rifamisin, Linezolid, Oksasilin	-
<i>C. jeikeium</i>	Pastırma	1	1(100)	-	-	Penisilin, Oksasilin	-

4. Tartışma ve Sonuç

Kocuria spp.'nin gıdalarda giderek artan varlığı rapor edilmekte olup, diğer Gram pozitif koklarla olan yapısal ve biyokimyasal benzerlikleri nedeniyle izolasyonları ve kantifikasyonları gıda endüstrilerinde dikkate alınmamaktadır. *Kocuria* spp.'ler biyoteknolojik potansiyellerine rağmen, bu bakterilerin patojenik özellikleri ve biyofilm oluşturma kapasiteleri nedeniyle endüstriyel kullanımlarıyla ilgili endişeler bulunmaktadır (4,5). Bildiğimiz kadarı ile *Kocuria* cinsi bakterilerin hayvansal gıdalardaki prevalansına ait sınırlı sayıda bulunan önceki çalışmalarda daha çok süt ve süt ürünlerine odaklanılmıştır (2,6,12,21,22). Bu çalışmalardan, Machado ve ark. (6), pastörize edilmiş süt örneklerinin %25'inde, Rodriguez-Alonso ve ark. (12), analiz ettikleri peynir izolatlarının %3'ünde *K. varians* izolasyonunu rapor etmişlerdir. Bunun yanında, Organji ve ark. (21) inceledikleri çiğ süt örneğinin %40'ünde *K. rhizophila*, Weber ve ark. (23) süt çiftliklerindeki sağım makinelerinde *K. salsicia* izole etmişlerdir. Bahsi geçen çalışmalardan farklı olarak, bu

ÇAD profili sergileyen *K. varians* izolatlarının tamamı et ürünlerine aitti ve ÇAD indeksi 0.43 idi. Diğer yandan *K. varians* izolatların tamamı doksisisiklin, azitromisin, penisilin ve klindamisin'e duyarlı idi.

Benzer şekilde *C. matruchotii* ve *C. jeikeium* da oksasilin'e dirençliydi. Bunun yanında *C. matruchotii* rifamisin, ve linezolid'e, *C. jeikeium* ise penisiline dirençliydi. *S. oralis* ise test edilen tüm antibiyotiklere duyarlıydı (Tablo 2).

çalışmada hem süt hem de et ürünlerinde *Kocuria* spp. varlığı araştırıldı ve analiz edilen örneklerin %7.14'inde *K. varians* belirlendi. İzole edilen *K. varians*'ın 4'ü (%80) et ürünlerine (2 pastırma, 1 sucuk ve 1 salam) ve biri (%20) ise peynir örneğine aitti. Benzer şekilde, Gardini ve ark. (10) inceledikleri 53 kuru fermente edilmiş sosis örneklerinden %5.6'sında *K. kristinae* izole etmişler ve %3.77'sini de *Kocuria* cinsi düzeyinde tanımlamışlardır. Bu çalışmada *K. varians*'ın et ürünlerinde daha yaygın bulunması, Gardini ve ark. (10)'nın da belirttiği gibi hayvanların mukozasında ve derisinde kommensal olarak bulunan bu bakterilerin kesim işlemleri sırasında çapraz kontaminasyonla ete geçebileceğini ve dolayısı ile sucuk, salam ve pastırma üretimi için kullanılan ham maddenin yabancı mikrobiyotasını oluşturmuş olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca et kimyasal bileşimi nedeniyle kabul edilemez düzeylerde mikrobiyal büyümeyi desteklediğinden et ürünleri üretiminde kullanılan etin yüzeyindeki ilk mikroorganizma sayısı, süt pastörizasyonunda olduğu gibi azaltılamaz (24,25). Bu çalışmada etken süt ürünleri arasında sadece beyaz peynirden

izole edilirken kaşar peyniri ve yoğurttan izole edilememiştir. Türk beyaz peynirinin yüksek nem ve pH seviyesine sahip olması, onun kaşar peyniri gibi sert veya yarı sert ve nem oranı nispeten daha düşük peynirlere göre daha fazla mikrobiyal büyümeye eğilimli olmasına neden olmaktadır. Ayrıca beyaz peynir için kontaminasyonun diğer nedeni patojenlerin, kirlenmiş salamura suyu kullanımı ile peynire aktarılabilmesidir (26). Geleneksel Türk süt ürünü olan yoğurt ise düşük pH'ya sahip olması nedeniyle diğer süt ürünlerine göre mikrobiyal bozulmalara karşı daha dayanıklıdır (27).

Kocuria cinsi bakterilerin hayvansal gıdalardaki prevalansına ait sınırlı veri olmasının diğer ana sebebinin ise izole edilen bu cinsin diğer koagülaz negatif stafilokoklarla fenotipik benzerlikleri nedeni ile karıştırılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (8). *Kocuria* türlerinin tanımlanması amacıyla uygulanan moleküler analizlerin veya VITEK ve BD Phoenix™ otomatize sistemleri gibi geleneksel biyokimyasal fenotip bazlı sistemlerin uygulanması *Kocuria* türlerine ait izolatların tanımlanmasında etkili olduğu bildirilmektedir (8,9).

Gıdalardan izole edilen bakterilerin antimikrobiyal maddelere karşı direnci uzun zamandır büyük bir endişe kaynağıdır (2). Özellikle son yıllarda gıda zincirinin çoklu ilaç direncine sahip bakteriler için önemli bir kaynak oluşturduğu ve antibiyotik direncinin aktarımı üzerindeki etkileri iyi bir şekilde bilinmektedir (2).

Buna karşılık, gıdalardan izole edilen *Kocuria* suşlarının antibiyotik direncine ilişkin yeterli düzeyde çalışma olmaması bu türlerin halk sağlığı açısından oluşturulduğu riskin göz ardı edilmesine neden olmaktadır. Çalışmamızda izole edilen 5 *K. varians* izolatının hepsinin (%100), test edilen antibiyotiklerin en az birine dirençli olduğu ve bu izolatlardan 4'ünün oksasilin, linezolid ve rifamisine karşı çoklu direnç gösterdiği belirlendi. Benzer şekilde, İtalya'da fermente sosislerden izole edilen *Kocuria* türüne ait izolatların (10) ve Brezilya'da pastörize sütlerden izole edilen *K. varians* izolatlarının (6) çoklu antibiyotik direnci gösterdikleri belirtilmiş ve *K. varians* izolatlarının çoğunlukla klindamisin, kloramfenikol, penisilin ve tetrasikline karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (6). Fransa'da pastörize sütlerden elde edilen *Kocuria* türlerine ait izolatların makrolid grubu antibiyotikler ağırlıklı olmak üzere, test edilen antibiyotiklere karşı direnç gösterdikleri, beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı duyarlı oldukları belirtilmiştir (11). Bu çalışma bulgularının tam aksine, İspanya'da çiğ süttten yapılan el yapımı peynirlerden izole edilen *K. varians* izolatlarının beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç gösterdikleri ancak vankomisine karşı duyarlı oldukları gözlemlenmiştir (12). Çalışmalar arasındaki farklılıkların nedeni, örneklemenin yapıldığı yer, örneklem büyüklüğü ve çeşidi, örneklerin muhafaza koşulları, işleme şekilleri ve uygulanan analiz metotları ile ilgili olabileceği

gibi farklı bölgelerde kullanılan farklı antibiyotik türlerinin sık kullanımı ile ilişkilendirilebilir. Bununla birlikte, sadece patojen bakterilerin değil, et ürünlerinde, süt ürünlerinde, hazır gıdalarda probiyotik olarak önerilen bakteri suşlarının da antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilecekleri bildirilmiştir (28,29,30). Antibiyotik dirençli bu bakterilerin, direnç genlerini diğer türlere aktarılmasında rezervuar olarak rol alabileceğinden dolayı, besin zinciri boyunca antibiyotik direncinin genişlemesi açısından göz ardı edilemeyecek ciddi bir endişe yaratabileceği belirtilmiştir (30, 31). Bu çalışmada çoklu antibiyotik dirençli tüm izolatların ÇAD indeksinin 0.43 olması, bakterilerin izole edildiği gıdaların kaynağının sık antibiyotik kullanımına maruz kalan hayvanlar olduğunu ve bu bakterilerin gıda güvenliği ve halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturabileceğini göstermektedir. Antibiyotiklerin sıklıkla kullanıldığı bir kaynaktan gelen mikroorganizmalarda ÇAD indeksinin 0.2'den büyük, antibiyotikler seyrek kullanıldığı ya da hiç kullanılmadığı kaynaklarda ise bu indeksin 0.2'ye eşit veya daha küçük olduğu bildirilmiştir (19).

Çoklu antibiyotik direncinin yanı sıra gıda endüstrisinde oluşan biyofilmler, gıdaların bozulmasına ve/veya patojen mikroorganizmaların rezervuarı haline gelerek ekonomik ve halk sağlığı açısından sorunlara sebebiyet vermektedir (32). Mikroorganizmalar tarafından üretilen ekzopolisakaritler (EPS)'in genellikle biyofilmlerin yapısı ve stabilitesinde önemli bir role sahip olduklarına inanılmaktadır. Ayrıca, EPS üreten starter kültürler süt ve et ürünlerinin fermentasyonunda endüstriyel ölçekte kullanılmaktadır. Ancak starter kültürler tarafından üretilen EPS'nin, muhtemelen moleküler özelliklerindeki ve membranla etkileşimlerindeki farklılıklar nedeniyle, biyofilm oluşumu ile birebir ilişkili olmadığı belirtilmiştir (33, 34). Garcia-Fernandez ve ark. (33) test ettikleri laktik asit bakterisinin ST3534 suşunun, biyofilm oluşumunu destekleyen EPS üretirken, JFR+ suşunun ise bağlanma yeteneği ve biyofilm oluşumu azaltılmış EPS ürettiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, EPS üreten tüm starter kültürlerin biyofilm oluşturma yetenekleri açısından bir avantajı olmadığını bildirmişlerdir. *Kocuria* türlerinin, genellikle *Bacillus*, *Acinetobacter*, ve *Pseudomonas* gibi çeşitli bakterilerle beraber biyofilm oluşturulduğu bilinmektedir (2,35,36). Yapılan çalışmalarda *K. varians* ve *L. monocytogenes* tarafından paslanmaz metal yüzeylerde oluşturulan biyofilm yapısının incelenmesi sonucunda *L. monocytogenes* kolonilerinin *K. varians*'ın biyofilm yapısına tutundukları bildirilmiştir (37). Bu çalışmada, izole edilen 5 *K. varians* izolatlarının dördü orta, biri ise zayıf olmak üzere tamamının (%100) biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu belirlendi. Biyofilm üretme yeteneğine sahip bu izolatların çoğunun aynı zamanda çoklu ilaç direnci sergilemesi dikkat çekici idi. *Kocuria* türlerinin genellikle gıda ekipmanları ve yüzeylerden elde edildiği ve elde edilen izolatların orta ve güçlü düzeyde biyofilm oluşturdıkları bildirilmiştir (3). Buna

ek olarak gıda işleme ortamlarında oluşturulan biyofilmin et doğrama bölümünden izole edilen *Kocuria* türü bakterilerin diğer bakterilerle sinerjik etkisi ile oluşturulduğu ortaya konmuştur (32). Benzer şekilde, Weber ve ark. (23)'ün yaptıkları bir çalışmada, hayvansal gıda ve gıdalarla ilişkili ekipmanlarda (özellikle süt sağım makinalarındaki boru sistemleri) *Kocuria* cinsine ait türler ile başka bakteri cinsleri arasında etkileşimler olduğunu tanımlamıştır. Brezilya'da yürütülen bir çalışmada ise pastörize sütlerden elde edilen *K. varians* izolatlarının %31'inin biyofilm ürettiği bildirilmiştir (6). Genellikle gıda ekipmanları ve yüzeylerden elde edilmesine rağmen (38) gıdalardan da elde edilebilen *K. varians*'ın biyofilm oluşturma yeteneğinin, çoklu antibiyotik direnci ile gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından tehlike oluşturabileceği endişesini artırmaktadır.

Ayrıca bu çalışmada analiz edilen örneklerde tespit edilen diğer bakterilerden, *Corynebacterium* cinsi, çok sayıda insan ve hayvan patojenini içermesinin yanı sıra, toprak, bitki materyali, atık su ve süt ürünleri gibi çok çeşitli materyallerde tespit edilen patojenik olmayan türleri de içerir (22). *C. jeikeium*, özellikle risk grubunda yer alan bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar açısından çoklu ilaca dirençli ve son derece öldürücü bir patojendir. *C. jeikeium* penisilinler, sefalosporinler ve aminoglikozidlerle yapılan antibiyotik tedavisine dirençliyen, önerilen birincil tedavi rejimi olan vankomisine duyarlı olmaya devam etmektedir (39). *C. matruchotii*, in vitro mineralizasyonu tetikleyebilen kalsifiye edici bir bakteridir ve ağız boşluğundaki tüm anatomik bölgeler arasında en çok diş yüzeyindeki diş plağından izole edilir (40). Bu özelliğinden dolayı *C. matruchotii* iyi diş sağlığı ile ilişkilendirilmiştir ve *Streptococcus* türlerine yapışma yeteneği nedeniyle bazı biyofilm yapılarının organizasyonunda önemli olduğu varsayılmaktadır (41). *S. oralis*, tüm ağız içi yüzeylerden izole edilebilen, ağız mikrobiyotasının sayısal olarak önemli bir üyesidir ve dişlerin birincil kolonizasyonunda yer alan öncü bir mikroorganizmadır. *S. oralis*, nötrojenik kanser hastalarında subakut bakteriyel endokardit ve septiseminin önemli etiyojik ajanı olarak kabul edilmektedir (42). Dolayısıyla bu bakteri türlerinin biyofilm yetenekleri ve antibiyotik direnç profilleri nedeni ile çalışmamızda analiz edilen et ve süt ürünlerinde tespit edilmesi tüketici sağlığı açısından tehlike arz edebilir.

Sonuç olarak, *Kocuria* türleri gıdalarda istenilen tekstür ve lezzet özelliklerini sağlaması açısından starter kültür olarak ve biyoteknolojideki diğer kullanımları ile umut verici bir cins olarak tanımlanmaktadır. Ancak geliştirdiği antibiyotik direnci ve bu özelliklerin yatay gen aktarımı ile patojenik türlere aktarabilmesi, bunun yanında biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olması ve patojenlerin biyofilm oluşturmalarını desteklemesi nedeni ile bu bakterilerin endüstride kullanımıyla ve potansiyel gıda güvenliği riskleri ile ilgili endişeler mevcuttur. Bunun önüne geçilmesi için

istenilen fonksiyonel özelliklere sahip ve olumsuz özellikleri olmayan suşların genomik, proteomik, transkriptomik ve metabolomik olarak araştırılması gerekmektedir. Buna ilaveten, bu türün izolasyonunda ve tanımlanmasında yapısal ve biyokimyasal benzerlikleri nedeniyle karıştırılmaları, gıda endüstrisinde ve kliniklerde gözden kaçabilir. Bu nedenle, *K. varians*'ın endüstriyel kullanımı ve halk sağlığı açısından oluşturabileceği potansiyel risklerin belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. Abebe E, Gugsu G, Ahmed M. Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. *Journal of tropical medicine* 2020; 29: 4674235
2. Ramos GLDPA, Vigoder HC, dos Santos Nascimento J. *Kocuria* spp. in foods: biotechnological uses and risks for food safety. *Applied Food Biotechnology* 2021; 8(2): 79-88.
3. Ziogou A, Giannakodimos I, Giannakodimos A, Baliou S, Ioannou P. *Kocuria* Species Infections in Humans—A Narrative Review. *Microorganisms* 2023; 11(9): 2362
4. Meng X, Chen F, Xiong M, Hao H, Wang KJ. A new pathogenic isolate of *Kocuria kristinae* identified for the first time in the marine fish *Larimichthys crocea*. *Frontiers in Microbiology* 2023;14: 1129568.
5. Tsai CY, Su SH, Cheng YH, Chou YL, Tsai TH, et al. *Kocuria varians* infection associated with brain abscess: a case report. *BMC infectious diseases* 2010; 10: 1-4.
6. Machado MAA, Ribeiro WA, Toledo VS, Ramos GLPA, Vigoder HC, et al. Antibiotic resistance and biofilm production in catalase-positive gram-positive cocci isolated from brazilian pasteurized milk. *Journal of food quality and hazards control* 2020.
7. Youn HY, Seo KH. Isolation and characterization of halophilic *Kocuria salsicia* strains from cheese brine. *Food Science of Animal Resources* 2022; 42(2): 252.
8. Kandi V, Palange P, Vaish R, Bhatti AB, Kale V, et al. Emerging bacterial infection: identification and clinical significance of *Kocuria* species. *Cureus* 2016; 8(8).
9. Živković Zarić RS, Pejčić AV, Janković SM, Kostić MJ, Milosavljević MN, et al. Antimicrobial treatment of *Kocuria kristinae* invasive infections: Systematic re: a case report. *BMC infectious diseases* 2019; 10: 1-4.
10. Gardini F, Tofalo R, Suzzi G. A survey of antibiotic resistance in *Micrococcaceae* isolated from Italian dry fermented sausages. *Journal of Food Protection* 2003; 66(6): 937-945.
11. Perrin-Guyomard A, Soumet C, Leclercq R, Doucet-Populaire F, Sanders P. Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from pasteurized milk and characterization of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance genes. *Journal of food protection* 2005; 68(2): 347-352.
12. Rodriguez-Alonso P, Fernandez-Otero C, Centeno JA, Garabal JJ. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria and *Micrococcaceae*/*Staphylococcaceae* isolates from artisanal raw milk cheeses, and potential implications on cheese making. *Journal of food science* 2009; 7(6): M284-M293.
13. Gungor C, Barel M, Dishan A, Disli HB, Koskeroglu K, et al. From cattle to pastirma: Contamination source of methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) along the pastirma production chain. *LWT* 2021; 151: 112130.
14. Heybet Z, Ozkaya Y, Gundog DA, Gungor C, Onmaz NE. Animal-originated foods as Potential sources of multidrug-resistant diarrheagenic *E. coli* Pathotypes in Kayseri, Türkiye. *Food Control* 2024; 164: 110586.

15. Atabey C, Kahraman T, Koluman A. Prevalence and Antibiotic Resistance of Salmonella Spp., E. Coli O157, and L. Monocytogenes in Meat and Dairy Products. *Animal Health Production and Hygiene* 2021; 10(1): 17-22.
16. Al S, Barel M, Dışhan A, Karadal F, Hızlısoy H, et al. Tüketime Hazır Gıdalarda Listeria monocytogenes Varlığının Araştırılması. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2020; 17(2): 149-155.
17. Aydın F, Yağız A, Abay S, Müştak HK., Diker KS. Prevalence of Arcobacter and Campylobacter in beef meat samples and characterization of the recovered isolates. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 2020; 15: 15-25.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 2023; 28th edn.
19. Mir R, Salari S, Najimi M, Rashki A. Determination of frequency, multiple antibiotic resistance index and resistotype of Salmonella spp. in chicken meat collected from southeast of Iran. *Veterinary medicine and science* 2022; 8(1): 229-236.
20. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods* 2000; 40(2): 175-179.
21. Organji SR, Abulreesh HH, Elbanna K, Osman GE, Almalki MH. Diversity and characterization of Staphylococcus spp. in food and dairy products: a foodstuff safety assessment. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2018; 7(6): 586.
22. Khamis A, Raoult D, La Scola B. Comparison between rpoB and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of Corynebacterium. *Journal of clinical microbiology* 2005; 43(4): 1934-1936.
23. Weber M, Liedtke J, Plattes S, Lipski A. Bacterial community composition of biofilms in milking machines of two dairy farms assessed by a combination of culture-dependent and-independent methods. *PLoS One* 2019; 14(9): e0222238.
24. Kołożyn-Krajewska D, Dolatowski ZJ. Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochemistry* 2012; 47(12): 1761-1772.
25. Mladenović KG, Grujović MŽ, Kiš M, Furmeg S, Tkalec VJ, et al. Enterobacteriaceae in food safety with an emphasis on raw milk and meat. *Applied microbiology and biotechnology* 2021; 1-13.
26. Kızanlık PK. Microbiological quality evaluation of various types of cheese. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2018; 15(2): 86-93.
27. Çetin B, Atik A, Karasu S. Kırklareli'nde üretilen yoğurt ve ayranların fizikokimyasal ve mikrobiyolojik kalitesi. *Akademik Gıda* 2014; 12(2): 57-60.
28. Lukasova J, Sustackova A. Enterococci and Antibiotic Resistance. *Acta Vet. Brno* 2003; 72: 315-323.
29. Kastner S, Perreten V, Bleuler H, Hugenschmidt G, Lacroix C, et al. Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Systematic and applied microbiology* 2006; 29(2): 145-155.
30. Zarzecka U, Zadernowska A, Chajęcka-Wierzchowska W. Starter cultures as a reservoir of antibiotic resistant microorganisms. *Lwt* 2020; 127: 109424.
31. Ammor MS, Belén Flórez AB, Van Hoek AHAM, Los Reyes-Gavilán CGA, Aarts HJM, et al. Molecular Characterization of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology and Biotechnology* 2008; 14: 6-15.
32. Röder HL, Raghupathi PK, Herschend J, Brejnrod A, Knöchel S, et al. Interspecies interactions result in enhanced biofilm formation by co-cultures of bacteria isolated from a food processing environment. *Food Microbiology* 2015; 51: 18-24.
33. Garcia-Fernandez N, Hassan A, Anand S. Effect of exopolysaccharides produced by dairy starter cultures on biofilms formed on reverse osmosis membranes. *JDS communications* 2021; 2(3): 104-109.
34. Lu L, Zhao Y, Li M, Wang X, Zhu J, et al. Contemporary strategies and approaches for characterizing composition and enhancing biofilm penetration targeting bacterial extracellular polymeric substances. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2023.
35. Wagner EM, Fischel K, Rammer N, Beer C, Palmethofer AL, et al. Bacteria of eleven different species isolated from biofilms in a meat processing environment have diverse biofilm forming abilities. *International Journal of Food Microbiology* 2021; 349: 109232.
36. Sadiq FA, De Reu K, Yang N, Burmölle M, Heyndrickx M. Interspecies interactions in dairy biofilms drive community structure and response against cleaning and disinfection. *Biofilm* 2024; 7: 100195.
37. Midelet G, Kobilinsky A, Carpentier B. Construction and analysis of fractional multifactorial designs to study attachment strength and transfer of Listeria monocytogenes from pure or mixed biofilms after contact with a solid model food. *Applied and Environmental Microbiology* 2006; 72(4): 2313-2321. doi: 10.1128/AEM.72.4.2313-2321.2006
38. Lim ES, Lee JE, Kim JS, Koo OK. Isolation of indigenous bacteria from a cafeteria kitchen and their biofilm formation and disinfectant susceptibility. *LWT* 2017; 77: 376-382.
39. Pardo SMM, Patel RH, Ramsakal A, Greene J. Disseminated Corynebacterium jeikeium infection in cancer patients. *Cureus* 2020; 12(6).
40. Li Q, Zhou F, Su Z, Li Y, Li J. Corynebacterium matruchotii: a confirmed calcifying bacterium with a potentially important role in the supragingival plaque. *Frontiers in Microbiology* 2022; 13: 940643.
41. Almeida E, Puri S, Labossiere A, Elangovan S, Kim J, et al. Bacterial multispecies interaction mechanisms dictate biogeographic arrangement between the oral commensals Corynebacterium matruchotii and Streptococcus mitis. *Msystems* 2023; 8(5): e00115-23.
42. Do T, Jolley KA, Maiden MC, Gilbert SC, Clark D, et al. Population structure of Streptococcus oralis *Microbiology* 2009; 155(8): 2593-2602.



Investigation Of Zonulin Levels in Dogs Infected with Canine Distemper Virus

Ethem Mert ÇÖLLÜ¹, Tahip ÖZALP¹, Songül ERDOĞAN¹, Kerem URAL¹, HASAN ERDOĞAN¹✉

¹ Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine Aydın/Türkiye

◆ Geliş Tarihi/Received: 09.09.2024

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 11.12.2024

◆ Yayın Tarihi/Published: 31.12.2024

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Çöllü EM, Özalp T, Erdoğan S, Ural K, Erdoğan H. Investigation Of Zonulin Levels in Dogs Infected with Canine Distemper Virus. Bozok Vet Sci (2024) 5, (2):55-61.

Abstract: This study aims to investigate the impact of Canine Distemper Virus (CDV) infection on plasma zonulin levels, focusing particularly on how this effect varies in patients exhibiting neurological symptoms. The research involved evaluating 20 infected dogs and 10 healthy control dogs, all of which were brought to the Internal Medicine Clinics of Aydın Adnan Menderes University Veterinary Faculty for diagnosis and treatment. In this study, zonulin levels were found to be significantly elevated in patients with gastroenteritis or solely with neurological symptoms compared to the control group. These findings may suggest that the virus affects not only the gastrointestinal barrier but also the blood-brain barrier. This supports the hypothesis that these changes may contribute to the increased permeability of the blood-brain barrier.

Keywords: Distemper, Dog, Gut permeability, Zonulin

Kanin Distemper Virus ile Enfekte Köpeklerde Zonulin Seviyelerinin Araştırılması

Özet: Bu çalışma, Canine Distemper Virüs (CDV) enfeksiyonunun plazma zonulin seviyeleri üzerindeki etkisini, özellikle nörolojik semptomlar gösteren hastalarda nasıl değiştiğini araştırmayı amaçlamaktadır. Araştırmada, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Klinikleri'ne tanı ve tedavi için getirilen 20 enfekte köpek ve 10 sağlıklı kontrol köpeği değerlendirilmiştir. Enfekte köpeklerde zonulin seviyeleri, sağlıklı kontrollerden anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu bulgular, virüsün sadece gastrointestinal bariyeri değil, aynı zamanda kan-beyin bariyerini de etkilediğini önermektedir. Bu değişikliklerin kan-beyin bariyerinin artan geçirgenliğine katkıda bulunabileceği hipotezini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Bağırsak geçirgenliği, Distemper, Köpek, Zonulin.

1. Introduction

Canine distemper virus (CDV) is one of the most common and lethal infectious diseases in dogs. Although it is largely preventable through immunization, it remains a significant cause of mortality and morbidity, particularly in puppies, in shelters and crowded environments. The infection in dogs can range from mild to severe and may result in death in more than 50% of infected dogs (1). As the virus replicates in the lymph nodes, nervous system and epithelial tissue, various systemic symptoms arise. The inflammatory response that occurs plays a role in the development of neurological symptoms (2). Recent research provides strong evidence for the role of the gut-brain axis in the pathophysiology of neurodegenerative diseases (3,4). As a result, the integrity of the intestinal epithelial barrier is considered crucial in the microbiota-gut-brain pathway (5). The junctions between intestinal endothelial cells play a vital role in regulating the mucosal barrier and intercellular permeability. It has been proposed that increased intestinal permeability, along with genetic factors and environmental triggers, is an integral component in the pathogenesis of inflammatory bowel

diseases, including allergic, autoimmune and metabolic disorders (6,7). In this context, zonulin is highlighted as regulating the reversible permeability of these junctions, which manage intestinal permeability. Clinical studies have reported that zonulin is effective in identifying intestinal permeability as a biomarker (8,9). Zonulin, a major tight junction regulator in intestinal epithelial cells, also serves as a key protein in maintaining the function of the blood-brain barrier (5). Indeed, during COVID-19 and SARS-CoV-2 infections, zonulin has been reported to increase acute lung injury and the accumulation of neutrophils and cytokines by activating complement C3 and C5 components, which are held responsible for the uncontrolled activation of the complement system during clinical complications (10,11). Zonulin may impair the function of barriers in both brain tissue and the intestine by triggering inflammatory processes, potentially facilitating the spread of viruses (12). The role of zonulin in this process becomes even more critical in the context of neurodegenerative diseases and the neurological complications caused by COVID-19 (13). The potential role of zonulin in SARS-CoV-2 infection is supported by pathophysiological mechanisms linked to the disruption of

the blood-brain barrier and the associated neurological symptomatology (14).

It is hypothesized that CDV infection may contribute to neurological symptoms by affecting intestinal and blood-brain barriers. This study aims to investigate changes in plasma zonulin levels in dogs infected with CDV and to explore the effects of the infection on intestinal permeability.

2. Materials and Methods

This study was conducted with the approval of Aydın Adnan Menderes University Local Ethics Committee for Animal Experiments (HADYEK) under the approval number 64583101/2022/74.

2.1. Animal Material

Twenty dogs with CDV and ten healthy control dogs (aged 1-8 years) examined at Aydın Adnan Menderes University Faculty of Veterinary Medicine were included in the study. The diseased group consisted of dogs diagnosed with CDV using rapid test kits based on immunochromatographic methods, without comorbidities and exhibiting neurological symptoms. The healthy group included dogs that had received at least three doses of multivalent vaccines, underwent regular parasite treatment and were healthy without any specific metabolic diseases. Additionally, pregnant or lactating dogs, as well as those with comorbidities such as chronic liver damage or heart failure, were excluded from the study.

2.2. Methods

Blood samples were collected from the *V. cephalica antibrachii* into vacuum tubes containing lithium heparin using an appropriate technique, following the anamnesis and clinical examinations of the dogs. Upon completion of the hematological and biochemical analyses of the collected blood samples, the remaining samples were centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes to isolate the plasma, which was then stored at -80°C. The nasal and conjunctival samples of the dogs were tested for CDV-Ag using a rapid test (Bioguard Corporation®, Taiwan) by the manufacturer's protocol. To rule out diseases that could cause symptoms similar to CDV, fecal swabs were collected and tested for Canine Coronavirus and Canine Parvovirus antigens (Asan Easy Test CCV/CPV®, ASAN Pharm. Co., Korea) following the procedure.

Zonulin analyses were performed on the frozen plasma samples using ELISA test kits after thawing them at room temperature, following the manufacturer's instructions. The ELISA kit was left at room temperature for 30 minutes. The concentrated wash solution was diluted at a ratio of 1:25 and 1.0 ml of diluent was added to the zonulin standard sample, which was then dissolved. Three hundred µL of standard diluent was added to seven tubes and they were mixed; the eighth tube was designated as the negative control. The biotinylated antibody solution and enzyme-conjugate fluid were prepared and diluted as required. Color reagents A and B were mixed. The strips were incubated by adding 100 µL of the sample or zonulin standard to the wells and incubating them at 37°C for 90 minutes. The biotinylated antibody was added and incubated at 37°C for 50 minutes. Enzyme-conjugate fluid was added and incubated at 37°C for 60 minutes. The ELISA plate was washed five times, then 100 µL of color reagent was added and incubated in the dark. When the color deepened, measurements were taken, and absorbance values were read. A standard curve was drawn, and sample concentrations were calculated.

Descriptive statistics and normality tests were performed on the data obtained in the study. Descriptive statistics are presented in the table. The Shapiro-Wilk test determined that the data did not show normal distribution. Although logarithmic transformation processes were applied, the data were still found to be non-normally distributed. Differences between the groups were determined using the Mann-Whitney U test. All analyses were performed using the SPSS 22.0 program and differences were considered significant when the p-value was less than 0.05.

3. Results

3.1. Clinical Findings

The demographic findings of the animal groups included in our study are presented in Table 1. Lethargy and ocular discharge were observed in 10 cases out of 20 in the patient group, while nasal discharge and coughing were noted in 9 cases. Eight dogs exhibited symptoms of dyspnea and anorexia and vomiting and diarrhea were observed in 5 dogs. Myoclonus was present in all cases. It was determined that lethargy and ocular discharge (n=10) were the most commonly observed clinical signs. Vomiting and diarrhea (n=5) were found to be less frequent compared to other clinical findings.

Table 1. Demographic data of infected and healthy dogs.

Patient Number	Age	Breed	Gender	Healty Number	Age	Breed	Gender
1	3	Mixed	Female	1	3	Mixed	Male
2	1	Mixed	Male	2	3	Mixed	Female
3	1	Mixed	Male	3	2	French Bulldog	Male
4	2	Mixed	Female	4	5	Golden Retriever	Male
5	1	Mixed	Male	5	4	Labrador Retriever	Female
6	4	Mixed	Female	6	3	Labrador Retriever	Female
7	2	Mixed	Male	7	7	Mixed	Female
8	2	Mixed	Female	8	8	Mixed	Male
9	1	Mixed	Female	9	1,5	Mixed	Male
10	2	Mixed	Female	10	3	Pomeranian	Male
11	3	Mixed	Male				
12	1	Mixed	Female				
13	6	Mixed	Female				
14	4	Mixed	Male				
15	4	Mixed	Female				
16	1	Mixed	Female				
17	1	Mixed	Male				
18	1	Mixed	Male				
19	1	Mixed	Female				
20	2	Mixed	Male				

3.2. Hematological Findings

The hematological parameters considered in the study are presented in Table 2. It was observed that the WBC counts of the infected dogs were significantly higher ($p=0.01$) than those in the healthy group, although this increase was not significant in NEU and LYM. RBC, HCT and HGB levels were statistically significantly higher ($p<0.05$) in the healthy

dogs compared to the infected dogs. In parallel with these parameters, MCH and MCHC levels were also significantly higher ($p=0.024$) in healthy dogs compared to the infected ones. It was determined that the changes in platelet and platelet indices did not show any statistically significant differences.

Table 2. The average hematological values of the infected and healthy dogs.

Parameter	Infected	Healthy	<i>P</i> value
	$\bar{X} \pm SH$	$\bar{X} \pm SH$	
WBC (10^9)/L	16,80 \pm 1,69	10,27 \pm 0,95	0,01
NEU (10^9)/L	4,70 \pm 1,06	2,10 \pm 0,17	0,155
LYM (10^9)/L	0,57 \pm 0,09	0,40 \pm 0,07	0,286
MON (10^9)/L	11,23 \pm 1,40	6,83 \pm 0,53	0,049
EOS (10^9)/L	0,20 \pm 0,04	0,08 \pm 0,01	0,422
BAS (10^9 /L)	0,05 \pm 0,01	0,03 \pm 0,004	0,948
RBC (10^{12})/L	6,47 \pm 0,36	7,98 \pm 0,29	0,022
HGB (g/dL)	12,82 \pm 0,57	18,03 \pm 0,46	0,001
HCT (%)	43,83 \pm 2,58	54,00 \pm 1,96	0,017
MCV (fl)	67,47 \pm 0,87	68,00 \pm 2,37	0,914
MCH (pg)	20,18 \pm 0,43	22,89 \pm 1,11	0,024
MCHC (g/dL)	29,97 \pm 0,71	33,71 \pm 1,37	0,024
PLT (10^9)/L	322,86 \pm 30,34	302,70 \pm 37,40	0,681
MPV (fl)	9,86 \pm 0,26	9,78 \pm 0,48	0,475
PCT (%)	0,30 \pm 0,02	0,29 \pm 0,03	0,619

3.3. Zonulin Levels

When plasma zonulin levels were examined, it was found that the zonulin levels of infected dogs were significantly higher ($p=0.001$) compared to healthy dogs (Figure 1). The mean plasma zonulin level in infected dogs was 22.6 ± 1.38 ng/mL, while the plasma zonulin levels in the healthy control group were 2.06 ± 0.41 ng/mL (Table 3).

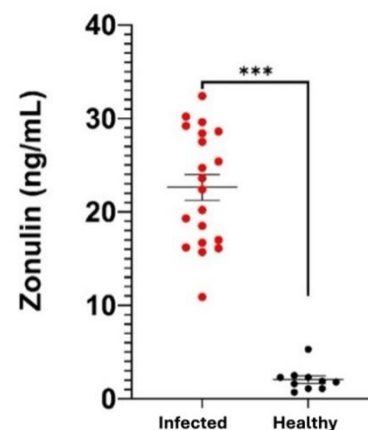
**Figure 1.** Plasma zonulin levels in infected and healthy dogs.

Table 3. Plasma zonulin levels in infected and healthy dogs.

Parameter		Infected	Healthy
Zonulin (ng/mL)	Average	22,6	2,06
	Standard	1,38	0,41
	Error		
	CI (%95)	19,7 - 25,5	1,14 - 2,98
	P Value	0,001	

4. Discussion

Canine distemper virus is an agent that can manifest with systemic symptoms related to the gastrointestinal and/or respiratory systems, along with central nervous system involvement (15,16). Clinical findings include anorexia, fever, nasal/ocular discharge, coughing, dyspnea, vomiting and diarrhea (17,18). These findings can occur in combination and neurological symptoms may appear without systemic signs (16,19). In our study, clinical signs such as myoclonus, lethargy, vomiting, diarrhea, coughing, dyspnea and ocular and nasal discharge were evaluated. Respiratory system signs, particularly nasal discharge, ocular discharge, coughing and dyspnea, were identified as the dominant clinical signs (20,21). Lethargy and ocular discharge were observed in 50% of the dogs, while respiratory symptoms were present in 9/20 and 8/20 cases, respectively. Gastrointestinal signs were seen in 20% of the cases. While neurological signs were present in all infected dogs, no signs such as circling or tetraplegia were observed. The symptoms encountered were found to be consistent with previous studies (22, 23,24,25,26). While the agent leads to the loss of B and T cells, Buragohain (2017) reported that WBC and lymphocyte counts were within the normal range (27). Other studies have shown a significant decrease in monocyte counts and an increase in granulocytes in dogs infected with CDV, which has been associated with secondary bacterial infections and inflammatory reactions (28,29,30). In our study, it was determined that the WBC values of infected dogs were higher than those of healthy dogs and these changes could reflect secondary bacterial infections. Additionally, high antibody levels and clinical findings suggest that the disease is complicated by secondary infections, which are associated with prolonged cases (31). In our study, the red blood cell parameters of dogs infected with CDV were found to be significantly lower compared to healthy dogs. Studies have reported that CDV causes anemia in infected animals due to bone marrow suppression and the depression of progenitor cells (27,32,33). The decrease in MCH and MCHC values reflects microcytic hypochromic anemia and these findings are consistent with the results obtained by Headly and Sukura

(2009) and Buragohain (2017) (27,34). The effects of the canine distemper virus on the central nervous system are often associated with neurological disorders and a poor prognosis. Neurological signs can appear without other systemic symptoms, with the virus primarily targeting the myelin tissues in the brain and spinal cord. Demyelination typically occurs three weeks after the onset of infection, but it can manifest earlier in cases without immunosuppression or inflammation (35,36). Due to its affinity for lymphoid tissues, the virus enters the body through various pathways, including the gastrointestinal system and may influence neurological symptoms depending on the host condition. Gastrointestinal changes affect gut permeability, microflora and the enteric nervous system (37,38,39). Alterations in the gut microbiota facilitate communication between the enteric and central nervous systems, maintaining the integrity of body barriers (40,41,42).

The permeability of the blood-brain barrier is used as a mechanism of damage by many viruses (43,44). This barrier is regulated by glial cells and is sensitive to external stimuli (45). Disruption of the blood-brain barrier leads to neurological diseases and infections of brain tissue (46,47). Microbial translocation and gut dysbiosis have been associated with viral infections and COVID-19 (48,49). It has been reported that zonulin levels are lower in patients with COVID-19 compared to those who have recovered. Additionally, zonulin has been closely associated with the breakdown of the blood-brain barrier in patients with multiple sclerosis and was found to be related to gut permeability and disease severity (3). An interesting possibility is that zonulin may have a systemic effect on epithelial barriers other than the intestinal barrier. An *in-vitro* study demonstrated that zonulin could increase the permeability of both the intestinal and blood-brain barriers through similar mechanisms (50) and in a rodent model, zonulin was found to increase the permeability of the blood-lung barrier *in-vivo* (11). Similarly, studies conducted in diarrheic dogs, including those with distemper, have shown increased plasma/serum zonulin levels (39,51,52). In line with these findings, our study also found significantly elevated zonulin levels in distemper-positive dogs (22.6 ± 1.38 ng/mL) characterized by neurological signs compared to healthy dogs (2.06 ± 0.41 ng/mL) ($p=0.001$).

Conclusion

It was observed that zonulin, a tight junction regulator, could be a sensitive marker of increased intestinal and blood-brain barrier permeability and it might play a significant role in mediating the gut-brain axis in the pathogenesis of neuroinflammatory canine distemper virus (CDV) disease in dogs. Future studies should not only focus on serum zonulin levels but also include cerebrospinal fluid (CSF) sampling to monitor both plasma and CSF zonulin levels, which could

contribute to understanding the mucosal barrier-related pathophysiological processes of the disease.

Acknowledgment

This study is a summary of a section from the Master's thesis entitled "Investigation of Zonulin Levels in Dogs Infected with Canine Distemper Virus," conducted at the Department of Internal Medicine, Institute of Health Sciences, Aydın Adnan Menderes University.

Funding:

This study was supported by the Scientific Research Projects Unit of Aydın Adnan Menderes University under project number VTF – 23022.

References

- Newbury S, Larson LJ, Schultz RD. Canine Distemper Virus. In: Infectious Disease Management in Animal Shelters, Wiley and Blackwell, 2009, p.161-173.
- De Nardo TF, Bertolo PH, Bernardes PA, Munari DP, Machado GF, Jardim LS, et al. Contribution of astrocytes and macrophage migration inhibitory factor to immune-mediated canine encephalitis caused by the distemper virus. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2020, 221, 110010.
- Camara-Lemarro CR, Silva C, Greenfield J, Liu WQ, Metz LM, Yong VW. Biomarkers of intestinal barrier function in multiple sclerosis are associated with disease activity. *Multiple Sclerosis Journal*, 2020, 26(11), 1340-1350.
- Zişler J, Rothhammer V, Linnerbauer M. Gut–Brain Interactions and Their Impact on Astrocytes in the Context of Multiple Sclerosis and Beyond. *Cells*, 2024, 13(6), 497.
- Veres-Székely A, Szász C, Pap D, Szebeni B, Bokrossy P, Vannay Á. Zonulin as a potential therapeutic target in microbiota-gut-brain axis disorders: encouraging results and emerging questions. *International journal of molecular sciences*, 2023, 24(8), 7548.
- Arrieta MC, Bistriz L, Meddings JB. Alterations in intestinal permeability. *Gut*, 2006, 55(10), 1512-1520.
- Sapone A, de Magistris L, Pietzak M, Clemente MG, Tripathi A, Cucca F, et al. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes*, 2006, 55(5), 1443-1449.
- Fasano A. Intestinal permeability and its regulation by zonulin: diagnostic and therapeutic implications. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2012, 10(10), 1096-1100.
- Sturgeon C, Fasano A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue barriers*, 2016, 4(4), e1251384.
- Noris M, Benigni A, Remuzzi G. The case of complement activation in COVID-19 multiorgan impact. *Kidney international*, 2020, 98(2), 314-322.
- Rittirsch D, Flierl MA, Nadeau BA, Day DE, Huber-Lang MS, Grailer JJ, et al. Zonulin as prehepato-globin2 regulates lung permeability and activates the complement system. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2013, 304(12), L863-L872.
- Llorens S, Nava E, Muñoz-López M, Sánchez-Larsen Á, Segura T. Neurological Symptoms of COVID-19: The Zonulin Hypothesis. *Frontiers in immunology*, 2021, 12, 665300.
- Widera D, Martínez Aguilar R, Cottrell GS. Toll-Like Receptor 4 and Protease-Activated Receptor 2 in Physiology and Pathophysiology of the Nervous System: More Than Just Receptor Cooperation?. *Neural Regeneration Research*, 2019, 14(7), 1196-1201.
- Bocsik A, Walter FR, Gyebrovski A, Fülöp L, Blasig I, Dabrowski S. Reversible Opening of Intercellular Junctions of Intestinal Epithelial and Brain Endothelial Cells With Tight Junction Modulator Peptides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 105(2), 754-765.
- Amude AM, Alfieri AA, Balarin MRS, Faria dos Reis AC, Alfieri AF. Cerebrospinal fluid from a 7-month-old dog with seizure-like episodes. *Veterinary Clinical Pathology Journal*, 2006a, 35, 119-122.
- Tipold A, Vandavelde M, Jaggy A. Neurological manifestations of canine distemper virus infection. *Journal of Small Animal Practice*, 1992, 33(10), 466-470.
- Amude AM, Carvalho GA, Balarin MRS, Arias MVB, Faria dos Reis AC, Alfieri AA, et al. Canine distemper encephalomyelitis in dogs without systemic signs of the disease – preliminary studies in three cases. *Clinica Veterinaria*, 2006b, 60, 60-66.
- Dewey CW. *Practical Guide To Canine and Feline Neurology* (2nd ed.). Ames, Iowa, USA: Wiley Blackwell, 2008.
- Amude AM, Alfieri AA, Arias MVB, Alfieri AF. Clinical syndromes of nervous distemper in dogs initially presented without conventional evidences of CDV infection. *Semina-Ciencias Agrarias*, 2012, 33(6), 2347-2358.
- Schobesberger M, Summerfield A, Doherr MG, Zurbriggen A, Griot C. Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. *Vet Immunology & Immunopathology*, 2005, 104, 33-44.
- Elia G, Camero M, Losurdo M, Lucente MS, Larocca V, Martella V, et al. Virological and serological findings in dogs with naturally occurring distemper. *Journal of virological methods*, 2015, 213, 127-130.
- Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Baumgaertner W, Lekkas S, Kontos V. Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. *Journal of comparative pathology*, 2002, 126(1), 47-56.
- Gebara CMS, Wosiacki SR, Negrao FJ, de Oliveira DB, Beloni SNE, Alfieri AA. Detection of canine distemper virus nucleoprotein gene by RT-PCR in urine of dogs with distemper clinical signs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 2004, 56(4), 480-487.
- Martella V, Elia G, Buonavoglia C. Canine distemper virus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 2008, 38(4), 787-797.
- Zhao J, Shi N, Sun Y, Martella V, Nikolin V, Zhu C. Pathogenesis of canine distemper virus in experimentally infected raccoon dogs, foxes and minks. *Antiviral Research*, 2015, 122(1), 11.
- Saaed MM, Al-Obaidi QT. Clinical, Hematological and Some Biochemical Changes in Dogs Infected With Canine Distemper. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 2021, 14(5), 26-33.
- Buragohain M, Goswami S, Kalita DJ. Clinicopathological findings of canine distemper virus infection in dogs. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2017, 5(6), 1817-1819.
- Beineke A, Puff C, Seehusen F, Baumgärtner W. Pathogenesis and Immunopathology of Systemic and Nervous Canine Distemper. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 2009, 127, 1-18.
- Berghoff N, Steiner JM. Laboratory tests for the diagnosis and management of chronic canine and feline enteropathies. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice*, 2011, 41, 311-328.

30. Yama T, Rajesh JB, Prasad H, Rajkhowa TK, Sarma K, Roychoudhury P, et al. Scholarly View of Canine Distemper Cases in Mizoram. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2020, 9(9), 3260-3266.
31. Devi T, Asokkumar M, Bharathi MV, Ramesh A. Prognostic Factorial Index for Dogs with Canine Distemper. *Indian Journal of Animal Research*, 2024, 1(5).
32. Bohn AA. Diagnosis of disorders of iron metabolism in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice*, 2013, 43(6), 1319-1330.
33. Carter CM. Alterations in Blood Components. *Comprehensive Toxicology*, 2018, 249-293.
34. Headley SA, Sukura A. Naturally occurring systemic canine distemper virus infection in a pup. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 2009, 2(2), 95-101.
35. Vandeveld M, Zurbriggen A, Higgins RJ, Palmer D. Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper. *Acta neuropathologica*, 1985, 67(3-4), 211-218.
36. Müller CF, Fatzer RS, Beck K, Vandeveld M, Zurbriggen A. Studies on canine distemper virus persistence in the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 1995, 89(5), 438-445.
37. Delucchi L, Fraga M, Zunino P. Effect of the probiotic *Lactobacillus murinus* LbP2 on clinical parameters of dogs with distemper-associated diarrhea. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2017, 81(2), 118-121.
38. Paul AEH, Stayt J. The intestinal microbiome in dogs and cats with diarrhoea as detected by a faecal polymerase chain reaction-based panel in Perth, Western Australia. *Australian veterinary journal*, 2019, 97(10), 418-421.
39. Şardağ D. Köpeklerde gastroenteritise neden olan bazı enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz hastalıklarda serum ve fekal zonulin seviyelerinin tespiti. Doktora Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2022.
40. Macfarlane S, Dillon JF. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of applied microbiology*, 2007, 102(5), 1187-1196.
41. O'Hara JR, Ho W, Linden DR, Mawe GM, Sharkey KA. Enteroendocrine cells and 5-HT availability are altered in mucosa of guinea pigs with TNBS ileitis. *American Journal of Physiology Liver Physiology*, 2004, 287, 998-1007.
42. Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and clinical implications of the brain gut enteric microbiota axis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2009, 6, 306-314.
43. Idris F, Muharram SH, Zaini Z, Alonso S, Diah S. Invasion of a Murine in Vitro Blood-Brain Barrier Co-Culture Model by Dengue Virus Serotypes 1 to 4. *Archives of Virology*, 2019, 164(4), 1069-1083. doi: 10.1007/s00705-019-04175-3.
44. Robinson CP, Busl KM. Neurologic Manifestations of Severe Respiratory Viral Contagions. *Critical Care Explorations Journal*, 2020, 2(4), 107.
45. Daneman R, Rescigno M. The Gut Immune Barrier and the Blood-Brain Barrier: Are They So Different?. *Immunity*, 2009, 31(5), 722-735.
46. Zlokovic BV. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron*, 2008, 57(2), 178-201.
47. Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiological Reviews*, 2019, 99(1), 21-78.
48. Chancharonthana W, Leelahavanichkul A, Ariyanon W, Vadcharophaswattanakul S, Kamolratanakul S. Leaky gut syndrome is associated with endotoxemia and serum (1→3)-β-D-Glucan in severe dengue infection. *Microorganisms*, 2021, 9(11), 2390.
49. Giron LB, Dweep H, Yin X, Wang H, Damra M, Goldman AR. Plasma markers of disrupted gut permeability in severe COVID-19 patients. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12, 779064. doi: 10.3389/fimmu.2021.686240.
50. Rahman MT, Ghosh C, Hossain M, Linfield D, Rezaee F, Janigro D, et al. IFN-γ, IL-17A, or zonulin rapidly increase the permeability of the blood-brain and small intestinal epithelial barriers: Relevance for neuro-inflammatory diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 507(1-4), 274-279.
51. Şahin N. Gastrointestinal inflamasyonlu köpeklerde serum diamin oksidaz, zonulin, laktat ve D-dimer seviyelerinin tespiti. Doktora Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2023.
52. Şen T. İshalli köpeklerde gastrointestinal biyobelirteçlerin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2021.



Köpeklerde Atopik Dermatit, Leishmaniazis ve Demodikoziste Klinik Skorlamaların Araştırılması

 Selahattin KARAOĞLU¹  Kerem URAL¹✉

¹ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Aydın/Türkiye

◆ **Geliş Tarihi/Received:** 02.09.2024

◆ **Kabul Tarihi/Accepted:** 30.09.2024

◆ **Yayın Tarihi/Published:** 31.12.2024

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Karaoğlu S, Ural K. Köpeklerde Atopik Dermatit, Leishmaniazis ve Demodikoziste Klinik Skorlamaların Araştırılması. Bozok Vet Sci (2024) 5, (2):62-68.

Özet: Bu çalışmada, klinik demodikozis, kanin viseral leishmaniazis (KVL) ve atopik dermatitli (Ad) köpeklerde her bir hastalığa özgü olarak demodikozis klinik skorlaması, canine leishmaniazis klinik skor ve CADESI-04 klinik skorlamaları değerlendirildi. Farklı ırk, yaş ve cinsiyetteki 26 köpek (5 demodikozis, 12 CVL, 9 Ad) değerlendirildi. Her hastalık grubunda kabul görmüş klinik skorlamalar kullanılarak, rutin değerlendirmeler kapsamında hematolojik ve biyokimyasal analizler, deri kazıntısı, hızlı testler ve sitolojik incelemeler yapıldı. Ad' li köpeklerde en yoğun lezyonlar aksilla ve abdominal bölgede, KVL'li köpeklerde ise en sık lenfadenomegali ve onikogriphosis gözlemlendi. Demodikozisli köpeklerde ise en şiddetli lezyonlar arka bacaklar ve boyun bölgesinde tespit edildi. Çalışmada, veteriner hekimlerin dermatolojik klinik skorlamalar ile hastalığın seyrinin objektif olarak değerlendirilebileceği ve bu sayede etkili tedavi stratejileri geliştirebileceği sonucuna ulaşıldı.

Anahtar Kelimeler: Dermatoloji, Köpek, Klinik skorlama

Investigation of Clinical Scoring in Dogs with Atopic Dermatitis, Leishmaniasis, and Demodicosis

Abstract: This study evaluated the clinical scoring systems specific to each disease in dogs with clinical demodicosis, canine visceral leishmaniasis (CVL), and atopic dermatitis (Ad), including the demodicosis clinical scoring, canine leishmaniasis clinical score, and CADESI-04. Twenty-six dogs of different breeds, ages, and genders (5 with demodicosis, 12 with CVL, and 9 with Ad) were evaluated. Accepted clinical scoring systems were used in each group, and routine evaluations included hematological and biochemical analyses, microscopic examination of skin scrapings, rapid tests, and cytological examinations. In dogs with Ad, the most intense lesions were observed in the axillary and abdominal regions, while lymphadenopathy and onychogryphosis were the most common findings in dogs with CVL. In dogs with demodicosis, the most severe lesions were found on the hind limbs and neck. This study concludes that veterinarians can use dermatological clinical scoring to objectively assess disease progression, thereby developing more effective treatment strategies.

Keywords: Dermatology, Dogs, Clinical scoring

1. Giriş

Veteriner hekimler, teşhis ve sağaltımda dermatolojik klinik skorlamaları kullanarak yapılan veya yapılacak olan sağaltımın ve prognozun dereceli göstergesini elde edebilmektedir. Bu skorlamalar, dermatolojik durumları objektif bir şekilde değerlendirmek ve sağaltıma verilen yanıtı izlemek için kullanılmaktadır. Bu sayede, veteriner hekimler hastalarının deri sağlığıyla ilgili detaylı bilgiler elde edebilmekte ve etkili tedavi stratejileri geliştirebilmektedir. Dermatolojik klinik skorlamaların kullanımı, hastalar arasında karşılaştırmalar yapmayı ve sağaltım süreçlerini daha etkili bir şekilde yönetmeyi sağlayabilmektedir (1-4).

Leishmaniosis, *Leishmania* (Kinetoplasta, Trypanosomatidae) cinsine ait protozoonlar tarafından şekillenen vektör kaynaklı hastalıktır (5). *L. infantum*, dünya genelinde hem veteriner hem de insan sağlığı açısından büyük

önem taşıyan hastalığın ana etkenidir ve köpekler hastalık için ana rezervuar konakçı olarak hastalık döngüsünde önemli yer tutmaktadır (5,6). Köpeklerde visceral leishmaniazis (CVL) birkaç ay ile birkaç yıl arasında değişen bir süre boyunca gelişebilmekte ve bu durum çeşitli klinik bulgular ile sonuçlanabilmektedir (6). Hastalığın klinik bulguları da subklinik veya asemptomatik enfeksiyondan tam anlamıyla belirgin hastalığa kadar değişen ve konakçının bağışıklık yanıtına bağlı olarak farklı semptomlar ile kendini gösterebilmektedir (7). Uygun klinik sınıflandırma sistemlerinin, CVL'li köpeklerde prognoz, tedavi ve uygun yönetimin sağlanması ve epidemiyolojik ve klinik çalışmaların karşılaştırılmasını kolaylaştırmak için gerekli olduğu bildirilmiştir (8). Bunlar arasında klinik 26 farklı klinik semptomun 0-3 arasında puanlanarak değerlendirildiği araştırmadan (9), genel durum, kutanöz, viseral, oral, kas-iskelet sistemi ve diğer bulgular kapsamında lezyonların

şiddetine göre skorlamaların ele alındığı klinik skorlama sistemleri ele alınmıştır (10).

Köpeklerde atopik dermatit (Ad), genetik olarak yatkınlık gösteren, yangı ve kaşıntı ile karakterize alerjik deri hastalığıdır. Çevresel alerjenlere karşı IgE antikorlarının üretimi ile sıklıkla ilişkilidir (11). Bu sebeple Ad ile gıda alerjik reaksiyonlar arasında yakın bir ilişki bildirilmektedir (12). Ad' nin en yaygın ve klinik olarak önemli özelliği, genellikle eritem, eritematöz makül ve/veya papül, alopesi, eksskrasyon, hiperpigmentasyon ve likenifikasyon ile görülen ve tipik olarak öncesinde yer alan orta ila şiddetli kaşıntıdır (13,14). Beraberinde sekonder deri enfeksiyonları da gelişebilmektedir. Derideki lezyonların dağılımı ırklara göre değişiklik gösterebilse de, genellikle yüz, kulak kepçeleri, kulak kanalları, patiler, koltuk altları, karın bölgesi ve kasık bölgelerini içerir (13,15). Ad'nin klinik belirtileri genellikle 3 yaşından önce ortaya çıkmakta, yıl boyunca devam edebilmekte veya mevsimsel etkilenebilmektedir. Ayrıca birçok diğer kaşıntılı ve yangısal deri hastalığı ile örtüşebilmektedir (13). Ne yazık ki, Ad teşhisi koymak için kullanılacak kesin bir tanı testi veya patognomik bir klinik bulgu bulunmamaktadır (14). Bu sebeple Ad' li köpeklerde sağaltım etkinliğinin klinik değerlendirilmesinde deri lezyonlarının aşamalarına göre şiddet ölçeklendirmelerinden CADESI-04 kullanımı uygun, basit ve kolay puanlama sistemi olarak kabul edilmektedir (16).

Köpeklerde demodikozis, *Demodex canis* akarlarının neden olduğu infeksiyöz bir deri hastalığıdır (17). Hastalık genellikle genç köpeklerde, özellikle kısa tüylü ırklarda yaygın görülmektedir (18). Köpeklerde demodikozis, genel ve lokalize olmak üzere iki formda ortaya çıkmaktadır (19). Lokalize form, genellikle tüysüz bölgelerde, özellikle burun, yüz, bacaklar ve göz çevresinde başlayan lezyonlarla karakterizedir ve tedavi gerektirmeyebilir. Genel formda ise en yaygın belirtiler eritem, alopesi, hiperkeratoz, püstüller, kabuklanma ve sekonder enfeksiyonlar gibi komplikasyonlar görülebilir (20). İlişkili lezyonların değerlendirmesinde son yıllara kadar geçerlilik kazanmamış sistemlerden olan ve lezyon karakteri ve şiddetine dayanan köpeklerde demodikozisteki klinik skorlama sistemi, 2021 yılında geçerlilik kazanmıştır (2).

Bu araştırmanın amacı klinik demodikozisli, CVL' li ve Ad' li köpeklerde dermatolojik klinik skorlamaların uygulanması ve hastalık profilinin araştırılmasıyla primer ve sekonder deri lezyonlarının klinik skorlamalarının hastalığın şiddeti ve takibi hakkında bize nasıl yol gösterdiğinin ortaya konulmasıdır.

2. Materyal ve Metot

Bu çalışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) 64583101/134 onay numarası ile gerçekleştirilmiştir.

2.1. Hayvan Materyali

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Kliniğine Ekim 2022-Mayıs 2024 tarihleri arasında getirilen farklı ırk, yaş ve cinsiyetten, dermatolojik problemler (kaşıntı, eritem, alopesi, komedon, papül, püstül, kabuklanma v.b.) kapsamında incelemeye alınan köpeklerden, 9 adet Ad, 12 adet CVL ve 5 adet demodikozis teşhisi koyulan hastalar çalışmaya alınmıştır. Çalışma kapsamına dahil edilen köpekler her iki cinsiyetten (n=14 dişi, n=12 erkek), farklı yaş gruplarından ve ırklardan [1.5-9 yaş; Ad grubunda 2-7 yaş; n=5 melez, n=2'şer Golden Retriever ve Alman Çoban, demodikozis grubunda 1.5-8 yaş, n=2 melez, n=1'er French Bulldog, Kangal, Miniature Schnauzer, CVL grubunda ise 3-9 yaş, n=2 melez, n=3 Airdale Terrier, n=4 Labrador Retriever, n=1'er Cane Corso, Doberman, Av Köpeği] teşekkül edildi.

2.2. Rutin Klinik Değerlendirmede Tanı

Dermatolojik lezyonlara sahip köpeklerde demodikozis, KVL ve Ad tanısının konulabilmesi ve ayırıcı tanı kapsamında hematolojik ve biyokimyasal analizler, derinin fiziksel makroskobik muayenesi, deri kazıntısının mikroskobik muayenesi, serum hızlı test analizi (Snap leishmania®, Idexx, USA), lenf yumrusu aspiratı örneklerinin incelenmesi ele alındı. Bu değerlendirmeler kapsamında hastalar aşağıda belirtilen tanı kriterlerine tabii tutuldu.

Köpeklerde Viscreal Leishmaniazis: Pozitif hızlı test kitleri veya lenf yumrusu aspiratında amastigot varlığı,

Demodikozis: Nivea burun bandı ile alınan örneklerde mikroskobik incelemede Demodeks etkenlerinin görülmesi,

Atopik Dermatit: Favrot (14) kriterlerinden en az 5'inin sağlanması (yaş <3, evde yaşama, glikokortikoid yanıtı, kronik mantar enfeksiyonu, ön bacaklarda lezyon, kulak marjiniinde lezyon olmama, iç kulakta lezyon, dorso-lumbar bölgede lezyon olmama).

2.3. Klinik Skorlamalar

2.3.1. Atopik Dermatit Skoruması

Kliniğe dermatolojik şikâyet ile getirilen köpeklerden Ad belirlenen 9 köpek CADESI-04 skorlamasına tabii tutuldu (16).

2.3.2. Demodikozis Skoruması

Dermatolojik şikâyet ile getirilen köpeklerden demodikozis teşhisi konulan 5 köpeğin dermatolojik skorlaması Dengler ve diğerleri (2)' nin hazırladığı klinik skorlama tablosuna göre skorlandı. Bu skorlamada 36 farklı vücut bölgesinde eritem, komedon-papül-püstül, foliküler kast-çizik-kabuklanma, alopesiyi içeren lezyon karakterine göre yok (0),

hafif (1–2), orta (3–4) ve şiddetli (5–6) olarak 0-6 arasında puanlanma yapıldı.

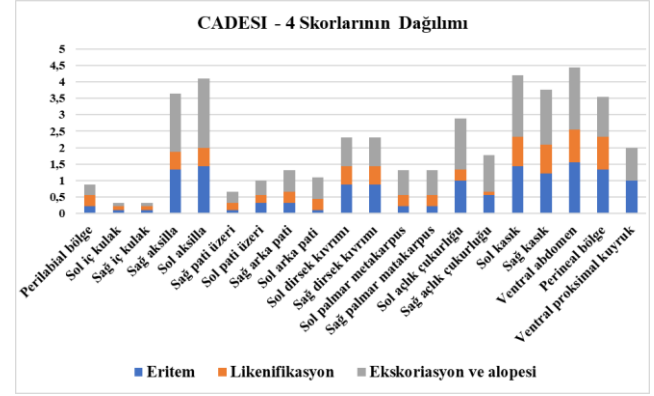
2.3.3. Köpek Visceral Leishmaniaziste Skorlama

Burun bölgesi hiperkeratozu, ornikogrifozis, ülser, nodül, depigmentasyon, hiperpigmentasyon, ayaklarda hiperkeratoz v.b. şikâyet ile getirilen köpeklerden CVL teşhisi konulan 12 adet köpek, dos Santos Nogueira ve diğerleri (1) tarafından hazırlanan klinik skorlama tablosuna göre skorlandı. Bu skorlamada CVL' li köpeklerde yaygın görülen 21 farklı semptomdan iştahsızlık, poliüri-polidipsi, epistaksis, splenomegali, kusma, sindirim problemleri, üveitis, keratitis, artrit/topallık semptomları varlığı (1) veya yokluğuna (0); diğer semptomlardan ornikogrifozis, kilo kaybı, konjunktivitis, blefaritis, lenfadenopati, ülser, nodül, depigmentasyon, hiperpigmentasyon, ayaklarda hiperkeratoz, nazal hiperkeratoz-ülserasyon ise yokluk (0), hafif (1), yoğun (2), şiddetli (3) durumuna göre puanlandı.

3. Bulgular

3.1. Atopik Dermatitiz Skorlama

Çalışma kapsamında değerlendirilen ve Ad tanısı konulan 9 köpekte CADESI-04' e göre lezyonların bölgesel dağılımı Şekil 1' de gösterildi. Benzer şekilde olguların lezyonlara göre bölgesel skorlamalarına ait ortalamalar da Tablo 1' de sunuldu.



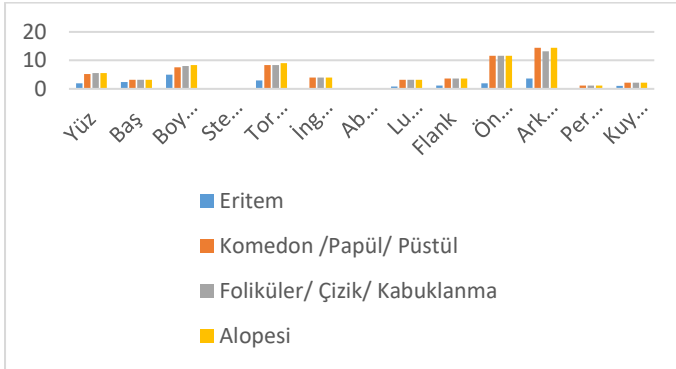
Şekil 1. CADESI-04 lezyon skorlarının bölgesel dağılımı.

Tablo 1. Ad tanısı konulan 9 köpeğe ait CADESI-04' e göre ortalama klinik skorlama.

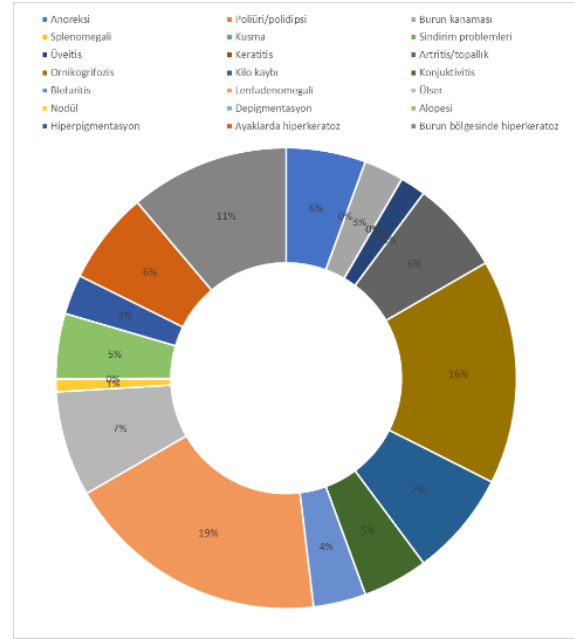
Bölge	Ortalama Toplam Klinik Skor		
	Eritem	Likenifikasyon	Ekskoriasyon ve alopesi
Perilabial bölge	0.22	0.33	0.33
Sol iç kulak	0.11	0.11	0.11
Sağ iç kulak	0.11	0.11	0.11
Sağ aksilla	1.33	0.55	1.77
Sol aksilla	1.44	0.55	2.11
Sağ pati üzeri	0.11	0.22	0.33
Sol pati üzeri	0.33	0.22	0.44
Sağ arka pati	0.33	0.33	0.66
Sol arka pati	0.11	0.33	0.66
Sol dirsek kıvrımı	0.88	0.55	0.88
Sağ dirsek kıvrımı	0.88	0.55	0.88
Sol palmar metakarpus	0.22	0.33	0.77
Sağ palmar metakarpus	0.22	0.33	0.77
Sol aklık çukurluğu	1	0.33	1.55
Sağ aklık çukurluğu	0.55	0.11	1.11
Sol kasık	1.44	0.88	1.88
Sağ kasık	1.22	0.88	1.66
Ventral abdomen	1.55	1	1.88
Perineal bölge	1.33	1	1.22
Ventral proksimal kuyruk	1	0	1

3.2. Demodikozis Skorumla

Demodikozisli 5 olguda yapılan klinik skorlamalarda alopesi, papül püstül ve kabuklanmanın en şiddetli olarak başta arka bacaklar sonra ön bacaklar ve daha sonraki sırada boyun ve thoraks bölgesinde olduğu tespit edildi. Eritem ise en şiddetli arka bacaklar ve boyun daha sonra toraks bölgesinde tespit edildi (Tablo 2, Şekil 2).



Şekil 2. Demodikozisli 5 olgunun bölgesel lezyonel dağılımı.



Şekil 3. KVL klinik skorlarının dağılımı.

Tablo 2. Demodikozisli 5 olgunun bölgesel ve lezyonel ortalaması.

Bölge	Eritem	Komedon /Papül/ Püstül	Foliküler/ Çizik/ Kabuklanma	Alopesi
Yüz	2	5.2	5.6	5.6
Baş	2.4	3.2	3.2	3.2
Boyun	5	7.6	8	8.4
Sternum	0	0	0	0
Toraks	3	8.4	8.4	9
İnguinal	0	4	4	4
Abdomen	0	0	0	0
Lumbo dorsal	0.8	3.2	3.2	3.2
Flank	1.2	3.6	3.6	3.6
Ön bacaklar	2	11.6	11.6	11.6
Arka bacaklar	3.6	14.4	13.2	14.4
Perianal/ genital	0	1.2	1.2	1.2
Kuyruk	1	2.2	2.2	2.2

3.3. Köpek Visceral Leishmaniaziste Skorumla

Kliniğe getirilen 12 adet KVL'li köpeğin klinik skorlamaları yapıldıktan sonra olgularda lenfadenomegali ve ornitokriyofiz en yoğun klinik skor olarak, nodül ve üveitis

en düşük yoğunluktaki skor olarak tespit edildi. Poliüri/polidipsi, splenomegali, kusma ve depigmentasyon klinik skorlamada tespit edilmedi. KVL'li olguların klinik skorlarının yüzdesel oran grafiği Şekil 3'de, ortalama klinik skor dağılımları da Tablo 3' de verildi.

Tablo 3. KVL ile enfekte köpeklerin ortalama klinik skorları

Klinik Bulgular	TOPLAM	ORTALAMA
Anoreksi	6	0.5
Poliüri/polidipsi	0	0
Burun kanaması	3	0.25
Splenomegali	0	0
Kusma	0	0
Sindirim problemleri	0	0
Üveitis	2	0.16
Keratit	0	0
Artrit/topallık	7	0.58
Ornikogrifozis	17	1.41
Kilo kaybı	8	0.66
Konjunktivitis	5	0.41
Blefaritis	4	0.33
Lenfadenomegali	20	1.66
Ülser	8	0.66
Nodül	1	0.08
Depigmentasyon	0	0
Alopesi	5	0.41
Hiperpigmentasyon	3	0.25
Ayaklarda hiperkeratoz	7	0.58
Burun bölgesinde hiperkeratoz/ ülserasyon	12	1

3. Tartışma

Bu çalışma, veteriner dermatoloji alanında farklı hastalıklara sahip köpeklerde klinik skorlamaların uygulanabilirliğini ve klinik takipteki etkinliklerinin ortaya koymayı amaçlamaktadır. Genel olarak klinik skorlamalar, deri lezyonlarının şiddeti ve bölgesel dağılımına dayanan bir sistematik değerlendirme ile yapılmaktadır. Lezyonların bölgesel dağılımı ve şiddetine göre sayısal ölçütler kullanılarak, hastalığın ciddiyeti belirlenmektedir (21-24). Veteriner dermatolojide farklı hastalıklar için çok sayıda klinik ölçüt ele alınmaktadır (2,21). Çalışmamızda, demodikozis, CVL ve Ad tanısı konmuş köpeklerde, primer ve sekonder deri lezyonlarına yönelik klinik skorlamaların, hastalıkların seyrine dair değerli bilgiler sunduğunu belirledik.

Demodikozisli olgularda yaptığımız klinik skorlamalarda, alopesi, papül, püstül ve kabuklanmanın en şiddetli olarak

arka bacaklarda, ardından ön bacaklar, boyun ve thoraks bölgelerinde ortaya çıktığını tespit ettik. Eritem ise arka bacaklar ve boyun bölgelerinde en yoğun olarak görüldü. Bu bulgular, demodikozisin deri lezyonlarının bölgesel dağılımına göre şiddetinin değerlendirilebileceğine olanak sağlamıştır.

KVL'nin serolojik ve moleküler tanı yöntemleri, sınırlı kaynaklara sahip endemik bölgelerde bulunmayabilir ve teşhis sadece klinik belirtilere dayanabilir. Bu tür bölgelerde klinik skorlamalar, özellikle KVL pozitif köpeklerde, teşhis sürecinde önemli bir yer tutmaktadır (1,24). Çalışmamızda, KVL pozitif köpeklerde en yaygın klinik bulgular olarak lenfadenomegali ve ornikogrifozis saptanmıştır. Buna karşılık, nodül ve üveitis gibi bulgular daha düşük yoğunlukta görülmüştür. Bu sonuçlar, KVL'nin klinik skorlamalarının, sınırlı tanı imkanlarına sahip bölgelerde, özellikle lenfadenomegali ve ornikogrifozis gibi bulgulara dayalı tanıda veteriner hekimler için önemli bir rehber olabileceğini

göstermektedir. Ancak, tanı testleri bu klinik skorlamaları tamamlayıcı nitelikte olmalı ve kesin tanı için mutlaka laboratuvar doğrulaması yapılmalıdır.

Atopik dermatit olgularında, Favrot (14) kriterleri temel alınarak yapılan klinik skorlamalarında CADESI-04 skorlama sistemi kullanıldı (16). Ad'li köpeklerde, en yaygın lezyonlar eritem olup, özellikle aksiller, kasık ve abdominal bölgelerde yoğunlaştığı tespit edildi. Likenifikasyon ise perineal, abdominal ve kasık bölgelerinde yoğun şekilde görülürken, ekskoriasyon ve alopesi de belirgin olarak sağ sol aksillar ve kasık bölgelerinde bulundu. Bu bulgular, Ad'ın klinik skorlamalarıyla hastalığın seyri ve tedaviye yanıtın etkin bir şekilde izlenebileceğini ortaya koymaktadır.

Demodikozisli köpeklerde lezyonları değerlendirmek için farklı klinik skorlama sistemleri kullanılmıştır (25). Skorlama sistemleri genellikle alopesi, eritem, püstüller, papüller ve pullanmaların şiddetine göre yapılmaktadır (26). Dengler ve diğerleri (2), doğrulanmış bir klinik skorlama sistemi geliştirmişlerdir; ancak bu sistemin derin piyoderma gibi parametreleri içermemesi, demodikozisin tüm yönlerini kapsamadığını göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan klinik skorlama sistemi, demodikozisin lezyonlarının yaygınlığını ve şiddetini güvenilir bir şekilde değerlendirebilmiştir. Dengler ve diğerleri (2), akar sayısının tedavi başarısını izlemek için iyi bir gösterge olduğunu ve klinik skorlama ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

5. Sonuç

Sonuç olarak, bu çalışmada köpek demodikozisi için kullanılan klinik skorlama sistemi, sahada çalışan veteriner hekimler için pratik bir araç olabilir. Bu sistem, metodolojik tutarlılığı sağlayarak daha büyük ölçekli çalışmalar arasında sonuçların karşılaştırılmasına ve meta-analiz yapılmasına olanak tanıyabilir. Ayrıca, klinik skorlamalar, hastalığın ilerleyişini nesnel bir şekilde izlemek ve tedavi etkinliğini değerlendirmek için önemli bir yol sunmaktadır (1,20).

Klinik skorlama sistemlerinin doğruluğu ve güvenilirliği, özellikle sınırlı kaynaklara sahip bölgelerde, doğru tanı ve tedavi stratejilerinin belirlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. KVL'nin serolojik ve moleküler tanı yöntemleri her zaman erişilebilir olmayabilir, bu nedenle klinik skorlamalar, tanıyı destekleyici önemli bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (23).

Teşekkür

Bu çalışma, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda yürütülen "Köpeklerde Atopik Dermatitis, Leishmaniazis ve Demodikoziste Klinik Skorlamaların Araştırılması" başlıklı yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Destek:

Bu çalışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF - 23021 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

Kaynaklar

- dos Santos Nogueira F, Avino VC, Galvis-Ovallos F, Pereira-Chioccola VL, Moreira MAB, et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites & Vectors*, 2015, 12, 1-11.
- Dengler B, Mendoza-Kuznetsova E, Nikolaeva L, Rieger A, Mueller RS. Evaluation Of A Clinical Scoring System For Canine Demodicosis. *Veterinary Dermatology*, 2021, 32(4), 311-E84.
- Cugmas B, Olivry T. Evaluation of skin erythema severity by dermatoscopy in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 2021, 32(2), 183-e46.
- Szczepanik M, Wilkołek P, Gołyński M, Sitkowski W, Taszkun I, Toczek W. The influence of treatment with lokivetmab on transepidermal water loss (TEWL) in dogs with spontaneously occurring atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 2019, 30(4), 330-e93.
- Baneth G, Nachum-Biala Y, Shabat Simon M, Brenner O, Gaier S, et al. *Leishmania major* infection in a dog with cutaneous manifestations. *Parasites & Vectors*, 2016, 9, 1-5.
- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 2009, 165(1-2), 1-18.
- Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2009, 128(1-3), 87-95.
- Meléndez-Lazo A, Ordeix L, Planellas M, Pastor J, Solano-Gallego L. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. *Research in Veterinary Science*, 2018, 117, 18-27.
- Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, 2008, 24(8), 371-377.
- Medkour H, Laidoudi Y, Lafri I, Davoust B, Mekroud A, et al. Canine vector-borne protozoa: Molecular and serological investigation for *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., *Babesia* spp., and *Hepatozoon* spp. in dogs from Northern Algeria. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 2020, 19, 100353.
- Halliwell R. Revised nomenclature for veterinary allergy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 114(3-4), 207-208.
- Pucheu-Haston CM, Bizikova P, Eisenschenk MN, Santoro D, Nuttall T, Marsella R. The role of antibodies, autoantigens and food allergens in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 2015, 26(2), 115-e30.
- Bizikova P, Santoro D, Marsella R, Nuttall T, Eisenschenk MN, Pucheu-Haston CM. Clinical and histological manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 2015, 26(2), 79-e24.
- Favrot C, Steffan J, Seewald W, Picco F. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology*, 2010, 21, 23-31.
- Wilhem S, Kovalik M, Favrot C. Breed-associated phenotypes in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 2011, 22, 143-9.
- Olivry T, Saridomichelakis M, Nuttall T, Bensignor E, Griffin CE, Hill PB. International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Veterinary Dermatology*, 2014, 25(2), 77-85.
- Mueller RS, Rosenkrantz W, Bensignor E, Karaş-Tęcza J, Paterson T, Shipstone MA. WAVD Clinical consensus guidelines for demodicosis. 2018.
- Rahman M, Bostami MB, Datta A, Sabuj AAM, Rana EA, et al. Estimation of the prevalence and determination of risk factors associated with demodicosis in dogs. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 2021, 8(1), 116.
- Gartner A, Dărăbuş G, Badea C, Hora F, Tilibasa E, Mederle N. Clinical diagnosis in canine demodicosis. A new approach. *Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine*, 2015, LXI (2), 76-80.
- Gortel K. Update on canine demodicosis. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 2006, 36(1), 229-241.
- Plant JD, Gortel K, Kovalik M, Polissar NL, Neradilek MB. Development and validation of the Canine Atopic Dermatitis Lesion Index, a scale for the rapid scoring of lesion severity in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 2012, 23, 515-e103.
- Manna L, Reale S, Vitale F, Gravino AE. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Research in Veterinary Science*, 2009, 87(1), 76-78.
- Silva KRD, Mendonça VRRD, Silva KM, Nascimento LFMD, Mendes-Sousa AF, et al. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2017, 112(1), 53-63.
- Beugnet F, Halos L, Larsen D. Efficacy of oral afoxolaner for the treatment of canine generalised demodicosis. *Parasite*, 2016, 23(14), 1-8.
- Lebon W, Beccati M, Bourdeau P, Brement T, Bruet V, et al. Efficacy of two formulations of afoxolaner (NexGard® and NexGard Spectra®) for the treatment of generalised demodicosis in dogs, in veterinary dermatology referral centers in Europe. *Parasites & Vectors*, 2018, 11, 1-10.
- Zanette MF, Lima VF, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RFC. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum* chagasi tests in dogs. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2014, 47, 105-107



İki Farklı Ağır Metalin (Bakır ve Çinko) Tıbbi Sülükler (*Hirudo Verbana*) ve Salya Antimikrobiyal Özellikleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Erdal YILMAZ¹ Ebubekir ATICI²

¹ Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri/Türkiye

² Kayseri İl Tarım ve Orman Müdürlüğü, Kayseri/Türkiye

◆ Geliş Tarihi/Received: 11.12.2024

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 16.12.2024

◆ Yayın Tarihi/Published: 31.12.2024

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Yılmaz E, Atıcı E. İki Farklı Ağır Metalin (Bakır ve Çinko) Tıbbi Sülükler (*Hirudo Verbana*) ve Salya Antimikrobiyal Özellikleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması. *Bozok Vet Sci* (2024) 5, (2):70-75.

Özet: Araştırmada çinko ve bakır metallerinin farklı konsantrasyonlarının tıbbi sülükler üzerindeki etkileri incelenmiştir. 10 litrelik kaplara 15 adet olacak şekilde stoklanan tıbbi sülükler (*Hirudo verbana*) bakır ve çinko metallerinin letal dozların altında belirlenen farklı iki doza maruz bırakılmıştır. Çinko ve bakır için 96 saatlik muamele dozları sırası ile 3.0 mg/L ile 12 mg/L ve 0.15 mg/L ile 0.6 mg/L iken; 30 günlük muamelelerde 0.5 mg/L ile 2.0 mg/L ve 0.02 mg/L ile 0.08 mg/L olarak uygulanmıştır. Bu uygulamalardan sonra sülüklerden alınan salya örneklerinin antimikrobiyal karakteristiği, ağır metal birikimleri ve malondialdehyde (MDA) düzeyleri analiz edilmiştir. Çalışmada sülük salyasının balık patojenlerinden *Lactococcus garviae* ve *Yersinia ruckeri*'ye karşı herhangi bir antimikrobiyal etki göstermediği belirlenmiştir. Tıbbi sülüklerin çinko ve bakır metallerine maruz kaldıklarında dokularında depolanan ağır metal miktarlarının arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca çinko ve bakırın farklı konsantrasyon ve sürelerde maruziyetinde sülük salyasında malondialdehit değerlerinin de artış gösterdiği bulunmuştur. Elde edilen verilerden *H. verbana* türü tıbbi sülüğün çinko ve bakır ağır metalleri için iyi bir biyo-monitör organizma olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Ağır metal, Antimikrobiyal, *Hirudo verbana*, Malondialdehit, Tıbbi sülük

The Investigation of The Effect of Two Different Heavy Metals (Copper and Zinc) on The Medicinal Leeches (*Hirudo verbana*) and Saliva Antimicrobial Properties

Abstract: In the study, the effects of different concentrations of zinc and copper metals on medicinal leeches were investigated. Fifteen medicinal leeches (*Hirudo verbana*), which were stocked in containers with 10 liters of water, were exposed to two different doses of copper and zinc metals, which were determined below the lethal doses. While applied doses of zinc and copper were 3.0 mg/L, 12 mg/L, and 0.15 mg/L and 0.6 mg/L during 96 hours, respectively. Applied doses of zinc and copper were 0.5 mg/L and 2.0 mg/L, and 0.02 mg/L and 0.08 mg/L for 30 days applications, respectively. After these applications, antimicrobial characteristics of the leech saliva, heavy metal deposition and malondialdehyde (MDA) levels were analysed. It was determined that leech saliva extract did not show any antimicrobial activity on fish pathogens, *Lactococcus garviae* and *Yersinia ruckeri*. Also, It has been found that when medicinal leeches exposed to zinc and copper metals, heavy metals concentrations in tissues of the medicinal leeches increased. In addition, it was found that malondialdehyde values in leech saliva increased when zinc and copper were exposed at different concentrations and durations. It was revealed from the data that medicinal leech of the *Hirudo verbana* species is a good biomonitor organism for zinc and copper heavy metals.

Keywords: Antimicrobial, Heavy metal, *Hirudo verbana*, Medicinal leech, Malondialdehyde

1. Giriş

Günümüzde çevre kirliliği her geçen gün artmakta ve biyolojik varlıkları tehdit etmektedir. Çevre kirliliği, en yıkıcı hasarı sucul ekosistemlere vermektedir. Sucul ekosistemlere zarar veren kirleticilerin başında evsel ve endüstriyel atıklar gelmektedir. Su ekosisteminde bulunan en önemli çevresel kirleticilerden biri de ağır metallerdir. Ağır metaller deniz, göl ve akarsularda fazla miktarlarda bulduklarında suda yaşayan organizmalar tarafından bünyelerine alınırlar (1-3). Söz konusu kirletici etkenler hedef organ ve dokularda birikerek yapısal ve fonksiyonel mekanizmalara hasar vermektedirler (4, 5). Bu ağır metallerin çok düşük konsantrasyonları bile toksik olabilmektedir (6). Bu

toksikasyonun derecesi canlılar arasında oldukça farklılık göstermektedir. Su ekosistemi ağır metallerin en çok birikim yaptığı sistemler olduğundan, bu kirleticilerin etkileri daha çok balıklar üzerinden belirlenmeye çalışılmıştır (7-9). Balıkların yanı sıra denizel veya tatlı su ekosistemlerinde yaşayan midye, istiridye ve deniztarakları gibi çift kabuklu canlıların da ağır metallerin etkilerinin belirlenmesi amacı ile kullanıldığı bilinmektedir (10). Ortamdaki metal konsantrasyonları ile suda yaşayan balık, midye, istiridye, plankton gibi organizmaların dokularındaki miktarları arasında bir ilişki olduğu kabul edilmektedir. Bu ağır metallerin suda yaşayan ve besin zincirinin farklı kademelerinde bulunan organizmalar tarafından alınması

çoğunlukla beslenme yolu ile olmaktadır. Bu geçişlerin solunum, osmoz ve difüzyon olayları ile de devam ettiği, vücudun suyla temas eden yüzeyleri olan deri ve solungaçlar vasıtasıyla da bünyeye alındığı bilinmektedir. Ancak vücuda alınan miktarlar türden türe oldukça farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar alınan metalin toksisite derecesini de belirleyen önemli bir unsur olmaktadır. Örneğin suyu süzerek beslenen kabuklu canlılar ve alglerin birim zamanda aldıkları metallerle balıkların bünyelerine aldıkları miktarlar oldukça farklı olmaktadır. Bu canlılar sudaki kirlenmeyi çok daha iyi ve doğru tahmin etmeyi kolaylaştıran canlılar olduklarından aynı zamanda biyo-indikatör organizmalar olarak da adlandırılırlar. Su ekosistemlerindeki kirleticileri araştırmak ve izlemek maksadı ile bu biyo indikatör organizmaların kullanıldığı birçok metot geliştirilmiştir (11). Geliştirilen bu metotların suda yaşayan canlıların dokularındaki birikimlerin tespiti üzerinden yapıldığı ve bu birikimlerden bir sonuca ulaşılmaya çalışıldığı anlaşılmaktadır. Elde edilen verilerden canlının etkilenme derecesi veya toksisite durumu ile sudaki miktarlar arasındaki ilişkilerden kirlenmenin modellenmesi mümkün olmaktadır. Kaldı ki endüstrileşmiş birçok ülkede cıva ve demir dışındaki çoğu metalin ekosistemdeki miktarları yer kabuğundaki miktarlarına kıyasla 100 ila 1000 kat artmış durumdadır (12). Bu durum canlıları önemli derecede etkilemiş ve söz konusu metallerin izlenmesi zorunluluğu ortaya çıkmıştır. Geçtiğimiz yüz yılda ağır metallerden kaynaklı seri hastalıklar ve hatta ölümlere neden olan trajik sonuçlar vuku bulmuştur (13). Bu yüzden ağır metallerin genel özellikleri, kaynakları, toksisite etkileri ve artış modelleri takip edilmelidir. Örneğin endüstri alanında çok uzun bir süre kullanım alanı bulan bakırın yüksek dozları hem bitkiler hem de hayvanlar için tehlikeli olabilmektedir. Benzer şekilde çinkonun da yüksek miktarları toksik etki gösteren metallerin başında gelmektedir. Balıklar başta olmak üzere kabuklu ve sucul omurgasızlarla beslenen insanlara da söz konusu metaller geçebilmekte, toplum sağlığını etkiler düzeye ulaşabilmektedir. Bu bağlamda söz konusu biyo-indikatör canlıların ağır metaller bakımından izlenmesi çevre kirliliği bakımından olduğu kadar halk sağlığı bakımından da önem arz etmektedir. Doğru seçilmiş bir biyo-monitör canlıının kullanımı farklı metal kaynaklarının varlığını ve miktarının belirlenmesinde önemli rol oynar. Denizel ortamlarda en çok kullanılan biyo- monitör organizmalar; mikro algler, çiçekli bitkiler, suyu filtre eden canlılar ve detritusla beslenen canlılardır (14). Midyeler ve istiridyeler epibentik bölgelerde filtratif beslenen organizmalar olduklarından askıdaki, çözünmüş, sudaki ve sedimentteki metaller için iyi birer biyo-monitör canlıdır (15). Bu tür canlıların, çevresel kirleticilerin en iyi şekilde canlılar üzerinde görülebildiği hassas organizmalar olduğundan uzun yıllardır kullanıldığı bilinmektedir (16). Çevre kirliliğinde biyo-monitör veya indikatör olarak kullanılan çift kabuklu canlılar arasında; *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. trossulus*, *Septifer virgatus*, *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*,

C. virginica, *C. brasiliensis* ve *Spondylus spinosus* türleri sayılabilir (10; 17). Biyo-monitör olarak seçilen organizma ne kadar hassas olursa çevresel kirlenme o denli doğru bir şekilde modellenebilir. Bu bağlamda, iyi bir indikatör organizmadan beklenen birçok özelliğe sahip olan tıbbi sülüklerin çevresel kirleticilerden ağır metallere karşı gösterdikleri tepkilerin ortaya koyulması hedeflenmiştir. Tıbbi sülükler ekolojik ve ekonomik önemleri bakımından oldukça değerli canlılardır. Son yıllarda tamamlayıcı veya alternatif tıbbi uygulamalarda kullanımları artmakta olan tıbbi sülüklerin biyo-monitör olarak kullanıldığı çalışma oldukça azdır. Bu nedenle, tıbbi sülüklerde farklı ağır metallerin dokulardaki birikimlerinin ve tıbbi sülüklerden elde edilecek salyada, Malondialdehit (MDA) ve antimikrobiyal özelliklerinin ortaya koyulması hedeflenmiştir.

2. Gereç ve Yöntem

2.1. Hayvan Materyali ve Ağır Metal Dozları

Araştırma kapsamında yapılan çalışmalarda tıbbi sülük olarak bilinen türlerden biri olan *Hirudo verbana* kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan hayvan materyali tıbbi sülük yetiştiriciliği yapan Cansuyu Sülük isimli firmadan temin edilmiştir. Çalışmalar Veteriner Fakültesi Su Ürünleri ve Hastalıkları Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Denemelerde kullanılan tıbbi sülükler 12-15 aylık olup yaklaşık ağırlıkları 5-7 gram arasında (ortalama 6 gram civarında) seçilmiştir. Sülüklerin stoklandığı plastik kaplar 5 litre hacminde olup, her bir kaba 15'er adet stoklanmış ve denemeler boyunca herhangi bir besleme yapılmamıştır. Letal konsantrasyonlar çinko için 96 saat ve 30 gün sonunda sırası ile 15.83 mg/ L ve 3.00 mg/ L'dir. Bakır için ise 96 saat ve 30 günlük maruz kalma sürelerinde 0.84 mg/ L ve 0.09 mg/ L olarak belirlenmiştir (18). *Hirudo verbana* türü tıbbi sülüklerde bu lethal dozlardan hareketle doz altı konsantrasyonlarda belirlenen iki farklı metal konsantrasyonunun etkilerinin belirlenmesi için düşük ve yüksek dozlar belirlenmiştir. Daha önce lethal dozların altındaki bakır ve çinko metallerinin tıbbi sülüklerdeki etkileri ile ilgili herhangi bir araştırmaya ulaşılmadığından bu dozlar her bir konsantrasyon için dört kat artırılarak belirlenmiştir. Çinko metali için düşük doz (DD) 96 saatlik uygulamada 3.0 mg/L, yüksek doz (YD) düşük dozun dört kat fazlası olan 12 mg/ L dozu seçilmiştir. Yine çinkonun 30 günlük uygulanmasında düşük doz 0.5 mg/L, yüksek dozu ise 2.0 mg/L olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde sülüklerin yaşayacakları su ortamına ilave edilecek olan bakır metali için 96 saatlik uygulamada düşük doz 0.15 mg/ L, yüksek doz ise bu değer dört katı olan 0.60 mg/ L olarak belirlenmiştir. Bakır metalinin 30 günlük muamelesinde düşük doz 0.02 mg/L iken yüksek doz 0.08 mg/L olarak kullanılmıştır. Kontrol grubunda ise herhangi bir metal kullanılmamıştır. Yukarıda verilen konsantrasyonların hazırlanmasında, çinko ve bakır metallerinin kimyasal olarak saf durumda olan nitrat

ve sülfatlı formları ($Zn(NO_3)_2 \cdot 7H_2O$ ve $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) kullanılmıştır. Her iki ağır metal için uygulanan dozların söz konusu sürelerde verilmesinden sonra, tıbbi sülükler buldukları plastik kaplardan alınarak ağır metal ve salya analizlerine kadar $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

2.2.Ağır Metal Analizleri

Tıbbi sülük dokularında bakır ve çinko analizleri yanı sıra, aynı örneklerden arsenik, demir ve kurşun analizleri de eş zamanlı olarak yapılmıştır. Söz konusu ağır metal analizleri ERÜ Teknoloji Araştırma Uygulama Laboratuvarlarında ICP-MS cihazında gerçekleştirilmiştir. Mikrodalga çözündürme işlemlerinde numunelerden 0.2 g tartılarak 5 ml derişik HNO_3 , 2 ml H_2O_2 eklenmiş ve yaş yakma uygulanmıştır. Daha sonra örnekler 25 ml'ye seyreltilerek analizler gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ppm cinsinden hesaplanmıştır.

2.3.Antimikrobiyal Analizler

Tıbbi sülüklerden elde edilen salyalarda antibakteriyel özelliklerin incelenmesi için, daha önce belirlenen gram pozitif ve gram negatif bakterilerde antibiyogram testleri yapılmıştır. Bu testlerde disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Uygulanan disk difüzyon yöntemi Bauer ve ark. (19)'dan yararlanılarak yapılmıştır. Daha önceden izole edilen ve $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilen patojenlerden *Yersinia ruckeri* ve *Lactococcus garviae* suşları genel besi yerlerinde (triptik soy agar) çoğaltılmıştır. Bakteri suşlarının antibiyotik duyarlılıkları yukarıda değinildiği üzere standart disk difüzyon tekniği ile tespit edilmiştir. Bu yöntemde 0,5 McFarland yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 100 μ l alınarak Mueller-Hinton Agar (MHA)'lı petriyerin yüzeyine yayılmıştır. Daha sonra besiyeri yüzeyine antibiyotik disklerle birlikte tıbbi sülük salyası emdirilen tüm diskler yerleştirilmiş ve $24 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ de 16- 18 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda disklerin etrafındaki zon çapları ölçülerek değerlendirilmiştir. Çalışmada amoksisillin (AML 25 μ g), amoksisilin /klavulanik acid (AMC 30 μ g), doksisisiklin (DO 30 μ g), trimetoprim-sülfametoksazol (SXT 25 μ g), eritromisin (E 15 μ g), gentamisin (CN 10 μ g), oksitetrasiklin (OT 30 μ g), enroflaksasin (ENR 5 μ g), okzolinik asit (OA 2 μ g) ticari antibiyotik diskleri (Oxoid) ve steril disklere emdirilmiş tıbbi sülük salyaları kullanılmıştır. Antibiyogram analizleri sonucunda tıbbi sülüklerden elde edilen salya örneklerinin diğer ticari antibiyotik disklerle kıyaslanarak antimikrobiyal özellikleri belirlenmiştir.

2.4.Malondialdehit (MDA) Analizleri

Ağır metal muamelelerinden sonra, tıbbi sülüklerde oksidatif bir stresin ortaya çıkıp çıkmadığı MDA miktarları analiz

edilerek belirlenmiştir. Bu amaçla sülüklerden elde edilen salya örneklerinin bir kısmı MDA analizlerinde kullanılmıştır. Salya örneklerine 1 ml MDA çözeltisi ilave edilerek $95\text{ }^\circ\text{C}$ 'lik su banyosunda yaklaşık 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Daha sonra 20 dakika buz banyosu yaptırılan numuneler, 10.000 rpm ile 10 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Hali hazırda pembe renge dönmüş örnekler daha sonra 535-600 nm dalga boylarında spektrofotometrede okunmuştur. Örnekteki pembe rengin yoğunluğu MDA miktarı ile orantılı olduğundan, MDA miktarı standart grafiğe karşı gelen absorbans değerinden hareketle belirlenmiştir. Kullanılacak seyreltme katsayısı ile çarpıldıktan sonra elde edilen sonuçlar $\mu\text{M}/100\text{ mL}$ olarak hesaplanmıştır. MDA analizleri için Esterbauer ve Cheeseman (20) ve Ohkawa (21)'dan yararlanılmıştır.

2.5. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler IBM-SPSS for Windows Release 25.0 Programı (SPSS Inc, Chicago, Illinois, United States of America) kullanılarak yapılmıştır. Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram, q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testi kullanılarak normallik açısından test edilmiştir. Normal dağılım gösteren veriler ortalama ve standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. Normal dağılmayan veriler ise medyan (25. ve 75. yüzdelikler) olarak ifade edilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda One Way ANOVA (alternatif; Kruskal Wallis Testi) yapılmıştır. Post-hoc testi olarak Tukey ve Bonferroni testi kullanıldı. P değerinin <0.5 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. Bulgular

96 saatlik uygulamalarda suya ilave edilen çinko nitrat miktarının artması ile birlikte sülük kas dokusunda biriken demir, bakır ve çinko miktarlarının arttığı, ancak arsenik düzeyinin anlamlı ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Söz konusu zamanda uygulanan bakır sülfatın dokularda belirlenen demirin azalması yönünde bir etki gösterdiği kaydedilmiştir. Yine benzer olarak çinko miktarının da azalışına neden olduğu tespit edilmiştir. Bu verilere ilaveten uygulanan bakır sülfat miktarı ile dokularda depolanan kurşun miktarının ters orantılı olarak değiştiği kaydedilmiştir. 30 gün süre ile çinko nitrat ve bakır sülfat miktarlarının artışına paralel olarak kurşun ve demir düzeylerinin arttığı arsenik miktarının azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.001$) (Tablo 1).

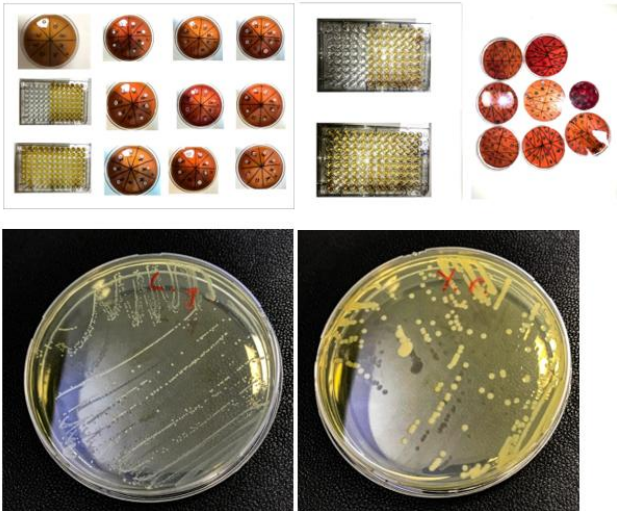
Farklı ağır metallerin 96 saat boyunca uygulanması sonrasında en yüksek MDA değeri yüksek doz çinko nitrat grubunda belirlenmiştir ($p<0.001$). Aynı ağır metallerin 30 gün uygulandığı sülüklerden elde edilen salyadaki MDA düzeylerinin düşük ve yüksek doz bakır sülfat gruplarında önemli düzeyde artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0.001$) (Tablo 1).

Tablo 1. Farklı ağır metal ve dozlarının tıbbi sülüklerde metal ve MDA düzeylerine etkileri

Muamele grubu	Ağır metal ve miktarı (ppm)					
	Fe	Cu	Zn	As	Pb	MDA
96S-Zn-DD	22.68 ± 0.43	2.02 ± 0.01	16.60 ± 1.41	0.14 ± 0.02	0.98 ± 0.07	0.27 ± 0.01
96S-Zn-YD	17.31 ± 0.17	2.33 ± 0.17	20.41 ± 0.35	0.18 ± 0.02	0.85 ± 0.01	1.34 ± 0.42
96S- Cu-DD	17.83±0.47	2.38±0.23	12.33±1.22	0.17±0.01	1.08±0.01	0.43±0.21
96S-Cu-YD	18.31±1.32	1.85±0.01	12.45±0.19	1.03±0.08	0.21±0.01	0.23±0.06
96S-Kontrol	22.33 ± 0.61	2.14 ± 0.11	14.28 ± 1.58	0.18 ± 0.03	0.98 ± 0.10	0.55±0.48
30G-Zn-DD	20.39±1.47	1.80±0.23	19.37±0.74	0.69±0.33	0.57±0.12	0.58±0.24
30G-Zn-YD	22.94±0.87	2.24±0.10	24.65±4.34	0.37±0.01	0.74±0.09	1.41±0.58
30G-Cu-DD	20.71±0.98	6.20±0.28	20.51±1.46	0.18±0.01	0.18±0.04	1.95±0.02
30G-Cu-YD	24.80±0.65	4.88±0.06	17.52±1.23	0.22±0.02	0.70±0.07	1.76±0.19
30G-Kontrol	20.62±2.01	3.08±1.63	26.23±4.21	0.85±0.25	0.48±0.07	1.17±1.02
P değeri	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

DD: düşük doz, YD: yüksek doz, S: saat, G: gün, Fe: demir, Cu: bakır, Zn: çinko, As: arsenik, Pb: kurşun, MDA: malondialdehit

Yapılan bu çalışmalarda sülük salyalarının disk difüzyon yöntemine göre herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmaların doğrulanması bakımından antimikrobiyal testler aynı zamanda minimum inhibisyon konsantrasyonlarını referans alan metot ile de gerçekleştirilmiş olup, bu analizlerde de sülük salyalarının hem *Lactococcus garviae* hem de *Yersinia ruckeri* suşları üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Sülük salyalarının *Lactococcus garviae* (solda) ve *Yersinia ruckeri* (sağda) suşları üzerine olan antimikrobiyal etkileri

4. Tartışma ve Sonuç

Alaama ve ark. (22) tarafından yapılan çalışmada, toksisite ve ağır metal birikimleri bakımından sudaki ağır metal artışlarına bağlı olarak sülüklerin kas doku ve salyalarındaki ağır metal birikimlerinin artış gösterdiği kaydedilmiştir. Mevcut çalışmada da tıbbi sülüklerin kas dokularındaki ağır

metal birikimlerinin uygulama dozlarına bağlı olarak değiştiği belirlenmiş olup, bu sonuçlar her iki çalışmanın birbirini destekler nitelikte olduğunu göstermektedir. Her iki çalışmada farklı tıbbi sülük türleri kullanılmış olsa da dokularda ağır metal birikim dinamiği, ortamdaki ağır metal miktarına bağlı olarak birbirine benzer görünmektedir. Ayrıca bakır ve çinko gibi ağır metallerle maruz bırakılan sülüklerin ortamdaki uzaklaşma, beslenme faaliyetlerini azaltma, tutunma özelliklerinde ve boşaltım faaliyetlerinin olumsuz etkilendiği gözlenmiştir. Söz konusu çalışmalarda bu parametrelerin ağır metal çalışmalarında davranışsal göstergeler olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (23). Çinko ve bakırın farklı konsantrasyonlarının bireysel veya birlikte etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada uygulama süreleri 48 saat, 96 saat, 10 gün, 20 gün ve 30 gün olarak belirlenmiştir. *Hirudo verbana* türü sülüklerde yapılan bu çalışmada bakırın çinkoya göre daha çok toksik etkiler gösterdiği bulunmuştur. Toksik etkilerin kısa periyotlardan ziyade uzun periyotlarda ortaya çıktığı vurgulanmıştır. (18). Elde edilen bu bulgularla mevcut çalışmadan elde edilen bulgular birbirini destekler özelliindedir. Çünkü sülük dokularında belirlenen ağır metal birikimlerinin bakır sülfat uygulamalarında ve 30 günlük periyotta net bir biçimde ortaya çıktığı bulunmuştur.

Uzun periyotlarda bakır sülfat konsantrasyonundaki artışın sülük dokularındaki demir ve kurşun miktarlarını arttırdığı, buna karşın arsenik ve çinko miktarlarını ters orantılı olacak biçimde azalttığı belirlenmiştir. Buraya kadar belirtilen ikili metal ilişkilerinden suya ilave edilen çinkonun sülük dokularında biriken bakır miktarını arttırmasına rağmen, benzer etkinin bakır tarafından gösterilmediği aksine dokulardaki çinkonun azalması yönünde etki ettiği belirlenmiştir. Bu veriler Petrauskiene (18) tarafından gerçekleştirilen çalışmada elde edilen verilerden ortaya çıkan etkinin aslında sinerjistik olmadığını ortamdaki çinkonun çekilmesi halinde toksisitenin daha düşük olacağını

göstermektedir. Bu yönü ile çalışmamız farklılık arz etmektedir. Sonuç olarak bakırın sülüklerde toksik etkilerin araştırılması için çinkoya göre daha iyi bir indikatör olduğu söylenebilir. Ancak bu etkilerin kısa periyotlardan ziyade en az 30 gün ve daha uzun sürelerde daha net bir şekilde ortaya çıkacağı düşünülmektedir.

Kısa periyotlarda (96 saat) ağır metal uygulamaları sonrasında yüksek doz çinko nitrat uygulamasının sülük salyasında MDA değerinin en yüksek değere ulaştığı belirlenmiştir. Bu durum yüksek doz çinkonun sülüklerde oksidatif stres kaynağı olduğunu göstermektedir. Ancak literatürde sülük salya MDA'ları üzerinde yapılmış herhangi bir araştırma bulunamadığından 96 saat sonrasında elde edilen bu değerler başkaca yayınlarla kıyaslanamamıştır. Ancak elde edilen veriler kısa periyotlar için çinkonun *Hirudo verbana* türü tıbbi sülüklerde bir stres kaynağı olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte 30 günlük uygulamalarda, yüksek doz bakır sülfat ve yüksek doz çinko nitrate maruz bırakılan tıbbi sülüklerde MDA değerleri bakımından istatistiksel olarak aralarında farklılık olmadığı anlaşılmıştır.

Tıbbi sülük salyasının antimikrobiyal etkilerinin ortaya konmasında farklı iki patojen *Lactococcus garviae* ve *Yersinia ruckeri* bakterileri kullanılmıştır. Tüm muamele gruplarından 96 saat ve 30 günlük ağır metal uygulanan sülüklerden salyaları sağılmış ve antimikrobiyal sonuçları ayrı değerlendirilmiştir. Ancak tüm muamele gruplarından alınan tıbbi sülük salyalarının yukarıda verilen balık patojenleri üzerinde herhangi baskılayıcı etki göstermediği belirlenmiştir. Ancak bu durum diğer balık ve/veya insan patojenleri için geçerli olmayabilir. Bu durumun açıklığa kavuşturulması için insan, su canlıları veya deney hayvanları üzerinde gerek *Hirudo verbana* gerekse diğer tıbbi sülüklerden elde edilen salyalar denenebilir. Literatür taramalarında Malezya sülüğü olarak bilinen *Hirudinaria manillensis* türü sülüklerin 14 haftalık açlık sonrası *Salmonella typhimurium* ve *E. coli* patojenleri üzerinde etkili olduğu rapor edilmiştir.

Yine aynı çalışmada 23 hafta aç bırakılan sülüklerden elde edilen liyofilize salyanın *Staphylococcus aureus* ve *S. typhimurium* patojenlerine karşı etkili oldukları belirlenmiştir (24). Söz konusu çalışmada açlık periyodunun sülük salyasının antimikrobiyal karakteristiğine önemli düzeyde etki ettiği belirtilmiş olup, aynı zamanda bizim çalışmada kullandığımız türün de farklı olması sonuçların farklı çıkmasında birer faktör olabilir. Bu nedenlerle farklı açlık sürelerinin *Hirudo verbana* türü sülüklerde antimikrobiyal özelliklere etkilerinin araştırılması tavsiye edilebilir. Malik ve ark. (25) tarafından aynı sülük türü ile yapılan başka bir çalışmada ise 14 hafta aç bırakılan sülüklerden elde edilen salyanın *E. coli* 'ye karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla ile sülük salyasının antimikrobiyal etkilerinin

sağlıklı bir şekilde ortaya konabilmesi için; sülük türü, açlık periyodu, salya saflığı ve formu (sıvı/ liyofilize olup olmaması), sülüğün hasat mevsimi gibi faktörlerin ayrı ayrı ele alınarak detaylı araştırmaların yapılması tavsiye edilebilir. Çalışmadan elde edilen tüm veriler göz önüne alındığında *Hirudo verbana* türü tıbbi sülüklerin, çevresel kirlenmeler için iyi bir indikatör organizma olabilecekleri anlaşılmaktadır.

Teşekkür

FYL-2020-10072 kodlu proje ile bu çalışmanın yapılmasındaki katkılarından dolayı, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Akçalı İ, Küçüksezgin F. Ege Denizi kıyılarında görülen kahverengi alg (*Cystoseris* sp.)'de ağır metal birikimi. Ege University Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 2009; 26(3): 159-163.
2. Richetti SK, Roseberg DB, Ventura-Lima J, Monserrat JM, Bogo MR, et al. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. NeuroToxicology 2011; 32(1): 116-122.
3. Oliva M, José Vicente J, Gravato C, Guil-hermino L, Galindo-Riaño MD. Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Solea senegalensis*, to assess the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain): Seasonal and spatial variation, Ecotoxicology and Environmental Safety 2012; 75(1): 151-162.
4. Hsu T, Huang KM, Tsai HT, Sung TS, Ho TN. Cadmium (Cd) induced oxidative stress down-regulates the gene expression of DNA mismatch recognition pro-teins MutS homolog 2 (MSH2) and MSH6 in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Aquatic Toxicology 2013; 126: 9-16.
5. Pereira S, Cavalie I, Camilleri V, Gilbin R, Adam-Guillermin C. Comparative genotoxicity of aluminium and cadmium in embryonic zebrafish cells. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 2013; 750(1-2): 19-26.
6. Rainbow PS. The significance of trace metal concentrations in decapods. Symposium of Zoological Society 1988; 59, (pp. 291-313). London.
7. Madhavan P, Elumalai K. Effects of chromium (VI) on the lipid peroxidation and antioxidant parameters in the gill and kidney tissues of catfish, (*Clarias batrachus*) (Linnaeus 1758) (Actinopterygii: Siluriformes). International Journal Advanced Research in Biological Sciences 2016; 3(4): 249-255.
8. Ubani-Rex OA, Saliu JK, Bello TH. Biochemical Effects of the Toxic Interaction of Copper, Lead and Cadmium on (*Clarias gariepinus*). Journal of Health and Pollution 2017; 16: 38-48.
9. Arafa MM, Al-Afifi SHH, Ali AT. Investigating the Oxidative Stress of Heavy Metal's Pollution in (*Clarias gariepinus*). Egyptian Journal of Chemistry and Environmental Health 2015; 1(1): 231-43.
10. Türkmen A. İskenderun Körfezinde deniz suyu, askıdaki katı madde, sediment ve dikenli taş istiridyesinde (*Spondylus spinosis*) (Schreibers, 1793) oluşan ağır metal birikimi üzerine araştırma, Doktora tezi, Atatürk Üniv Fen Bil Ens, Su Ürünleri Anabilim Dalı, Erzurum 2003.
11. Phillips DJH, Rainbow PS. Biomonitoring of trace aquatic contaminants, Elsevier Science Publishes Ltd. England 1993; p. 371.

12. Wedepohl KH. The composition of the upper earth's crust and the natural cycles of selected metals: Metals in natural raw materials; Natural Resources, Wiley 1990; p. 3-18.
13. Dallinger R, Rainbow R. Ecotoxicology of Metals in Invertebrates. 1st edition, Setac Special Publications, Lewis Publishers Chelsea 1993.
14. Carballeria A, Carral E, Puente X, Villares R. Regional-scale monitoring of coastal contamination: nutrients and heavy metals in estuarine sediments and organisms on the coast of Galicia. International Journal of Environment and Pollution 2000; 13: 534-572.
15. Ettajani H, Amiard-Triquet C, Amiard J-C. Etude experimentale du transfert de deux elements traces (Ag, Cu) dans une chaine trophique marine: eau particules (sediment naturel, microalgue)-mollusques filtreurs (Crassostrea gigas Thunberg). [Experimental study of the transfer of two trace elements (Ag, Cu) in a marine food chain: particulate water (natural sediment, microalgae)- filter molluscs (Crassostrea gigas Thunberg)]. Water Air Soil Pollution 1992; 65: 215-236.
16. Salazar MH. Use and misuse of mussels in natural resource damage assessment. Marine Technology Society Conference, Global Ocean Resources 1, (pp. 257-264), 1992 Washington DC.
17. Rainbow PS. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. Marine Pollution Bulletin 1995; 31 (4-12): 183-193.
18. Petrauskienė L. Lethal effects of Zn, Cu and their mixture on the medicinal leech (*Hirudo verbana*). Ekologija 2008; 54(2): 77-80.
19. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology 1966; 45: 493-96.
20. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods in Enzymology 1990; 186: 407-421.
21. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry 1979; 95(2): 351-358.
22. Alaama M, Abdulkader AM, Ghawi AM, Merzouk A, Khalid RS, et al. Assessment of Trace Heavy Metals Contamination in the Tissues and Saliva of the Medicinal Leech *Hirudinaria manillensis*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 2021; 21(5): 225-31.
23. Petrauskienė L. The medicinal leech as a convenient tool for water toxicity assessment. Environmental Toxicology 2004; 19(4): 336-341.
24. Abdulkader AM, Merzouk A, Ghawi AM, Alaama M. Some biological activities of Malaysian leech saliva extract. IIUM Engineering Journal 2011; 12(4): 1-9.
25. Malik B, Astuti DA, Arief DJF, Rahminiwati M. A study on antioxidative and antimicrobial activities of saliva extract of Indonesian local leeches. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Sciences 251, The 2nd International Conference on Natural Products and Bioresource Sciences 1-2 November 2018; Tangerang- Indonesia.



A Case of Acute Lymphoblastic Leukemia in a Cat

¹Emre TÜFEKÇİ[✉] ²Gencay EKİNCİ² ³Mehmet TUZCU³ ⁴Vehbi GÜNEŞ² ⁵Alfatih Mohammed Ahmed ABOZAİD² ⁶Bünyamin ERSÖZ² ⁷Batuhan BALI² ⁸Celil BENDEŞ²

¹ Department of Wild Animal Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University, Kayseri/Türkiye

² Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University, Kayseri/Türkiye

³ Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Selcuk University, Konya/Türkiye

◆ Geliş Tarihi/Received: 04.07.2024

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 25.08.2024

◆ Yayın Tarihi/Published: 31.12.2024

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Tüfekçi E, Ekinçi G, Tuzcu M, Güneş V, Abozaid AMA, Ersöz B, Bali B, Bendeş C. A Case of Acute Lymphoblastic Leukemia in a Cat. Bozok Vet Sci (2024) 5, (2):76-84.

Abstract: This study aimed to provide information about the cytology results, clinical process, and treatment protocol of ALL diagnosed in biopsy samples taken from the lymph nodes and peripheral blood smears of a cat with feline leukemia virus infection (FeLV). The cat showed clinical signs such as enlarged mandibular lymph nodes, swelling in the frontal region of the head, ulceration and gingivitis in the oral cavity, inflammation of the anal sacs, diarrhoea and recurrent vomiting. In the haematological evaluation performed on the first day of admission to the clinic, it was found that the total WBC values could not be measured using the haematology device. Furthermore, biochemical abnormalities, including hyperproteinemia (9.5 g/dl), hyperalbuminaemia (4.08 g/dl), hypernatraemia (241.7 mEq/L) and hyperkalaemia (8.09 mEq/L), were detected in this case report. In addition, neurological findings such as keratitis, tongue paralysis and neurogenic bladder, which were not previously reported in FeLV-infected cats, were detected and reported. Despite the administration of appropriate treatment protocols, the cat survived for approximately three months following the diagnosis of the disease, a complete recovery could not be achieved due to complications. Consequently, it is crucial to implement preventive measures against FeLV infections, given the variable prognosis of the disease. This hematopoietic disease, which is not frequently encountered in cats, was prepared with the belief that it would be useful to veterinarians and is the first report of acute lymphoblastic leukemia in cats in Türkiye.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemias, Chemotherapy treatment, FeLV, Hematopoietic neoplasm

Bir Kedide Akut Lenfoblastik Lösemi Olgusu

Özet: Bu çalışmada, kedi lösemi virüsü enfeksiyonu (FeLV) tanısı konulan bir kedinin lenf düğümlerinden alınan biyopsi örnekleri ve periferik kan smear örneklerinde teşhis edilen ALL'nin sitoloji sonuçları, klinik süreci ve tedavi protokolü hakkında bilgi verilmesi amaçlandı. Kedide mandibular lenf nodlarında büyüme, başın frontal bölgesinde şişlik, ağız boşluğu içinde ülserasyon ve gingivitis, anal keselerde yangı, ishal ve tekrarlayan kusma gibi klinik bulgular gözlemlendi. Kliniğe getirildiği ilk gün yapılan hematolojik değerlendirmede hematoloji cihazı kullanılarak total WBC değerlerinin ölçülememesi tespit edildi. Ayrıca bu olgu sunumunda hastalık sürecinde hiperproteinemi (9.5 g/dl), hiperalbuminemi (4.08 g/dl), hipernatremi (241.7 mEq/L) ve hiperkalemi (8.09 mEq/L) gibi biyokimyasal değişiklikler belirlendi. Ek olarak FeLV ile enfekte kedilerde daha önce bildirilmeyen keratit, dil felci ve nörojenik mesane gibi nörolojik bulgular tespit edilerek raporlandı. Kedi uygun tedavi protokolleri ile yaklaşık 3 ay kadar hayatta tutuldu fakat komplikasyonlar nedeniyle tam bir iyileşme sağlanamadı. Sonuç olarak hastalığın değişken prognozu dikkate alındığında, birincil olarak FeLV enfeksiyonlarına karşı koruyucu önlemlerin alınması önem arz etmektedir. Kedilerde sık rastlanmayan bu hematopoietik hastalık, veteriner hekimlere faydalı olacağı düşüncesiyle hazırlanmış olup, Türkiye'de kedilerde akut lenfoblastik lösemisinin ilk raporudur.

Anahtar Kelimeler: Akut lenfoblastik lösemi, FeLV, Hematopoietik neoplazm, Kemoterapi tedavisi

1. Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is characterized by the aggressive proliferation of immature and inadequately differentiated lymphocytes, known as lymphoblasts, which arise from the bone marrow and various lymphatic organs, including lymph nodes, lymph vessels, spleen, tonsils, and Peyer's patches (1). These immature cells are morphologically similar to large blast cells (2). Certainly, in the pathogenesis of ALL in felines, the feline leukemia virus (FeLV) prominently contributes, accounting for

approximately two-thirds of the etiological factors, with the ailment typically manifesting in juvenile cats (3,4). Approximately 60% to 80% of cats with ALL are FeLV positive (4-6). Leukemia in FeLV-negative cats is rare, accounting for <15% of all hematopoietic neoplasms (7).

In the context of ALL, there is an observed swift clinical progression, and animals diagnosed with this condition exhibit limited responsiveness to therapeutic interventions. The diagnostic process involves the identification of lymphoblasts within the circulatory system and bone marrow

(8). The clinical symptoms are related either to the lack of normal hematopoietic cells or to the infiltration of neoplastic cells into the organs (9). Hematological parameters may exhibit non-regenerative anemia, neutropenia, and thrombocytopenia in feline subjects afflicted with this ailment. Notably, FeLV carriage is frequently observed in such cases, which correlates with a less favorable prognosis. (8). Although treatment response rates are low, CHOP-based chemotherapy regimens, which consist of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone, remain a viable therapeutic approach. Furthermore, therapeutic data encompassing analgesic agents, immunostimulants, antimicrobial medications, and blood transfusion, are administered in accordance with the animal's clinical treatment regimen (3,8,10).

FeLV is an enveloped RNA virus found in the Gammaretrovirus genus of the family Retroviridae, which can increase the risk of developing certain types of cancer, including suppression of the immune system, anemia, and ALL in cats (11). FeLV is an exogenous agent that replicates in many tissues, including bone marrow, salivary glands, and respiratory epithelium. In the absence of an immune response following the first infection, the FeLV virus can extend its presence to the bone marrow and affect hematopoietic precursor cells (11). Certainly, it is observed that in cats with FeLV, the most frequently occurring form of leukemia is ALL (6). Although exact data on the frequency of leukemia and lymphoma are not readily available, it is observed that these forms of tumors are extremely rare in medical contexts.

This case report aims to report a case of a domestic cat with feline leukemia virus infection, diagnosed with acute lymphoblastic leukemia and followed up.

2. Case History

The study material was composed of a 2.5-year-old, brown, female, neutered, leukemia-vaccinated (twice) domestic cat brought to the Erciyes University Faculty of Veterinary Medicine Department of Internal Medicine clinic with complaints of loss of appetite, lethargy, stomatitis, gingivitis, vomiting, and diarrhea.

During the clinical examination, it was determined that the rectal body temperature was 38.1°C, the pulse rate was 182 beats/min, and the respiration rate was 18 respirations/min. Additionally, manifestations such as enlargement of mandibular lymph nodes, swelling in the frontal region of the head, ulceration and gingivitis within the oral cavity, inflammation of the anal sacs, malodorous diarrhea, and recurrent vomiting were observed. On the initial day of presentation at the clinic, the hematological assessment revealed the inability to read white blood cell values using the hematology device (Table 1). This result was not considered to fall within the typical range of leukocyte levels analyzed by the device. The biochemical evaluation revealed hyperproteinemia, hypernatremia, and hyperkalemia, as well as elevated values of AST, GGT, and GLU (Table 2). Based on these data, a symptomatic treatment protocol was established (Table 3). During the course of treatment, repeated hematological laboratory measurements were conducted. (Table 1). During the initial phase of treatment, although no improvement was observed, the owner of the patient recorded a worsening in the patient's overall health condition. Subsequently, suspecting enlargement in the patient's mandibular and femoral lymph nodes, a fine-needle aspiration biopsy was performed on the patient's popliteal lymph node. Furthermore, on the same day, the patient tested for FIV/FeLV rapid diagnostic kit (Asan Easy Test® FIV Ab/FeLV Ag), revealing a positive result for FeLV.

Table 1. Hematological parameters.

Measurement	1. Day	5. Days	36. Days	70. Days	Reference Ranges*
WBC ($10^9/L$)	-	-	3.2 L	12.5	5.5 - 19.5
LYMPH ($10^9/L$)	-	-	1.1 L	2.6	1.5 - 7
MON ($10^9/L$)	-	-	0.5	0.9	0 - 0.9
NEUT ($10^9/L$)	-	-	1.5 L	16.1 H	2.5 – 12.5
LYMPH %	-	-	36.2 H	13.3	27 - 36
MON %	-	-	15 H	4.2	0 - 5
NEUT %	-	-	46	81.1 H	45 - 64
RBC ($10^{12}/L$)	8.35	7.57	5.93	10.09 H	5 - 10
HGB (g/dl)	14.6	12.4	9.9	13.6	9.8 - 15.4
PCV %	38.6	33.8	29.1 L	36.2	30 - 45
MCV (fL)	46.2	44.6	49	35.9 L	39 - 55
MCH ($10^9/L$)	17.5 H	16.3	16.7	13.5	13 - 17
MCHC ($10^9/L$)	37.8	36.6	34.1	37.6	30 - 38
RDW ($10^9/L$) **	37.7 H	34.9 H	52.6 H	38.7 H	13.2 – 17.5
PLT ($10^9/L$)	171 L	139 L	116 L	1068 H	300 - 800
MPV (fL)	5.7 L	7.3 L	8.1 L	11.4 L	12 - 18
EOS %	-	-	2.8	1.4	0 - 4

Table 2. Biochemical parameters.

Measurement	1. Day	5. Days	36. Days	56. Days	Reference Ranges*
ALP (U/L)	81 H	73 H	92 H	89 H	0 - 45
GPT-ALT (U/L)	60.08	43.9	85.8	3.9 L	25 - 97
GOT/AST (U/L)	63.9 H	21.6	37.3	21.7	7 - 38
GGT (U/L) **	15 H	24 H	8	9	0 - 10
BUN (mg/dL)	24.29	15.88 L	22.89	22.42	19 - 34
CRE (mg/dL)	2.1	2.32 H	35.26 H	1.85	0.9 - 2.2
GLU (g/dL)	138.97 H	124.94 H	144.09 H	160.91 H	60 - 120
T. PRO (g/dL)	9.5 H	8.73 H	8.84 H	-	6 - 7.9
Na (mEq/L)	241.7 H	-	185 H	-	146 - 156
K (mEq/L)	8.09 H	-	5.61	-	3.7 - 6.1
ALB (g/dL)	-	4.08 H	4.92 H	4.48 H	2.8 - 3.9
P (mg/dL)	-	6.4 H	7 H	7 H	3 - 6.1
Ca (mg/dL)	-	-	11.46	-	8.7 - 11.7
AMYL (U/L)	-	-	1173	-	550 - 1458
Mg (mg/dL)	-	-	3.01	-	1.7 - 2.6

Table 3. Treatment protocol (3,15).

Drugs	Drugs Dose	Application Frequency	Application Method	Usage Period	
Drugs Used in Symptomatic Treatment	Asist® 900mg sachet containing powder, Bilim Pharmaceuticals)	2 ml	BID	PO	One week
	Sülfametoksazol-Trimetoprim (Bactrim® 200/40mg/5ml Sol., Deva)	2.5 ml	SID	PO	One week
	Feniramin hidrojen maleat (Avil® 15mg/5ml Syrup, Sandoz)	1 ml	BID	PO	One week
	Sodyum Klorür (Polifleks® % 0.9 Isotonic)	75 ml	SID	IV	During the treatment
	Dekstroz (Polifleks® %5 Dekstroz)	75 ml	SID	IV	During the treatment
Aggressive Chemotherapy Drugs	Methylprednisolone (Prednol® 16mg pill, Gensenta)	2/3 pill	SID	PO	Four weeks
	Vincristine (Vincristine -Koçak® 2mg/2ml Inj., Koçak Farma)	0.2 ml	Once week	a IV	Four weeks
	Siklofosfamid (Endoxan® 50mg pill, Zydus)	1.5 pill	Once week	a PO	Four weeks
Food and Drugs Used for Regulating Kidney Functions and Increasing Appetite	Hill's PRESCRIPTION DIET Urgent Care (a/d)	During the treatment			
	Hill's PRESCRIPTION DIET Kidney Care (k/d)				
Drugs Used for Immunostimulant Purposes	Furosemide (Diüril®, 10 mg Inj., Vetaş)	1 ml	SID	IM	Five days
	Interferon alfa-2a (Roferon-A® 3Miu/0.5 ml Inj., Roche)	50 IU	SID	SC	Fifteen days
Drugs Used with the Onset of Nervous Symptoms and Constipation	Asiklovir (Asiviral® 200 mg pill, Terra)	½ pill	SID	PO	Fourteen days
	Vitamin B ₁ -B ₆ (Nervit®, 100/10mg/ml Inj., Vetaş)	1 ml	SID	SC	Seven days
	Gabapentin (Neurontin® 300mg caps, Pfizer)	0.5 ml	BID	PO	Ten Days
	Laktuloz (Osmolak® 667mg/250ml Sol., Biofarma)	3 ml	BID	PO	Five days

In the abdominal ultrasound examination conducted, it was determined that there was splenic enlargement (1.33 cm) and enlargement in the popliteal lymph node (short axis: 0.79 cm, long axis: 1.47 cm). Additionally, it was determined that there was a notable increase in the dimensions of the right kidney relative to reference values, and a distinction could be made between the renal cortex and medulla. Furthermore, no occurrences of cysts or neoplasms were observed in the cortex of the right kidney; its echogenicity was within the normal range, and no anomalies were detected in the collecting system. In the left kidney, it was determined that the size was below the reference values (3.8-4.4 cm), the cortex and medulla could be differentiated, there was no pericapsular fluid, the cortex of the left kidney was hyperechoic, and there were no formations such as cysts or neoplasms, and no abnormal findings were observed in the collecting systems of the kidney (Figure 1).

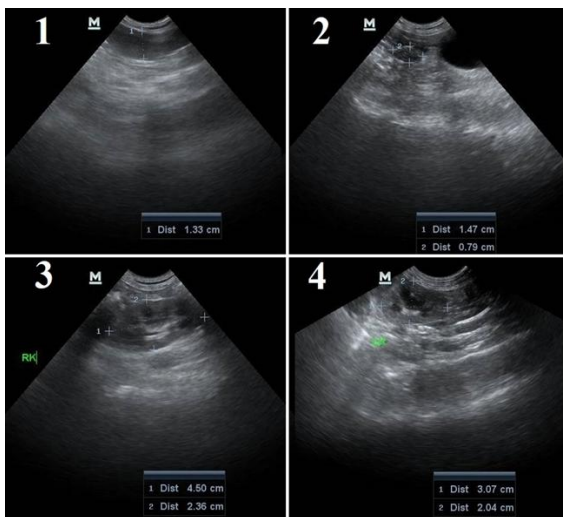


Figure 1. Ultrasonography (USG) images depict the following findings: Splenic enlargement and hypoechoic splenic parenchyma (1); enlargement of the popliteal lymph node (2); enlargement of the right kidney (3); reduction in size and increased echogenicity of the cortex in the left kidney (4)

In the microscopic examination of cytological preparations (Giemsa stain) (12) derived from the popliteal lymph node and peripheral blood smears, an excess of hyperchromatic medium and large-sized lymphocytes was observed, as evidenced by staining and scale measurements in the images. It was shown that the majority of neoplastic cells are made up of mononuclear cells, which belong to the lymphocyte class and exhibit marked atypia. The examined neoplastic cells were observed to have basophilic cytoplasm, varying in size of their nuclei. Some nuclei were intensely stained, while others appeared pale in color. In the examined preparations, pleomorphic cells and nuclear molding, considered indicative of malignancy, were identified. Nucleoli were predominantly

situated towards the center of the nucleus and exhibited distinct characteristics (Figure 2, Figure 3, Figure 4).

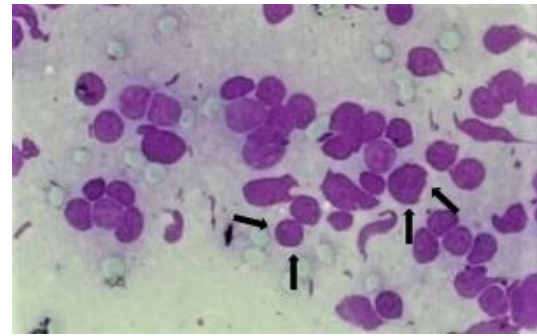


Figure 2. Hyperchromatic intermediate and large lymphocytes, variation in nuclear size (anisokaryosis) (Black arrows) among the cell nuclei. (Lymph node aspirate, giemsa strain, x400).

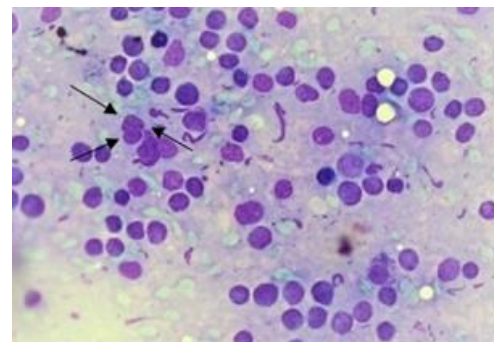


Figure 3. Nuclear molding (Black arrows). (Lymph node aspirate, giemsa strain, x400).

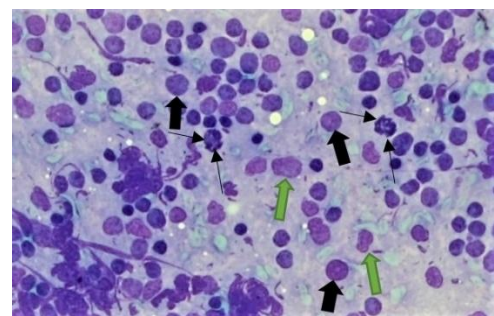


Figure 4. Abnormal mitosis (Thin arrows), Undifferentiated lymphoblasts (Thick arrows) at an incomplete stage of development, Pleomorphic cells (Green arrows). (Lymph node aspirate, giemsa strain, x400).

Based on the data, aggressive chemotherapy treatment spanning a period of four weeks was initiated for the patient diagnosed with ALL, as presented in Table 3. During the treatment process, repeated hematological assessments revealed the capacity of the hematology device to analyze leukogram data that had not been previously detected (Table 1). These analyses also identified manifestations of thrombocytopenia. In the second week of aggressive chemotherapy treatment, leukopenia and granulocytopenia

were observed, as shown in Table 1. Considering the values, prednisolone treatment was discontinued, and immunostimulant medication was initiated. Two weeks later, following the treatment course, blood samples were collected for hematological and biochemical laboratory analyses, as well as a blood smear. It was observed that the leukocyte count had increased (Table 1). Studies indicate that retrovirus infections may lead to kidney lesions (13-15). However, it should be noted that the normal toxicity of cytotoxic chemotherapeutic agents can be augmented in the presence of impaired liver and kidney functions. (3). During this period, in an effort to prevent renal damage in the patient, a renal diet regimen and diuretic treatment were recommended and prescribed to the owner of the patient, with the suggestion of monitoring the patient for a period of time. Two months later, during the follow-up examination, the patient was brought back to the clinic with an improved appetite but, at the same time, neurological symptoms characterized by incoordination in the hind limbs as well as constipation. Parenteral medication administration and enema were performed, and a laxative drug (lactulose) was prescribed. The treatment protocols administered are detailed in Table 3.

A few days following, it was observed that keratitis developed in the left eye, and a manifestation of lingual palsy occurred (Figure 5). Following the treatment protocols carried out for ten days after this date, although a general improvement in blood values was observed in the hematological assessment, there was no overall improvement in the patient's condition. Due to the persistence of neurological symptoms, a decision was made to initiate a different treatment protocol. For this purpose, the patient was administered pain management (16) and drugs to support neural stimulation (Table 3). This protocol was administered over ten days; however, due to the exacerbation of the patient's neurological symptoms (including incoordination in the forelimbs), the development of complete vision loss in the left eye (Figure 1), the persistence of constipation, and the emergence of neurogenic bladder, euthanasia was carried out at the request of the patient's owner.



Figure 5. The cat diagnosed with ALL and FeLV infection had tongue paralysis, complete blindness in the left eye due

to severe keratoconjunctivitis, and visual loss that did not respond to treatment.

3. Discussion

ALL is a rare hematopoietic neoplasm encountered in both cats and dogs (17). This is the first case report of acute lymphoblastic leukemia in cats in Türkiye.

While it is more frequently reported in dogs compared to cats, the disease is predominantly observed in younger and middle-aged dogs, typically within the age range of 1 to 12 years (1,18). It has been reported that FeLV-positive cats, specifically, are more likely to get the disease at a relatively young age (typically under 4 years of age) (19). It has been reported that non-specific symptoms often related to the gastrointestinal system, such as lethargy, anorexia, vomiting, diarrhea, oral ulceration, gingivitis, and weight loss, manifest concomitantly with the acute onset of the disease (7,20). In our study, both the age range and the asymptomatic nature of these data are consistent with the case under consideration. Lymphoproliferative disorders are more commonly observed in companion animals than myeloproliferative disorders, and among domestic species, they are more prevalent in cats. Cats with lymphoproliferative disorders are commonly positive for FeLV, Feline Immunodeficiency Virus (FIV), or both (9). In our study, the rapid diagnostic test kit for FeLV yielded a positive result, while the FIV test showed a negative result. The exact role of FIV in ALL pathogenesis is still unknown at present (7). It is well-established that gammaretroviruses, which are the causative agents of FeLV, are more pathogenic than lentiviruses, the agents responsible for FIV, and are known to induce virus-associated neoplasms, primarily lymphoma, and leukemia (20,21). In FeLV-infected cats, hematological abnormalities such as normal hematological values, regenerative or non-regenerative anemia, neutropenia, lymphopenia, monocytopenia, and/or thrombocytopenia may be observed (11). In our case study, it was observed that in addition to mild mucosal pallor, there was no evidence of anemia in the hematological profile. However, alterations in hematological parameters were identified, including an increase in monocyte (%) values, as well as conditions such as lymphopenia, thrombocytopenia, and granulocytopenia. In the late stages of the disease, elevated RDW (Red Cell Distribution Width) (%) and reduced MCV (Mean Corpuscular Volume) (%) values garnered attention. Oliveira et al., in a FeLV-infected feline diagnosed with ALL, reported that thrombocyte abnormalities were not observed (10). In cats, the prevalence of lameness, ocular or neurological symptoms associated with myeloid leukemia is not as commonly observed as it is in dogs (7). Neurological symptoms such as keratitis, lingual palsy, and neurogenic bladder were observed in our study. In our case of feline acute lymphoblastic leukemia, the observation

of neurological manifestations has prompted the consideration of neurological symptoms in all cases of ALL in cats.

The assessment of cellular morphology conducted by Dobson et al. may assist in distinguishing between ALL and acute myeloid leukemia (AML) (3). In our case, the diagnosis of ALL was established by identifying an increase in the number of hyperchromatic intermediate and large-sized lymphocytes and alterations in cell morphology in peripheral blood smears and cytological preparations obtained from lymph nodes. Tomiyasu et al., examining patients with ALL, emphasized that a significant increase in the number of lymphoblastic cells in peripheral blood may not always be evident (17). Furthermore, it has been suggested that in the aspect of detecting lymphoblastic cells in peripheral blood, even if their quantity is limited, suspicion of this disease should be warranted.

Findings from serum biochemistry analysis are nonspecific and reflect underlying secondary disease processes in FeLV infection. The most prominent biochemical alterations in our patient include hyperproteinemia, hyperalbuminemia, hypernatremia, and hyperkalemia. While no significant difference was observed in terms of hyperproteinemia between non-infected cats and cats with progressive FeLV infection, it is notable that cats infected with FIV exhibit a higher likelihood of demonstrating hyperglobulinemia when compared to non-infected cats (11,22).

After the diagnosis was established for the case presented in the report, the patient survived for approximately 2.5 months. While the prognosis appears to be slightly more favorable compared to AML, approximately 20% to 40% of ALL cases achieve a state of remission. In general, there are typically short periods of survival lasting from one to three months; however, it has been noted that, on occasion, longer durations may be possible. It has been assessed that the course of the disease in our case is consistent with previous reports (3,11).

According to our case report, a FeLV-infected cat diagnosed with ALL has been reported for the first time in Türkiye. The current prevalence rate of FeLV in Türkiye is unknown. Feline leukemia, a viral infection, can give rise to various health issues in cats, including acute lymphoblastic leukemia. Cats infected with the FeLV are at risk of developing acute lymphoblastic leukemia, a type of cancer that affects white blood cells. Therefore, it is considered essential for veterinarians to be knowledgeable about the diagnosis, treatment protocols to be applied, the likely prognosis of the disease, and the implementation of preventive measures for FeLV-suspected or positive cats and hematopoietic neoplasms caused by this infection. Regular testing and vaccination against feline leukemia (FeLV) will aid in preventing the spread of the virus and reducing the risk of

developing acute lymphoblastic leukemia in FeLV-infected cats.

Acknowledgments: We extend our gratitude to the patient's owner for granting permission for this research and to the medical personnel at the hospital for their invaluable assistance during the study.

Conflict of interest: No conflict of interest has been declared.

References

1. Leifer CE, Matus RE. Lymphoid leukemia in the dog: Acute lymphoblastic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 1985; 15(4): 723-739. doi: 10.1016/S0195-5616(85)50032-7
2. Presley RH, Mackin A, Vernau W. Lymphoid leukemia in dogs. *Compendium* 2006; 28: 831-849.
3. Dobson J, Villiers E, Morris J. Diagnosis and management of leukaemia in dogs and cats. *In Practice* 2006; 28: 22-31. doi: 10.1136/inpract.28.1.22
4. Kozicki AR. Lymphoid Leukemias, Myeloid Neoplasia, and Myelodysplastic Syndrome. Bruyette D. eds. *In: Clinical Small Animal Internal Medicine*. USA: Wiley-Blackwell, 2020; pp.1223-1230.
5. Essex ME. Feline leukemia: a naturally occurring cancer of infectious origin. *Epidemiologic Reviews* 1982; 4: 189-203. doi: 10.1093/oxfordjournals.epirev.a036246
6. Vail DM. Feline Lymphoma and Leukemia. Withrow SJ, Vail DM, Page RL. eds. *In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. St. Louis: Elsevier, 2012; pp.650.
7. Nelson RW, Couto CG. Leukemias. Nelson RW, Couto CG. eds. *In: Small Animal Internal Medicine*. St. Louis: Elsevier, 2020; pp.1319-1320.
8. Birchard SJ, Sherding RG. *Manual Saunders: clínica de pequenos animais*. Sao Paulo: Roca, 2008.
9. Thrall MA. Lymphoproliferative disorders and myeloid neoplasms. Thrall MA, Wiser G, Allison RW, Campbell TW. eds. *In: Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Ames: Wiley-Blackwell, 2012; pp.166-184.
10. Oliveira IM, Duarte LFDCD, Pereira LE, Damasceno AD. Leucemia linfoblástica aguda em felino: relato de caso. *Pubvet* 2020; 14: 1-6. doi: 10.31533/pubvet.v14n5a561.1-6
11. Hartmann K, Hofmann-Lehmann R, Sykes JE. Feline leukemia virus infection. Sykes JE. eds. *In: Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat*. St. Louis: Elsevier, 2021; pp.382-413.
12. Gridley MF. *Manual of histologic and special staining technics*. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1957.
13. Addie DD, Toth S, Reid S, Jarrett O, Dennis JM, et al. Longterm impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukaemia virus, and feline immunodeficiency virus. *Veterinary Record* 2000; 146: 419-424. doi: 10.1136/vr.146.15.419
14. Dunham SP, Graham E. Retroviral infections of small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2008; 38: 879-901. doi: 10.1016/j.cvsm.2008.03.005

15. Rudan N, Marković E, Kučer N. Evaluation of clinical and haematological parameters in differentiation of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Veterinary Archives* 2017; 87(6): 731-743. doi: 10.24099/vet.arhiv.160525
16. Epstein ME, Rodan I, Griffenhagen G, Kadrlik J, Petty MC, et al. 2015 AAHA/AAFP pain management guidelines for dogs and cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2015; 17: 251-272. doi: 10.1177/1098612X15572062
17. Tomiyasu H, Doi A, Chambers JK, Goto-Koshino Y, Ohmi A, et al. Clinical and clinicopathological characteristics of acute lymphoblastic leukaemia in six cats. *Journal of Small Animal Practice* 2018; 59(12): 742-746. doi: 10.1111/jsap.12917
18. Morris J, Dobson J. Haematopoietic system. Morris J, Dobson J. eds. In: *Small Animal Oncology*. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2001; pp.239-251.
19. Henrich M. Hematopoietic tumors. Klopffleisch R. eds. In: *Veterinary Oncology: A Short Textbook*. Switzerland: Springer 2016; pp.109-129.
20. Hartmann K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. *Viruses* 2012; 4(11): 2684-2710. doi: 10.3390/v4112684
21. Battilani M, Kaehler E, Tirolo A, Balboni A, Dondi F. Clinicopathological findings in cats tested for feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukaemia virus (FeLV). *Acta Veterinaria-Beograd* 2022; 72: 419-432. doi: 10.2478/acve-2022-0034
22. Hartmann K. Role of retroviruses in feline lymphoma. *European Journal of Companion Animal Practice* 2015; 25(3): 30-41.
23. *The Merck Veterinary Manual (2016) 11th Edition* Susan E. Aiello, Michael A. Moses.



Secondary Healing Following Trauma-Induced Partial Glossectomy: Case Report of an Arabian Horse

Yakup KOCAMAN¹ Ömer Tarık ORHUN² Ferda TURGUT³ Ayşe GÖLGEİ BEDİR³ Sıtkıcan OKUR³
 Mümin Gökhan ŞENOCAK³ Berrah GÖZEGİR³

¹ Yozgat Bozok Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Yozgat/Türkiye

² Necmettin Erbakan Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Konya/Türkiye

³ Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Erzurum/Türkiye

◆ Geliş Tarihi/Received: 05.07.2024

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 25.08.2024

◆ Yayın Tarihi/Published: 31.12.2024

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Kocaman Y, Orhun ÖT, Turgut F, Gölgei-Bedir A, Okur S, Şenocak MG, Gözegir B. Secondary Healing Following Trauma-Induced Partial Glossectomy: Case Report of an Arabian Horse. Bozok Vet Sci (2024) 5, (2):85-88.

Abstract: The tongue serves as an organ of food prehension, mastication, grooming, deglutition, taste, and vocalization, and is suspected to play a role in upper airway stability. A seven-year-old riding horse, weighing 350 kg and employed for load-carrying purposes, was brought to Atatürk University Faculty of Veterinary Medicine Hospital due to a transversal injury in the rostral part of the tongue caused by trauma from the bridle's rope. During the general examination, it was observed that the tongue protruded outside the mouth, there was a presence of necrotic odor, paralysis in the apex lingualis region, and bloodstains on the mouth corner and front limbs. After the removal of the tongue tissue, debridement of the necrotic areas in the remaining caudal portion was performed, and it was left for secondary wound healing. Postoperatively, intramuscular injections of 200,000 IU benzylpenicillin procaine were administered every 24 hours for 7 days, along with flunixin meglumine given for 3 days. Additionally, a 0.12% chlorhexidine gluconate solution was used as an oral antiseptic three times daily for a duration of 7 days. Daily phone calls were made to the patient owner to inquire about the overall condition of the patient. At the follow-up appointment on the seventh day, progress in the healing of the tongue was observed.

Keywords: Arabian horse, Tongue, Glossectomy, Secondary healing

Travma Sonrası Kısmi Glossektomi ile İkincil İyileşme: Bir Arap Atı Vaka Raporu

Özet: Dil; kavrama, çiğneme, tımar, yutma, tat ve ses çıkarma işlevlerini yerine getiren bir organdır ve üst solunum yolunun stabilitesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Üçyüz elli kg ağırlığında yük taşıma amacıyla kullanılan yedi yaşında bir arap atı, dizgin halatından kaynaklanan travma sonucu dilin rostral kısmında oluşan transversal yaralanma nedeniyle Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hastanesi'ne getirildi. Genel muayene sırasında, dilin ağız dışına çıktığı, nekrotik koku, apex lingualis bölgesinde felç ve ağız kenarı ile ön bacaklarda kan lekeleri olduğu gözlemlendi. Dil dokusunun çıkarılmasının ardından, geriye kalan kaudal kısmındaki nekrotik alanların debridmanı yapıldı ve ikincil yara iyileşmesi için bırakıldı. Ameliyat sonrası 7 gün boyunca her 24 saatte bir 200.000 IU benzilpenisilin prokain intramusküler enjeksiyonları yapıldı ve 3 gün boyunca flunixin meglumin verildi. Ayrıca, 7 gün boyunca günde üç kez %0.12 klorheksidin glukonat çözeltisi oral antiseptik olarak kullanıldı. Hastanın genel durumu hakkında bilgi almak için hasta sahibine günlük telefon görüşmeleri yapıldı. Yedinci gündeki takip randevusunda dilde iyileşme gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Arap atı, Dil, Glossektomi, İkincil iyileşme

1. Introduction

The tongue plays a crucial role not only in grasping, chewing, grooming, swallowing, tasting, and vocalization but also in ensuring stability in the upper respiratory tract. Tongue lacerations are common in horses, often involving reported abnormalities such as traumatic injuries, glossitis, neoplasia, and tongue paralysis (1). Typically, it involves the free portion of the tongue known as the apex lingua. These lacerations can occur due to foreign bodies, self-inflicted bites, or improper use of bits (2). The oral cavity and oropharynx can be susceptible to various diseases, many of which may present similar clinical symptoms. Among these

symptoms, partial or complete anorexia, pain during eating or swallowing, oral swelling, malodorous breath, and excessive saliva containing pus or blood may be present (3). Treatment methods for tongue injuries, such as primary closure, secondary healing, and glossectomy, are employed based on the depth, duration, and location of the injury (4).

In human medicine, glossectomies are categorized into four types: partial, subtotal, near-total, and total. A partial glossectomy involves removing or amputating any part of the tongue that is in front of the frenulum (5). Subtotal glossectomy means removing all the tongue tissue behind the frenulum, as well as a portion or the entire genioglossus and

geniohyoid muscles. Near-total glossectomy is the removal of over 75% of the tongue. Total glossectomy is the complete removal or amputation of the entire tongue. Among humans, partial glossectomies are regarded as minor surgeries, whereas subtotal, near-total, and total glossectomies are considered major surgeries. This case presentation aims to evaluate the application of wound debridement and secondary healing following partial glossectomy in horses, assessing the post-treatment performance of the horse, and examining the long-term outcomes of the procedure (6).

2. Case Description

A seven-year-old Arabian horse, weighing 350 kg and employed for load-carrying purposes, was brought to Atatürk University Faculty of Veterinary Medicine Hospital due to a transversal injury in the rostral part of the tongue caused by trauma from the bridle's rope. According to the gathered anamnesis information, trauma occurred 72 hours ago as a result of the tongue being compressed by the bridle's rope inside the oral cavity. Before being brought to the hospital, the available pelleted feed was soaked and turned into a mash in an attempt to feed the horse, but it did not receive adequate nutrition. The horse was kept in the stables without receiving any treatment until it was brought to the hospital.

During the general examination, it was observed that the tongue protruded outside the mouth, there was a presence of necrotic odor, paralysis in the apex lingualis region, and bloodstains on the mouth corner and front limbs. Clinically, the case exhibited weakness, fatigue, loss of appetite, increased salivation, and an elevation in rectal temperature. During inspection, a deep transversal laceration was identified in the rostral 1/3 portion of the tongue (Figure 1). As a result of the lack of treatment, necrosis in the tongue tissue and a necrotic odor inside the mouth were identified. General sensory paralysis was detected due to damage to the extensions of the hypoglossal nerve in the apex part of the tongue. No abnormalities were seen on radiographic examination of the head and hyoid area. Initially, due to the tachycardia and moderate dehydration in the horse, intravenous (IV) lactated Ringer's solution (65ml/kg, Polifleks Lactated Ringer I.V. Infusion Solution, Polifarma, Turkey), intravenous cefazolin (15mg/kg, Eqizolin, Tüm Ekip İlaç A.Ş., Turkey), intramuscular flunixin meglumine (1.1 mg/kg, Flumeglin, Teknovet, Turkey), and vaccination for tetanus biotoxin (Cloteid 4, Bioveta, Czech Republic) were administered.



Figure 1. The deep transversal wound on the horse's tongue was caused by trauma.

Surgical Procedure

In the administration of anesthesia for a partial glossectomy procedure, xylazine and ketamine were utilized intravenously at dosages of 1.1 mg/kg (Xylazinebio %2, Interhas, Turkey) and 2.2 mg/kg (Ketasol %10, Interhas, Turkey), respectively. After being taken into anesthesia, the horse was placed in a right lateral position on a cushion and leg restraints were applied. A gunter padan was placed in the horse's mouth, and the oral cavity was aseptically prepared with 2% chlorhexidine gluconate (Klorhex %4, Drogosan, Turkey). A local block with 2% lidocaine hydrochloride was administered to the base of the tongue. To minimize bleeding, a tourniquet was placed cranially on the frenulum of the tongue.

The selected area for amputation included the necrotic portion along with the region affected by laceration and its rostral part. The partial glossectomy was performed using a scalpel. After the removal of the tongue tissue, debridement of the necrotic areas in the remaining caudal portion was performed, and it was left for secondary wound healing. The excised tissue was examined histopathologically (Figure 2).

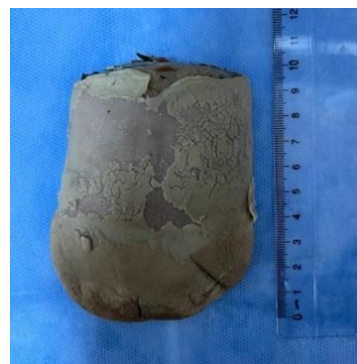


Figure 2. The apex of the tongue removed after partial glossectomy.

Tissue Tracking Process

Following the evaluation, the collected tissue samples were fixed in 10% formaldehyde solution for 48 hours, and after routine tissue processing procedures, they were embedded in paraffin blocks. Sections, each 4 µm thick, were obtained from each block and prepared for histopathological

examination. The prepared specimens were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and examined under a light microscope (Olympus BX 51, Japan).

Postoperative Care

During the postoperative period, benzylpenicillin procaine was prescribed instead of cefazoline because the caretaker mentioned having an antibiotic containing benzylpenicillin procaine available in the stable and indicated they could not afford a different antibiotic. Intramuscular injections of 200,000 IU benzylpenicillin procaine (Reptopen, Ceva, France) were administered every 24 hours for 7 days, along with flunixin meglumine (1.1 mg/kg, Flumeglin, Teknovet, Istanbul) given for 3 days. Additionally, 0.12% chlorhexidine gluconate (Klorhex Plus, Drogan, Turkey) solution was used as an oral antiseptic three times daily for a duration of 7 days.

Following the operation, the patient owner declined hospitalization. The patient owner was advised to feed the animal with a diet consisting of moistened pellets, soaked sugar beet pulp, and hay. Daily phone calls were made to the patient owner to inquire about the overall condition of the patient. According to the information provided by the patient owner, the animal was unable to chew effectively and swallow during the first two days, managing to ingest only small amounts of food. On the third day, a mixture of adult pellet feed and hay was provided. It was recommended to continue feeding the mixture of adult pellet feed and hay until the seventh day. Upon the follow-up appointment on the seventh day, improvement in the healing of the tongue was observed.

3. Results

The biopsy specimen taken from the horse's tongue was histopathologically examined, revealing severe acanthosis and marked anaplasia in the stratum spinosum cells due to cell proliferation in the tongue epithelial layer. Additionally, the formation of keratin pearls (Glob Corne) was observed in the epithelial layer of the tongue. (Figure 3).

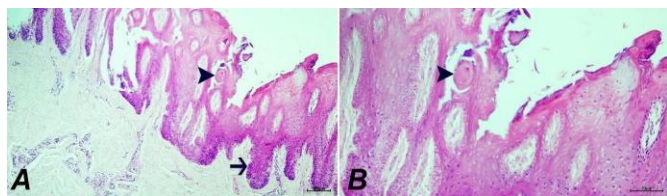


Figure 3 (A) Tongue of the horse showing Squamous Cell Carcinoma with acanthosis (arrow) and keratin pearl formation (glob corne) (arrowhead) due to proliferation in epithelial cells. H&E stain, Scale bar: 70 μ m. (B) Tumor tissue displaying keratin pearl formation (glob corne) (arrowhead). H&E stain, Scale bar: 40 μ m.

Insufficient communication with the animal owner following the partial glossectomy procedure complicated the

assessment of the recovery process. By the sixth month, it was observed that the granulation tissue had covered the remaining transverse incision in the radix region of the tongue, indicating successful healing. The owner, who was reached by phone, reported no issues with food or water intake.



Figure 4. Granulation tissue formation in the horse's tongue six months after a partial glossectomy procedure.

4. Discussion

In horses, as previously indicated in prior studies, the partial glossectomy method may be applied for the treatment of severe tongue traumas (1-4). The use of traumatic glossectomy or glossectomy as a treatment modality for cases involving severely traumatized tongues has been reported in earlier studies, particularly in instances of devitalized or minimally connected tongue traumas (7). Taking into consideration the classification of glossectomy methods applied in humans and the categorization of treatment approaches for tongue injuries in dogs (6), the glossectomy described in this report has been classified as "partial glossectomy". This classification defines the amputation of either a portion or the entirety of the pre-frenulum free tongue.

Potential causes of protrusion or paralysis in the horse's tongue include abnormal behavior, congenital abnormalities, clostridium botulinum infection, abnormalities in the hypoglossal nerve or nerve roots, and parasitic diseases (2). Cheetam et al. stated that the styloglossus, hyoglossus, and genioglossus muscles receive their motor innervation in the tongue from the hypoglossal nerve (Cranial Nerve XII) and emphasized that damage to the hypoglossal nerve is associated with the protrusion of the tongue (8). Similarly, the protrusion observed in the tongue of the patient in this report was determined to be due to a deep wound occurring in the transverse plane of the tongue.

The radiography of the oral cavity can assist in imaging radiopaque foreign bodies or fractures as the cause of clinical symptoms. Its utility is limited in identifying soft tissue lesions (1,9). In the radiographic imaging utilized in our case,

no lesions were observed in the bone structure or soft tissues. Magnetic resonance imaging and computed tomography can be employed to visualize the locations and extensions of soft tissue lesions (1).

Squamous cell carcinoma (SCC) is a frequently encountered neoplasm in horses. Horses with lingual SCC may experience dysphagia, weight loss, increased salivation, difficulty chewing, and tongue ulceration. The recognition of lingual SCC in horses may be challenging, as it can present with clinical symptoms similar to more common diseases in the oral cavity (1). SCC in any species typically initiate as small, non-healing, slowly growing ulcerations or proliferative cauliflower-like masses with a broader base, resembling papillomas. In this case, the patient was brought in with a complaint of tongue trauma, and morphological changes indicative of SCC in the tongue were not observed. Horses developing tongue lesions due to various causes often experience difficulties in functions such as eating, chewing, swallowing, and vocalization (2). In consideration of these circumstances, the cachectic posture noted during the clinical examination in this case was considered to potentially originate from the SCC in the oral cavity. Additionally, when the patient was brought to the hospital with tongue trauma, no symptoms related to SCC were observed on the tongue.

Surgical intervention may be a treatment option for lingual tumors, although its applicability depends on the size and location of the tumor. Partial glossectomy may be a suitable treatment approach for horses with SCC, depending on the size and location of the tumor. Furthermore, in dogs, this treatment method has yielded successful results (2). Glossectomy has been previously described as a treatment for severely traumatized tongues, which may involve loss of vitality or minimal attachment to the main portion of the tongue (9, 10, 11, 12), and in cases, they have regained their previous functions in the long term. Particularly in horses, partial glossectomy may be considered as a successful treatment option for conditions resistant to medical intervention. Schoonover et al. noted that when wounds involving a significant amount of muscle were left for secondary healing, good recovery was observed, although they specified that the tongue was not one of these areas (4). On the contrary, Sadan et al. indicated in their study on glossopharyngeal and wound conditions in foals that, if early results are not expected, secondary intention healing can yield excellent outcomes for achieving optimal results (3). In parallel, White et al. have mentioned that in the treatment of tongue injuries in horses, most lacerations heal well with secondary intention healing, and surgical repair is not necessary. (13). In light of this information, in our case, a partial glossectomy was performed, and wound debridement was carried out, allowing the process to proceed to secondary intention healing.

4. Conclusion

This report demonstrates the successful secondary healing of a wound after partial glossectomy in a horse, following wound debridement, and indicates good tolerance of the procedure. Based on these findings, glossectomy may be considered as a treatment option for aggressive tongue tumors and other conditions where the tongue is irreversibly compromised. In this study, a glossectomy classification system following the framework developed for humans was employed. This system could contribute to the standardization and reporting of future cases and aid in determining post-treatment prognosis.

References

1. Morrison ML, Groover E, Schumacher J, Newton J, Pereira MM. Lingual squamous cell carcinoma in two horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2019; 79:35- 38.
2. Lang HM, Panizzi L, Smyth TT, Plaxton AE, Lohmann KL, et al. Management and long-term outcome of partial glossectomy in 2 horses. *The Canadian Veterinary Journal*, 2014; 55(3): 263.
3. Sadan MA. Surgical treatment of some tongue affections in camels (*Camelus Dromedarius*). *Journal of Agriculture and Veterinary Sciences*, 2017; 10(1): 19-25.
4. Schoonover MJ, LA D. Management of Wounds to the Equine Oral Cavity
5. Dorn CR, Priester WA. Epidemiologic analysis of oral and pharyngeal cancer in dogs, cats, horses, and cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1976;169(11):1202-1206
6. Dvorak LD, Beaver DP, Ellison GW, Bellah JR, Mann FA, et al. Major glossectomy in dogs: A case series and proposed classification system. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 2004; 40:331–337.
7. Mohammed A, Ribadu AY, Hassan SU. Partial glossectomy in a stallion. *Veterinary Record*, 1991; 128:355–356.
8. Cheetham J, Pigott JH, Hermanson JW, Campoy L, Soderholm LV, et al. Role of the hypoglossal nerve in equine nasopharyngeal stability. *Journal of Applied Physiology.*, 2009; 107:471–477
9. Barber SM. Management of neck and head injuries. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice.*, 2005; 21:191–215.
10. Mohammed A, Ribadu AY, Hassan SU. Partial glossectomy in a stallion. *Veterinary Record*, 1991; 128:355–356.
11. Wilson DA. Management of head & neck injuries. *Proceedings NAVC, Orlando, Florida*. 2006.
12. Gerard MP. Oral soft tissue trauma/foreign bodies. *Proceedings NAVC, Orlando, Florida*. 2007.
13. White NA, Hoffman PE. Surgical repair of equine lingual lacerations. *Equine Practice*, 1989; 2(2):37–42.



Parvoviral Gastroenteritisli Bir Köpekte İnce Bağırsakta Aşırı Bakteriyel Kolonizasyon ve İntestinal Metanojen Artışı: Laktuloz Probu Kullanılarak Nefes Testi ile Ölçüm

Kerem URAL¹ Hasan ERDOĞAN¹ Mehmet GÜLTEKİN¹ Serdar PAŞA¹ Songül ERDOĞAN¹
 Cansu BALIKÇI¹ İlayda TENDAR¹

¹ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın/TÜRKİYE

◆ **Geliş Tarihi/Received:** 11.09.2024

◆ **Kabul Tarihi/Accepted:** 30.09.2024

◆ **Yayın Tarihi/Published:** 31.12.2024

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Ural K, Erdoğan H, Gültekin M, Paşa S, Erdoğan S, Balıkçı C, Tendar İ. Parvoviral Gastroenteritisli Bir Köpekte İnce Bağırsakta Aşırı Bakteriyel Kolonizasyon ve İntestinal Metanojen Artışı: Laktuloz Probu Kullanılarak Nefes Testi ile Ölçüm. Bozok Vet Sci (2024) 5, (2):89-94.

Özet: Bu vaka raporunun amacı, Kanin Parvovirus (CPV) ile enfekte bir köpekte, laktuloz nefes testi kullanılarak ince bağırsaklarda aşırı bakteriyel çoğalma (SIBO) ile aşırı intestinal metanojen artışının (IMO) tespit edilmesi ve bu yöntemle CPV'nin intestinal permeabilite değişimlerine olan etkilerinin değerlendirilmesidir. Klinik bulguları CPV ile uyumlu ve antijen hızlı test kiti ile pozitif olarak doğrulanan bir köpekte SIBO ve/veya IMO mevcudiyetini belirlemek amacıyla hidrojen (H₂) ve metan (CH₄) nefes testi analizleri gerçekleştirildi. Hastaya laktuloz uygulamadan önce (0.dakika), laktuloz uygulandıktan 30, 60 ve 90 dakika sonra toplamda dört kez nefes numunesi pediatrik maskeli gaz toplayıcı aparat kullanılarak toplandı. Toplanan numuneler analiz edildi. İlk nefes numunesinde H₂ değeri 55 ppm olarak tespit edildi. 60. dakikada H₂ değeri 168 ppm'e yükselerek belirgin bir artış gösterdi. CH₄ değeri ise başlangıçta 19 ppm iken, 60. dakikada 31 ppm'e ulaştı. Ayrıca, 90. dakikada ikinci bir H₂ zirvesi 132 ppm olarak tespit edildi. Bu bulgular, nefes testinde SIBO'nun ve IMO'nun pozitif olduğunu gösterdi. Bu vaka raporu, CPV ile enfekte köpeklerde SIBO ve IMO'nun tespiti ve yönetiminin önemini vurgulamaktadır. Daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmakla birlikte, bu yöntemle SIBO'nun tespiti, enfeksiyonun prognozu ve yönetimi açısından kritik öneme sahip olabileceği kanaatini taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Gastroenteritis, Köpek, Nefes testi, Parvovirüs, SIBO .

Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Intestinal Methanogen Overgrowth in A Dog with Parvoviral Gastroenteritis: Measurement by Breath Testing Using A Lactulose Probe

Abstract: The aim of this case report is to detect small intestinal bacterial overgrowth (SIBO) and intestinal methanogenic overgrowth (IMO) in a dog infected with Canine Parvovirus (CPV) using lactulose breath test and to evaluate the effects of CPV on intestinal permeability changes with this method. Hydrogen (H₂) and methane (CH₄) breath test analyses were performed to determine the presence of SIBO and/or IMO in a dog with clinical findings compatible with CPV and confirmed positive with an antigen rapid test kit. Before lactulose administration to the patient (0th minute), 30, 60 and 90 minutes after lactulose administration, a total of four breath samples were collected using a pediatric masked gas collector apparatus. The collected samples were analyzed. The H₂ value was determined as 55 ppm in the first breath sample. At the 60th minute, H₂ value increased significantly to 168 ppm. The CH₄ value was initially 19 ppm and reached 31 ppm at 60 minutes. In addition, a second H₂ peak of 132 ppm was detected at 90 minutes. These findings indicated that the breath test was positive for SIBO and IMO. This case report emphasizes the importance of detecting and managing SIBO and IMO in dogs infected with CPV. Although further studies are warranted, we believe that detecting SIBO with this method may be critical for the prognosis and management of the infection.

Keywords: Breath test, Dog, Gastroenteritis, Parvovirus, SIBO

1. Giriş

Kanin parvovirus (CPV) enfeksiyonu, dünya genelinde genç köpeklerde yüksek morbidite ve mortalite oranları ile dikkat çekmektedir (1). CPV'nin patogenezi, bağırsak, timus, lenf düğümleri ve kemik iliği gibi hızla bölünen hücrelerin virüs tarafından tahrip edilmesine dayanmaktadır (2). CPV, bağırsak villüslerinin tabanında yer alan ve yeni hücrelerin kaynağı olan Lieberkühn Kriptlerine saldırarak mukozal bariyerin bozulmasına ve villöz atrofiye neden olur. Bu durum, besin malabsorpsiyonu ve enterik bakteri translokasyonu ile birlikte kusma, kanlı ishal, şiddetli dehidrasyon/hipovolemi ve sepsise yol açar (3,4). Mukozal bariyerin kaybı, artan intestinal permeabilite nedeniyle

bakterilerin ve metabolitlerinin kontrolsüz geçişine olanak tanıyarak sistemik inflamasyona zemin hazırlar (4,5).

İntestinal epitelyal bariyer (IEB), vücudun en geniş yüzey alanını oluşturarak iç ortamı dış çevreden ayırır. IEB, besinlerin emilimini sağlama ve dış patojenlere karşı ilk savunma hattını oluşturma olmak üzere iki temel fonksiyona sahiptir. IEB'nin geçirgenliği transsellüler ve parasellüler yollar aracılığıyla düzenlenir (6). Bağırsak mikrobiyotası, sıkı bağlantıların modülasyonu yoluyla IEB'yi yukarı ve aşağı yönde regüle edebilir; bu nedenle, disbiyozis intestinal permeabilite artışına neden olabilir (7). Artan intestinal permeabilite, SIBO'ya olanak sağlayarak bağırsak mikrobiyomunun değişimiyle sonuçlanır (8).

SIBO, ince bağırsağın normalde kalın bağırsakta bulunan aerobik ve anaerobik mikroorganizmalar tarafından aşırı sayıda kolonizasyonu ile karakterizedir (9). SIBO tanısında ince bağırsak sıvısının aspirasyonu ile ardından kültür ve bakteri sayımı altın standart olarak kabul edilir (10,11). Ancak, intestinal bakterilerin yalnızca %30'u kültüre edilebildiğinden bu yöntem sınırlıdır (12,13). İnce bağırsak aspirasyonu invaziv, zaman alıcı ve maliyetli bir işlemdir. Ek olarak, orta ve distal ince bağırsağın normal endoskopların erişim alanının dışında kalması yanlış negatif sonuçlara da neden olabilir (14). Aseptik tekniklerle yapılan aspirasyonlarda dahi oral ve özofageal flora kontaminasyonu önemli sayıda yanlış pozitif sonuca yol açabilir (15). SIBO'yu teşhis etmek için kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) umut verici sonuçlar vermiştir (16,17); ancak, bu teknikler klinik uygulamalarda yaygın olarak bulunmamaktadır.

IMO terminolojisi, tıp hekimliğinde dahi çok yeni olarak diagnostik manada yerini almaktadır. Bağırsak mikrobiyomunun üyeleri olan metanojenlerin aslında bakteri olmadığı, ancak arkelere ait olduğu gerçeğini daha doğru bir şekilde yansıtmaktadır. Dahası, metanojenler kolon veya ince bağırsakta aşırı çoğalabilir (18). Bu vaka raporumuzda literatür taramamız dahilinde daha önceden hiç tanımlanmadığı hali ile hem SIBO hem de IMO, CPV ile ilişkilendirilmektedir.

Nefes testi, bağırsakta üretilen ve akciğerler yoluyla atılan gazların ölçümüne dayanan invaziv olmayan, ucuz ve nispeten basit bir yöntemdir (10,19). Hidrojen (H₂) ve metan (CH₄) gazları yalnızca bağırsaktaki mikrobiyal fermentasyon yoluyla üretilir (20). Bu gazlar bağırsak mukozasından portal dolaşıma geçer, burada alveoler boşluklarda gaz transferine uğrar ve daha sonra ekspirasyon yoluyla atılır. Sağlıklı bireylerde bu süreç, çoğu bakterinin bulunduğu kalın bağırsakta başlar. Ancak, SIBO'lu hastalarda fermentasyon ince bağırsakta daha proksimalde gerçekleşir. Nefes testi sırasında bu gazlar belirli aralıklarla toplanır (18,21). Fermentasyonun bağırsaktaki anatomik konumunu belirlemek, substratın yutulmasından sonra gaz üretimi ve ekspirasyonun zamansal örüntüsüne dayanır (21).

Bu vaka raporunda, CPV ile enfekte bir köpekte H₂ ve CH₄ nefes testi kullanarak SIBO mevcudiyetinin belirlenmesi amaçlandı.

2. Olgu Sunumu

2.1. Vaka geçmişi ve klinik bulgular

Altı aylık erkek Kangal ırkı bir köpek, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi İç Hastalıkları Polikliniğine, iki gündür devam eden letarji, anoreksi ve kanlı ishal şikâyetleri ile getirildi. Anamnez bilgilerine göre, hasta 20 gün önce sahiplenilmiş olup iç-dış parazit ilaçları ve aşıların yaptırılmadığı bilgisine ulaşıldı.

2.2. Fiziksel muayene ve laboratuvar bulguları

Genel muayene sırasında, hastanın kaşektik, letarjik ve mental durumunun depresif olduğu gözlemlendi. Submandibular lenf yumrularının büyümüş olduğu ve mukoz membranların hiperemik olduğu tespit edildi. Dehidrasyon derecesi klinik bulgulara dayanarak %8 olarak belirlendi. Rektal sıcaklık 39°C, kalp frekansı 160, solunum frekansı 24 olarak ölçüldü. Kapiller dolun zamanı >3 saniye olarak belirlendi. Dışkıının makroskopik muayenesinde dışkıının yumuşak ve kanlı olduğu görüldü. Hastanın hemogram, biyokimya, kan gazı ve C-Reaktif protein (CRP) ölçümleri yapıldı. Hemogramda ciddi kemik iliği supresyonu ve anemi tespit edildi (Tablo 1). Biyokimya sonuçlarında Aspartat Aminotransferaz düzeyinde artış dışında anormallige rastlanmadı. CRP değeri 137.28 mg/L olarak bulundu ve bu değer referans aralığının üzerinde, şiddetli enfeksiyona ilişkin olarak değerlendirildi. Kan gazı ölçümlerinde respiratorik asidozis saptandı.

Tablo 1. Hastanın hemogram sonuçları

Hematolojik Veriler	Sonuç	Referans Aralığı
WBC(10 ⁹ /L)	1.71 (-)	6,0-17,0
LYM (10 ⁹ /L)	0,58 (-)	1,0-4,80
MON (10 ⁹ /L)	0,08 (-)	0,2-1,50
NEU (10 ⁹ /L)	1,03 (-)	3,0-12,0
EOS (10 ⁹ /L)	0,01 (-)	0,1-1,0
BAS (10 ⁹ /L)	0,0	0,0-0,5
RBC (10 ¹² /l)	4,5 (-)	5,5-8,5
HGB (g/dL)	12,6	12,0-18,0
HCT (%)	30,35 (-)	37,0-55,0
MCV (fl)	68	60,0-77,0
MCH (pg)	28,1 (+)	19,5-24,5
MCHC (g/dL)	41,6 (+)	31,0-34,0
PLT (10 ⁹ /L)	520 (+)	200-500
MPV (fl)	9,2	3,9-12,0

2.3. CPV tanısı

CPV tanısı için Canine Parvo Virus Antijen Test Kiti (Vet Diagnostix, Çin) kullanılarak hızlı antijen testi yapıldı ve pozitif sonuç elde edildi.



Şekil 1. CPV ile enfekte 6 aylık kangal ırkı erkek köpek.

2.4. SIBO tanısı ve nefes analiz ölçümleri

CPV tanısı konulan ve kanlı ishal şikâyeti devam eden hastanın H₂ ve CH₄ nefes testi analizleri, Nano Coulomb Breath Analyzer CA4458 (Sunvou Medical Electronics Co., Wuxi, Çin) cihazı ile gerçekleştirildi. Cihazın temini XXX Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (ADÜ-BAP) VTF-24006 kodlu GÜdümlü Proje dahilinde olmuştur.

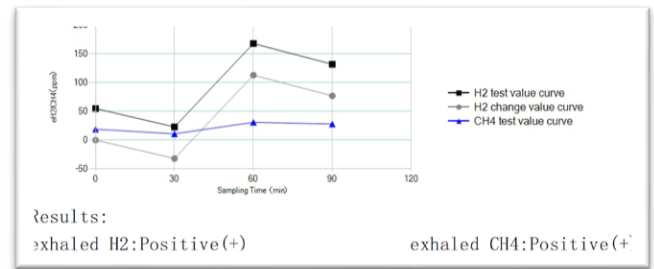
Tablo 2. Nefes analizi sonuçları.

Örnek No	Numune toplama zamanı	H ₂ /ppm	CH ₄ /ppm	O ₂ /%	CO ₂ /%
0#	15:00	55	19	18,2	1,8
1#	15:30	23	11	19,1	1,2
2#	16:00	168	31	18,1	1,9
3#	16:30	132	28	18,6	1,6



Şekil 2. Nefes toplama prosedürünün gerçekleştirilmesi.

Örnekleme prosedürü aşağıda açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. Pedyatrik hastalar için özelleştirilmiş maskeli gaz toplayıcı aparatın (Sunvou® Medical Electronics Co., Wuxi, Çin) distal ucuna tek kullanımlık hava sızdırmayan gaz numune torbası yerleştirildi. Hastaya laktuloz çözeltisi verilmeden hemen önce 0. dakikada, gaz toplayıcı aparat köpeğin ağzını tamamen içine alacak şekilde yerleştirildi ve gaz numune torbası dolana kadar beklenerek ilk nefes numunesi (#0) toplandı (Şekil 2). İlk numuneyi içeren torba aparattan çıkarılarak analiz için ayrıldı. Daha sonra hastaya oral yolla 10 ml laktuloz çözeltisi (10 gr laktuloz) (SIBOLAC®, RDA Grup, İstanbul) verildi. Nefes toplama prosedürü, laktuloz uygulamasından 30., 60. ve 90. dakikalarda üç kez daha tekrarlandı ve tüm örnekler toplama zamanına göre kategorize edildi. Tüm numuneler toplandıktan sonra analiz için hazır hale getirildi. Analizler ardışık olarak nefes analizatöründe (Sunvou® Medical Electronics Co., Wuxi, Çin, Türk tarafı distribütörü RDA Grup, İstanbul) bilgisayar bağlantısı ile software programı aracılığıyla gerçekleştirildi ve hastanın nefesindeki H₂ ve CH₄ gazları ppm biriminde saatlere göre kaydedildi (Tablo 2, Şekil 3). Bu sonuçlar ışığında hastanın SIBO (+) ve IMO (+) olduğu belirlendi.



Şekil 3. Zamana göre hastanın nefesindeki H₂ ve CH₄ gazı miktarlarını gösteren grafik.

3. Tartışma

Bu vaka takdiminde, CPV ile enfekte bir köpekte laktuloz nefes testi kullanılarak SIBO ve IMO mevcudiyetleri belirlendi. Mevcut literatürler (18,21,26), hem klinik hem de araştırma ortamlarında, başlangıç değerine göre 90.

dakikadan itibaren ≥ 20 ppm'lik bir H₂ gazı artışının pozitif bir test sonucu olarak kabul edilmesi konusunda fikir birliği sunmaktadır. Analizler esnasında ölçüm zamanlarının herhangi bir diliminde ≥ 10 ppm'lik bir CH₄ gazı artışı da IMO pozitif olarak tanımlanmaktadır (18,21). Bu vakada, ilk nefes numunesi olan #0 ölçümündeki H₂ (55 ppm) değerine göre, 60. dakikada (#2: 168 ppm) belirgin bir artış tespit edilerek ilk H₂ zirve noktası belirlenmiştir. CH₄ değerinde ise bütün ölçümlerde 10 ppm değerinden yüksek bir miktar saptanmıştır. Mevcut konsensuoslarda, SIBO tanısı için 90. dakikadan itibaren bazal (0. dakika) nefes analizine oran ile ≥ 20 ppm'lik H₂ artışı ve IMO tanısına yönelik olarak herhangi bir zamanda ≥ 10 ppm'lik CH₄ değeri pozitif kabul edilmesine rağmen, bu kriterler insan çalışmaları için belirlenmiştir ve oro-sekal geçiş süresi (OSGS) ortalama 90 dakika olarak kabul edilmektedir (18,21). Küçük hayvan hekimliğinde nefes testi gaz parametrelerine ilişkin bir konsensus henüz oluşturulmamıştır. Bu vaka raporunun da amacı ileride oluşturulacak rehberlere kılavuzluk edecek bilgi temelini tesisidir. Bu konuda kararlılıkla adım atmaya hazır olduğumuzu beyan etmek isteriz.

Literatür değerlendirmelerinde, kedi ve köpeklerde OSGS'ye ilişkin sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Köpeklerde yapılan çalışmalardan ikisi (22,23) laktuloz kullanmamış olsa da, diğer bir başka çalışmada (24) net veriler elde edilememiştir. Kedilerde yapılan araştırmada, ortalama OSGS tedavisi öncesi $27,7 \pm 3,7$ dakika ve tedavi sonrası $56,5 \pm 12,1$ dakika olarak belirlenmiştir (25). Ancak, bu araştırmalarda yalnızca laktuloz nefes testi kullanılmıştır. Laktuloz, ince bağırsak tarafından emilmediği için bu substratın nefes testi sırasında hem ince bağırsak hem de kolonda bakterilerle teması belirlenmektedir (19,27). Bu nedenle, sadece laktuloz H₂ nefes testi sırasında gözlemlenen erken H₂ artışları ince bağırsaktaki bakterilerden kaynaklanabileceği gibi, hızlı OSGS'den de kaynaklanabilmektedir (28,29). Dolayısıyla bu vaka raporunda 4'lü nefes testi değerlendirilmesinde bulunulmuş, tek artış yerine 4'lü pencereden (Tablo 2) yorumlama yapılmıştır. Böylelikle erken H₂ artışı sonraki 3 aralıklı örnekleme de desteklenerek (Şekil 3) tanı konulmuştur

İrritabl bağırsak sendromunda (IBS) hızlı ince bağırsak geçişi yaygın bir durum olup (29), değerlendirilen vakada yer alan köpekte de CPV ilişkili bağırsak inflamasyonu mevcuttu. SIBO tanısının özgüllüğünü artırmak için H₂ nefes testinin, bağımsız bir OSGS ölçümü olan sintigrafi ile birleştirilmesi önerilmektedir (29-32). Ancak, fakültemiz bünyesinde sintigrafi olanağı bulunmadığından eş zamanlı değerlendirme mümkün olmamıştır. Ayrıca, laktulozun yüksek dozda kullanımı da OSGS'yi artırabilmektedir. Nefes testlerinin prosedürüne ilişkin en güncel Avrupa Konsensusu (26), 10-25 gram laktuloz önermektedir. Ancak, bu çalışma insanlara yönelik olup, köpekler için laktuloz dozu öneren bir çalışma bulunmamakla birlikte önerilen insan dozu tercihen (mecburen) kullanıldı. Bu sebeple vakamızdaki, ilk H₂

zirvesinin 60. dakikada gözlenmesi, köpeğin OSGS'sinde artış veya laktuloz dozu ile ilişkili olabilir, ancak yine de SIBO'nun bir göstergesi olarak yorumlanabilir çünkü 90. dakikada benzer bir ikinci zirve de (Şekil 3) mevcuttur. Laktuloz substratı kolona girerken H₂ atılımında kademeli artışla erken bir zirveye veya iki belirgin H₂ zirvesine neden olabilmektedir: İlk "erken" zirve ince bağırsak mikrobiyota aktivitesini ve ikinci "geç" zirve kolon bakteriyel metabolizmasını göstermektedir (33,34). Bu vaka raporunda CPV ile enfekte köpekte, 90. dakikada 132 ppm'lik H₂ ile ikinci bir zirvenin tespiti, kolonik mikrobiyotanın açığa çıkardığı metabolik gazlarla ilişkilendirildi.

Ghoshal ve diğerlerine (35) göre, laktuloz H₂ nefes testinde biri SIBO'dan diğeri kolondan kaynaklanan çift zirve oluşumu SIBO tanısı olarak kabul edilmekte, ancak Kuzey Amerika Konsensusu'na (21) göre SIBO tanısı için nefes testinde iki zirvenin bulunması gerekmemektedir. Bununla birlikte, ilgili araştırmaların yazarları, çift zirve oluşumunun, SIBO tanısını güçlendirdiğini düşünmektedir. Nefes H₂ ortalama bazal değerleri insanlarda >16 ppm ise genellikle yüksek olarak kabul edilmektedir (36). CPV enfeksiyonu bulunan köpekte bazal H₂ değeri 55 ppm olarak ölçülmüş ve yüksek olarak değerlendirilmiştir. Ancak, veteriner hekimliğinde bu konuda çalışma eksikliği nedeniyle referans değer mevcut değildir. Başlangıçta ölçülen daha yüksek H₂ ve/veya CH₄ gazı seviyeleri, karbondhidratların devam eden fermentasyonunu göstermektedir. Bu durum, genellikle testten önce önerilen diyet preparatlarına uyulmaması veya 8-12 saatlik açlık süresinin sağlanmaması sonucu kolondan fermentasyonun ölçülmesinden kaynaklanabilir. Ancak, daha yüksek bazal hidrojen seviyeleri, zayıf oral hijyen veya ön bağırsak dismotilitésinin varlığı gibi diğer faktörleri de yansıtabilir (21). Değerlendirilen köpeğin, diyet veya açlık süresine uyumsuzluk söz konusu değildi, çünkü alınan anamnez bilgisine göre köpek 2 gündür anoreksiktir. Ön bağırsak dismotilitésinin mevcudiyetini belirlemek amacıyla, sintigrafi yöntemi ile OSGS ölçülmemiştir, ancak ilk ölçümlere göre (0., 30. dk) diğer ölçümlerde (60., 90. dk) belirgin iki zirvenin gözlenmesi, laktulozun sindirim sisteminde ince ve kalın bağırsağa ulaştığını göstermektedir. Mevcut literatürler, oral bakterilerin test şekerleri üzerindeki etkisine bağlı olarak, H₂ üretimi riskini azaltmak için başlangıç nefes ölçümleri alınmadan hemen önce oral kavitenin antiseptik bir solüsyonla (örn. klorheksidin) çalkalanmasını önermektedir (10,21,26,37). Bu vakada antiseptik gargara kullanılmamış olup, bazal H₂ artışı zayıf ağız hijyeni ile ilişkilendirilebilir.

Güncel literatürler, artan CH₄ gazı üretimi seviyelerini tanımlamak için IMO terimini önermektedirler (18,21,26). IMO terminolojisi, metanojenlerin aslında bakteri olmadığı, ancak arkelere ait olduğu gerçeğini daha doğru bir şekilde yansıtmaktadır. Dahası, metanojenler kolon veya ince bağırsakta aşırı çoğalabilir (18). Ayrıca, metanojenler SIBO yönetiminde kullanılan tek antibiyotik tedavileriyle yeterli

şekilde ekarte edilemeyebilir ve çok sayıda antibiyotik tedavi kombinasyonları (yani, rifaximin ve neomisin) gerektirebilir (38). İnsanlarda nefes testi sırasında herhangi bir zamanda (aç bir hastada başlangıç seviyesi dahil) gözlemlenen CH₄ seviyesi ≥ 10 ppm, pozitif bir IMO test sonucu olarak kabul edilmektedir (39). Çalışmamızda bazal CH₄ değeri de yüksek (19 ppm) olup, nefes H₂ değişimi ile benzer şekilde 60. dakika (31 ppm) ≥ 10 ppm zirve noktası saptanmıştır. CPV'nin kriptlerde oluşturduğu hasar, ince bağırsakta mukozal bariyeri bozarak ve intestinal permeabiliteyi artırarak; intestinal mukozada bulunan bakterilerin ve metabolitlerinin translokasyonu ile sistemik dolaşıma erişmesine ve septisemi ile sonuçlanmasına neden olmaktadır (3,4). CPV ile enfekte, mukozal hasarı bulunan köpeklerde SIBO tanısı ve yönetimi büyük önem arz etmektedir. Bu çalışma, laktuloz nefes testi ile SIBO ve IMO mevcudiyetinin CPV pozitif köpeklerde belirlenmesi ve tedavi süreçlerinin optimize edilmesi açısından önemli bir katkı sağlayacağı kanısını taşımaktayız.

4. Sonuç

CPV tanısı konulan bir köpekte, laktuloz kullanılarak gerçekleştirilen H₂ ve CH₄ nefes testi ile SIBO ve IMO teşhisi konuldu. CPV'nin prognozunda sepsisin büyük rolü nedeniyle, SIBO mevcudiyetinin belirlenebilmesi; bakteriyel translokasyon sonucu gelişen septiseminin yönetiminde önemli olacaktır. Veteriner hekimlikte bu konuda yeterli çalışma bulunmamakla birlikte, bu çalışma ön veri niteliğinde olup; nefes testi uygulama ve yorumlama prosedürlerine ilişkin daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

References

1. Mylonakis ME, Kalli I, Rallis TS. Canine parvoviral enteritis: an update on the clinical diagnosis, treatment, and prevention. *Veterinary Medicine: Research and Reports* 2016; 91:100.
2. Pollock RV. Experimental canine parvovirus infection in dogs. *Cornell Veterinarian* 1982; 72(2): 103-119.
3. Goddard A, Leisewitz AL. Canine parvovirus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2010; 40(6): 1041-1053.
4. Nandi S, Kumar M. Canine parvovirus: current perspective. *Indian Journal of Virology* 2010; 21: 31-44.
5. Di Vincenzo F, Del Gaudio A, Petito V, Lopetuso LR, Scalfaferrri F. Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Internal and Emergency Medicine* 2024; 19(2): 275-293.
6. Inczeffi O, Bacsur P, Resál T, Keresztes C, Molnár T. The Influence of Nutrition on Intestinal Permeability and the Microbiome in Health and Disease. *Frontiers in Nutrition* 2022; 9.
7. Allam-Ndoul B, Castonguay-Paradis S, Veilleux A. Gut microbiota and intestinal trans-epithelial permeability. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21(17): 6402.
8. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008; 134: 577-594.
9. Rezaie A, Pimentel M, Rao SS. How to test and treat small intestinal bacterial overgrowth: an evidence-based approach. *Current Gastroenterology Reports* 2016; 18: 1-11.
10. Gasbarrini A, Corazza GR, Gasbarrini G, Montalto M, Di Stefano M, et al. Methodology and Indications of H₂-Breath Testing in Gastrointestinal Diseases: the Rome Consensus Conference. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2009; 29: 1-8.
11. Simrén M, Stotzer PO. Use and abuse of hydrogen breath tests. *Gut* 2006; 55(3): 297-303.
12. Ghoshal UC. How to interpret hydrogen breath tests. *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 2011; 17(3): 312-317.
13. Lin HC. Small intestinal bacterial overgrowth: A framework for understanding irritable bowel syndrome. *JAMA* 2004; 292(7): 852-858.
14. Yamini D, Pimentel M. Irritable bowel syndrome and small intestinal bacterial overgrowth. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2010; 44(10): 672-675.
15. Jacobs C, Coss Adame E, Attaluri A, Valestin J, Rao SS. Dysmotility and proton pump inhibitor use are independent risk factors for small intestinal bacterial and/or fungal overgrowth. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2013; 37(11): 1103-1111.
16. Pylaris E, Giamarellos-Bourboulis EJ, Tzivras D, Koussoulas V, Barbatzas C, et al. The prevalence of overgrowth by aerobic bacteria in the small intestine by small bowel culture: relationship with irritable bowel syndrome. *Digestive Diseases and Sciences* 2012; 57: 1321-1329.
17. Sundin OH, Ladd AH, Zeng M, Diaz-Arévalo D, Morales E, et al. The Human Jejunal Microbiome has a Distinctive Bacterial Flora, With *Streptococcus tigurinus* as its Signature Species, and an Increased Fraction of Gram-Negative Phyla in Patients With Small Intestinal Bacterial Overgrowth. *Gastroenterology* 2016; 150(4): S689.
18. Pimentel M, Saad RJ, Long MD, Rao SS. ACG clinical guideline: small intestinal bacterial overgrowth. *American Journal of Gastroenterology* 2020; 115(2): 165-178.
19. Saad RJ, Chey WD. Breath testing for small intestinal bacterial overgrowth: maximizing test accuracy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2014; 12(12): 1964-1972.
20. Levitt MD. Volume and composition of human intestinal gas determined by means of an intestinal washout technic. *New England Journal of Medicine* 1971; 284(25): 1394-1398.
21. Rezaie A, Buresi M, Lembo A, Lin H, McCallum R, Rao S, et al. Hydrogen and methane-based breath testing in gastrointestinal disorders: the North American consensus. *American Journal of Gastroenterology* 2017; 112(5): 775-784.
22. Papasouliotis K, Muir P, Gruffydd-Jones TJ, Cripps PJ, Blaxter AC. The effect of short-term dietary fibre administration on oro-caecal transit time in dogs. *Diabetologia* 1993; 36: 207-211.
23. Spohr A, Guilford WG, Haslett SJ, Vibe-Petersen G. Use of breath hydrogen testing to detect experimentally induced disaccharide malabsorption in healthy adult dogs. *American Journal of Veterinary Research* 1999; 60(7): 836-840.
24. Washabau RJ, Strombeck DR, Buffington CA, Harrold D. Evaluation of intestinal carbohydrate malabsorption in the dog by pulmonary hydrogen gas excretion. *American Journal of Veterinary Research* 1986; 47(6): 1402-1406.
25. Muir P, Papasouliotis K, Gruffydd-Jones TJ, Cripps PJ, Harbour DA. Evaluation of carbohydrate malassimilation and intestinal transit time in cats by measurement of breath hydrogen excretion. *American Journal of Veterinary Research* 1991; 52(7): 1104-1109.
26. Hammer HF, Fox MR, Keller J, Salvatore S, Basilisco G, et al. European guideline on indications, performance, and clinical impact of hydrogen and methane breath tests in adult and pediatric patients. *United European Gastroenterology Journal* 2022; 10(1): 15-40.
27. Hammer HF. Colonic hydrogen absorption: quantification of its effect on hydrogen accumulation caused by bacterial fermentation of carbohydrates. *Gut* 1993; 34(6): 818-822.

28. Ghoshal UC, Shukla R, Ghoshal U. Small intestinal bacterial overgrowth and irritable bowel syndrome: a bridge between functional organic dichotomy. *Gut and Liver* 2017; 11(2): 196-208.
29. Yu D, Cheeseman F, Vanner S. Combined oro-caecal scintigraphy and lactulose hydrogen breath testing demonstrate that breath testing detects oro-caecal transit, not small intestinal bacterial overgrowth in patients with IBS. *Gut* 2011; 60(3): 334-340.
30. Bratten JR, Spanier J, Jones MP. Lactulose breath testing does not discriminate patients with irritable bowel syndrome from healthy controls. *American Journal of Gastroenterology* 2008; 103(4): 958-963.
31. Miller MA, Parkman HP, Urbain JLC, Brown KL, Donahue DJ, et al. Comparison of scintigraphy and lactulose breath hydrogen test for assessment of orocecal transit (lactulose accelerates small bowel transit). *Digestive Diseases and Sciences* 1997; 42: 10-18.
32. Riordan SM, McIver CJ, Walker BM, Duncombe VM, Bolin TD, et al. The lactulose breath hydrogen test and small intestinal bacterial overgrowth. *American Journal of Gastroenterology* 1996; 91(9): 1795-1803.
33. Pimentel M, Chow EJ, Lin HC. Eradication of small intestinal bacterial overgrowth reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *The American Journal of Gastroenterology* 2000; 95(12): 3503-3506.
34. Pimentel M, Chow EJ, Lin HC. Normalization of lactulose breath testing correlates with symptom improvement in irritable bowel syndrome: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *The American Journal of Gastroenterology* 2003; 98(2): 412-419.
35. Ghoshal UC, Ghoshal U, Das K, Misra A. Utility of hydrogen breath tests in diagnosis of small intestinal bacterial overgrowth in malabsorption syndrome, and its relationship with oro-cecal transit time. *Indian Journal of Gastroenterology* 2006; 25(1): 6-10.
36. Kumar S, Misra A, Ghoshal UC. Patients with irritable bowel syndrome exhale more hydrogen than healthy subjects in fasting state. *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 2010; 16(3): 299-305.
37. Mastropaolo G, Rees WD. Evaluation of the hydrogen breath test in man: definition and elimination of the early hydrogen peak. *Gut* 1987; 28(6): 721-725.
38. Low K, Hwang L, Hua J, Zhu A, Morales W, et al. A combination of rifaximin and neomycin is most effective in treating irritable bowel syndrome patients with methane on lactulose breath test. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2010; 44(8): 547-550.
39. Takakura W, Pimentel M, Rao S, Villanueva-Millan MJ, Chang C, et al. A single fasting exhaled methane level correlates with fecal methanogen load, clinical symptoms and accurately detects intestinal methanogen overgrowth. *The American Journal of Gastroenterology* 2022; 117(3): 470-477.

BOZOK VETERİNER BİLİMLERİ (BOZOK VET BİL) YAZIM KURALLARI

AMAÇ

Bozok Veteriner Bilimleri'nde, Veteriner Klinik Bilimleri, Veteriner Klinik Öncesi Bilimleri, Veteriner Temel Bilimleri, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi, Zootekni ve Hayvan Besleme alanlarında hazırlanmış güncel ve özgün değeri olan orijinal araştırma makaleleri, olgu sunumları, derlemeler, kısa bildiriler ve editöre mektuplar yayımlanarak ulusal ve evrensel bilime katkı sağlamak amaçlanmıştır.

KAPSAM

Bozok Veteriner Bilimleri Yozgat Bozok Üniversitesinin bilimsel yayın organı olup Haziran ve Aralık aylarında olmak üzere yılda iki kez yayımlanır. Derginin kısaltılmış ismi 'Bozok Vet Sci'dir. Yayın hayatına 2020 yılından itibaren başlayacak olan Bozok Veteriner Bilimleri hakemli ve bilimsel süreli dergi olarak yayımlanacaktır.

Dergimizde, Türkçe ve İngilizce dillerinden birinde hazırlanmış olan ve daha önce başka bir dergiye eş zamanlı olarak sunulmamış Veteriner Klinik Bilimleri, Veteriner Klinik Öncesi Bilimleri, Veteriner Temel Bilimleri, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi, Zootekni ve Hayvan Besleme alanlarında hazırlanmış orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu, davetli ve editör onayı alınmış derlemeler, kısa bildiriler ve editöre mektuplar yayımlanır.

YAZIM KURALLARI (MAKALENİN-YAZININ HAZIRLANMASI)

1. Yazıların sorumlulukları yazarlarına aittir. Gönderilen yazının yayımlanabilmesi için, yayın kurulunca tayin edilen danışmanlar tarafından uygun bulunması şarttır. Dergide yayımlanan yazılar için ücret ya da karşılık ödenmez. Kabul edilmeyen yazılar ve ekleri, aksi belirtilmediği takdirde iade edilmez.
2. Derginin yayın dili Türkçe ve İngilizce. Yayının başında, Türkçe "Özet", İngilizce "Abstract" kısımları yer almalıdır. Özet (Abstract) bölümü 200 kelimeyi geçmemelidir.
3. Metinde sade ve anlaşılır bir yazım dili kullanılmalı, bilimsel yazım tarzı benimsenmeli, gereksiz tekrarlardan kaçınılmalı ve kısaltmalar ilk kullanıldığı yerde tanımlanmalıdır.
4. Bozok Veterinary Sciences'nde yayına kabul edildiği takdirde her türlü yayın hakkının devredildiğine dair beyanları kapsayan "Copyright Form - Yayın Hakkı Devir Sözleşmesinin" sorumlu yazar tarafından imzalanarak pdf formatında gönderilmesi gerekmektedir.
5. Dergiye sunulan çalışmaların "etik kurul onayı" sorumluluğu yazarlara aittir. Bununla beraber Editör, gerektiğinde yazarlardan etik kurul belgesi isteme hakkını saklı tutar.
6. Makalede yer alan tüm yazarların bir bilimsel araştırmacı tanımlama sistemi olan ORCID ID (Open Researcher and Contributor Identifier) kayıt numarası bilgisini makale gönderilme aşamasında sisteme yüklemesi gerekmektedir. ORCID ID kaydı, <http://orcid.org> adresinden ücretsiz yapılabilir
7. Yazışma adresinde belirtilen yazar; tüm yazışmalardan, makale üzerindeki değişikliklerden (yazar sayı ve sırası dahil) ve yayına kabul edilen yazıların matbaa provasının düzeltilmesinden sorumludur.
8. Elektronik sunum: Yayın inceleme sürecini hızlandırmak amacıyla yazılar tam olarak elektronik olarak sunulmalıdır.
9. Yayınlanması istenen çalışmalar; Microsoft Word 6.0 veya daha üst versiyonda, *Times Roman* yazı karakterinde 12 punto, çift aralıklı, sayfanın tüm kenarlarında 3 cm boşluk olacak şekilde ve ilk sayfadan başlayacak şekilde satır numaraları ile birlikte yazılmalıdır. Çalışmada yer alan yazarlar ile ilgili bilgiler "Başlık Sayfası-Title Page" ile "Esas Doküman-main document" den ayrı sunulmalıdır. Orijinal araştırma ve derleme makalelerinde 16 sayfa, literatür listesi mümkünse ise 30 adet sınırını, şekil ve tablo sayısı ise 8 adet sınırını aşmaması tercih edilmelidir. Kısa bildiri ve olgu sunumlarında 10 sayfayı aşmamalıdır.
10. Bozok Veteriner Bilimleri'ne gönderilen yazılar, aşağıdaki sıraya göre (Başlık, Özet, Metin, Kaynaklar, Tablolar ve Şekiller) düzenlenmeli, Tablo ve Şekiller ayrı sayfalarda belirtilmelidir.
11. Dergiye gönderilen çalışmalar Abstract, Özet, Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular, Tartışma ve Sonuç, Kaynaklar başlıklarından oluşmalıdır. Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular, Tartışma ve Sonuç bölümleri numara verilerek belirtilmelidir (1.Giriş, 2.Materyal ve Metot, 3.Bulgular, 4.Tartışma ve Sonuç). Alt başlıklar 1.1., 1.2., şeklinde ardışık olarak numaralandırılmalıdır. Referanslar bölümü numaralandırılmamalıdır.

a. Başlık: Başlık kısa, açık, tüm harfleri büyük ve yazı için uygun olmalıdır. Özellikle elektronik sunumda makalenin sadece başlığı, (yazar ve kurum adresi vermeksizin) yazılmalıdır. Bu yöntem, yazıların uzmanlarca tarafsız bir şekilde değerlendirilmesini sağlamak amacıyla uygulanmaktadır.

b. Özet: Türkçe yazılarda Türkçe ve İngilizce özet olmalıdır. İngilizce yazılarda Türkçe özet de gereklidir. Özet, 250 kelimedenden daha uzun olmamalı; amaç, materyal ve metot, bulgular ile sonucunu içermelidir. Özetlerin

altına 4-6 adet anahtar kelime verilmelidir. Türkçe anahtar kelimeler "Türkiye Bilim Terimleri (TBT)"ne uygun olarak verilmelidir (Bkz. <http://www.bilimterimleri.com>). İngilizce anahtar kelimeler "Medical Subject Headings (MESH)" e uygun olarak verilmelidir (Bkz. <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>).

c. Metin: Araştırma makalelerinde; Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular ile Tartışma ve Sonuç bölümleri, olgu sunumlarında ise; Giriş, Olgu Sunumu, Tartışma ve Sonuç bölümleri olmalıdır. Bölüm başlıkları ilk harfi büyük olacak şekilde küçük harfler ile yazılmalıdır. Yazılarda "Systeme International (SI)" birimleri kullanılmalıdır. Derleme makaleler için hazırlanan özet derlemenin konusu hakkında bilgi ve derlemenin amacından oluşmalıdır. Derleme makalesi "Giriş" ile başlamalı, yazar/lar tarafından belirlenecek ara başlıklarla devam etmeli, "Sonuç" ve "Kaynaklar" ile tamamlanmalıdır.

d. Sembol, birim ve kısaltmalar: Dergimiz, *Scientific Style and Format, The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, Council of Science Editors, Reston, VA, USA (7th ed.) tarafından belirtilen sistemi kabul etmektedir. ×, μ, η, veya v gibi semboller MS Word sembol listesinden seçilerek kullanılmalıdır. Derece (°) sembolü gösterimi için; "O" harfinin veya "0" rakamının üst simge şeklinde gösterilmesi ile yapılmamalı sembol menüsünden kullanım tercih edilmelidir. Çarpım "x" harfi değil sembol menüsü (×) kullanılmalıdır. Sayı, birim ve matematiksel semboller (+, -, ×, =, <, >), kullanıldıktan sonra bir boşluk bırakılmalı (örneğin., 3 kg), yüzde işaretinden sonra boşluk bırakılmamalıdır (örneğin, %45). Latince et al., in vitro veya in situ terimleri italic olarak gösterilememelidir.

e. Kaynaklar: Kaynaklar metin içinde parantez içinde numara ile belirtilmelidir. Birden fazla kaynağa atıf yapılacaksa aynı parantez içerisinde belirtilmelidir örn, (3,5,7-11). Literatür listesinde yer alan kaynakların her biri için metinde atıf yapılmalıdır.

Beşten fazla yazarı olan kaynaklarda, beşinciden sonrası için "et al." eki kullanılmalı, aşağıda verilen sistematik ile noktalama işaretleri ve yazım kurallarına dikkat edilerek yazılmalıdır.

- Kaynak süreli yayın ise;** Örnek: Durmuş İ, Demirtaş ŞE, Can M, Kalebaşı S. Determining egg consumption habits in Ankara. *Tavukçuluk Araştırma Dergisi* 2007; 7: 42-45 (article in Turkish with an English abstract).
- Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance* 2018; 11: 1645-1658. doi: 10.2147/IDR. S173867.
- Kaynak editörlü kitaptan bir bölüm ise;** Örnek: Gay CC, Besser TE. *Escherichia coli septicaemia in calves*. Gyles CL. eds. In: *Escherichia Coli in Domestic Animals and Humans*. Wallingford: CAB International, 1994; pp.75-90.
- Kaynak kitap ise;** Örnek: Varley H, Gowenlock AH, Bell M. *Practical Clinical Biochemistry*. Fifth Edition. London: William Heinemann Medical Books Ltd, 1984; p. 685.
- Kaynak editörlü kitap ise;** Örnek: Constable PD, Hinckliff KW, Done SH, Grunberg W. *Veterinary Medicine*. Eleventh Edition. London: W.B. Saunders Company, 2017; p.57.
- Kaynak kongre bildirisi ise;** Örnek: Kırbas A, Degirmencay S., Kilinc AA, Eroglu MS. Increased cardiac troponin-I concentration and cardiac enzyme activities in neonatal calves with sepsis. Second International Veterinary Internal Medicine Congress. October, 11-13, 2019; Ankara-Türkiye.
- Kaynak tez ise;** Örnek: Kırbas A. Elâzığ, Samsun, Sivas, Tokat ve Yozgat illerindeki sığır ve koyunlarda Kırım Kongo Kanamalı Ateş virüs enfeksiyonunun seroprevalansının araştırılması, Doktora tezi, Fırat Üniv Sağ Bil Ens, Elâzığ 2009; s.1-2. (thesis in Turkish with an English abstract).

Web tabanlı erişimler kaynak olarak gösterilmemelidir.

f. Tablolar; kaynaklar kısmından sonra, her bir tablo ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tablo başlıklarının yalnızca ilk harfleri büyük olmalıdır. Tablo başlıkları tablonun üzerinde bulunmalı ve **Tablo 1. (Table 1.)** şeklinde numaralandırılmalıdır. Tablolarda iç ve yan kılavuz çizgiler kullanılmamalıdır. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar tabloların altına yerleştirilmelidir.

Örnek:**Table 1.** Determination of elements in Dogfish Liver certified reference material

Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
	Certified ^a	Found ^b	R(%)
A I ^c	200	215 \pm 10	108
V c	0.6	0.56 \pm 0.01	93
Cr ^c	1.4	1.52 \pm 0.02	109
Co ^c	0.25	0.28 \pm 0.02	112
As	9.66 \pm 0.62	9.55 \pm 0.16	99
Cd	24.3 \pm 0.8	24.2 \pm 0.3	100
Cu	31.2 \pm 1.1	31.7 \pm 0.4	102
Fe	1833 \pm 75	1914 \pm 65	104
Pb	0.16 \pm 0.04	0.16 \pm 0.02	100
Hg	2.58 \pm 0.22	2.31 \pm 0.02	90
Ni	0.97 \pm 0.11	0.94 \pm 0.03	97
Se	8.3 \pm 1.3	8.3 \pm 0.2	100
Ag	0.93 \pm 0.07	0.86 \pm 0.01	92
Zn	116 \pm 6	113 \pm 1	97

^a At 95 % confidence level

^b $\bar{x} \pm SD$, n=3, ^cInformation value

g. Her resim, grafik ve çizim; şekil olarak kabul edilip **Şekil 1. (Figure 1.)** gibi yazılmalı, her biri ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar şekil ismi ile birlikte şeklin altına yerleştirilmelidir. Resimler 300dpi çözünürlükte olmalıdır.

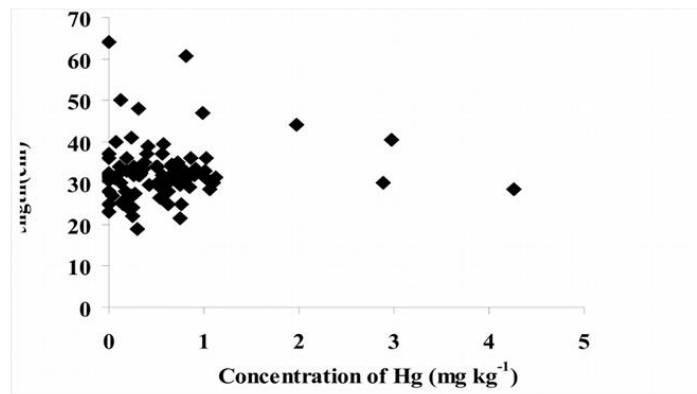
Örnek:

Figure 1. Concentration of Hg (mg kg⁻¹)

Yayının baskı öncesi matbaa provasý yazýþmadan sorumlu yazara gönderilir ve üç gün içerisinde kontrol edilerek dergiye geri gönderilmesi istenir.

Her yayın için Bozok Veteriner Bilimleri'nin ilgili sayısı yazýþmadan sorumlu yazara gönderilir. Makalelerin PDF türü tam metin dosyalarına derginin web sayfasından erişilebilir.

BOZOK VETERINARY SCIENCES (BOZOK VET SCI)

WRITING RULES

Purpose

In Bozok Veterinary Sciences, by publishing original research articles, case reports, reviews, short papers and letters to the editor with current and original value prepared in the fields of Veterinary Clinical Sciences, Veterinary Preclinical Sciences, Veterinary Basic Sciences, Food Hygiene and Technology, Animal Science and Animal Nutrition. It is aimed to contribute to national and universal science.

Scope

Bozok Veterinary Sciences is the scientific publication of Yozgat Bozok University and is published twice a year, in June and December. The abbreviated name of the journal is Bozok Vet Sci. Bozok Veterinary Sciences, which will start its publication life in 2020, will be published as a peer-reviewed and scientific periodical.

In our journal, an original research article, case report, prepared in the fields of Veterinary Clinical Sciences, Veterinary Preclinical Sciences, Veterinary Basic Sciences, Food Hygiene and Technology, Animal Science and Animal Nutrition, which was prepared in one of the Turkish and English languages and was not presented simultaneously to another journal, invited and editor-approved reviews, short papers and letters to the editor are published.

WRITING RULES (PREPARATION OF THE ARTICLE-ARTICLE)

1. Responsibilities of the articles belong to their authors. In order for the submitted manuscript to be published, it must be approved by the advisors appointed by the editorial board. No fee or compensation is paid for the articles published in the journal. Unaccepted manuscripts and their appendices will not be returned unless otherwise stated.
2. The publication languages of the journal are Turkish and English. At the beginning of the publication, the Turkish "Abstract" and the English "Abstract" sections should be included. The abstract section should not exceed 200 words.
3. A plain and understandable writing language should be used in the text, scientific writing style should be adopted, unnecessary repetitions should be avoided and abbreviations should be defined where they are first used.
4. If accepted for publication in Bozok Veterinary Sciences, the "Copyright Form - Copyright Transfer Agreement", which includes the declarations regarding the transfer of all kinds of publication rights, must be signed by the responsible author and sent in pdf format.
5. Responsibility for the "ethics committee approval" of the studies submitted to the journal belongs to the authors. However, the Editor reserves the right to request an ethics committee document from the authors when necessary.
6. All authors in the article are required to upload the ORCID ID (Open Researcher and Contributor Identifier) registration number information, which is a scientific researcher identification system, to the system at the time of submitting the article. ORCID ID registration can be done free of charge at <http://orcid.org>.
7. The author specified in the correspondence address; He is responsible for all correspondence, changes on the article (including the number and order of the author) and correction of the printing proof of the articles accepted for publication.
8. Electronic submission: Manuscripts should be submitted fully electronically in order to speed up the publication review process.
9. Studies to be published; It should be written in Microsoft Word 6.0 or higher, in Times Roman font, 12 points, double-spaced, with 3 cm margins on all sides of the page, and with line numbers starting from the first page. Information about the authors in the study should be presented separately from the

- "Title Page" and "Main Document". It should be preferred that the original research and review articles should not exceed 16 pages, the literature list should not exceed 30 if possible, and the number of figures and tables should not exceed 8. Short papers and case reports should not exceed 10 pages.
10. Manuscripts sent to Bozok Veterinary Sciences should be arranged in the following order (Title, Abstract, Text, References, Tables and Figures), Tables and Figures should be indicated on separate pages.
 11. Studies submitted to the journal should consist of Abstract, Introduction, Material and Method, Results, Discussion and Conclusion, References. Introduction, Material and Method, Results, Discussion and Conclusion sections should be numbered (1. Introduction, 2. Material and Method, 3. Findings, 4. Discussion and Conclusion). Sub-headings should be numbered sequentially as 1.1., 1.2.,... The references section should not be numbered.
 - a) **Title:** The title should be short, clear, all capital letters and appropriate for the text. Especially in the electronic submission, only the title of the article (without giving the author and institution address) should be written. This method is applied to ensure that the articles are evaluated impartially by experts
 - b) **Abstract:** In Turkish articles, there should be an abstract in Turkish and English. Turkish abstracts are also required for English articles. The abstract should not be longer than 250 words; should include the purpose, material and method, findings and conclusion. 4-6 keywords should be given under the abstracts. Turkish keywords should be given in accordance with "Turkish Science Terms (TBT)" (See <http://www.bilimterimleri.com>). English keywords should be given in accordance with "Medical Subject Headings (MESH)" (See <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>).
 - c) **Text:** In research articles; Introduction, Material and Method, Results and Discussion and Conclusion sections, in case reports; There should be Introduction, Case Report, Discussion and Conclusion sections. Chapter titles should be written in lowercase letters with the first letter capitalized. "Systeme International (SI)" units should be used in manuscripts. The summary prepared for the review articles should consist of information about the subject of the review and the purpose of the review. The review article should start with "Introduction", continue with subheadings to be determined by the author/s, and should be completed with "Conclusion" and "References".
 - d) **Symbols, units and abbreviations:** Our journal accepts the system specified by Scientific Style and Format, The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Council of Science Editors, Reston, VA, USA (7th ed.). Symbols such as \times , μ , η , or v should be selected from the MS Word symbol list and used. For degree ($^{\circ}$) symbol display; It should not be done by showing the letter "O" or the number "0" as superscript, it should be preferred to use from the symbol menu. Symbol menu (\times) should be used, not the product letter "x". Numbers, units, and mathematical symbols (+, -, \times , =, <, >) should be followed by a space (e.g. 3 kg), not a percent sign (e.g. 45%). Latin et al., in vitro or in situ terms should not be shown in italics.
 - e) **References:** References should be indicated in the text with numbers in parentheses. If more than one source is to be cited, it should be stated in the same parenthesis, eg (3,5,7-11). Reference should be made in the text for each of the sources in the literature list.
 12. In references with more than five authors, "et al." suffix should be used, and it should be written in the following systematic, paying attention to the punctuation marks and spelling rules.
 - a) **If the source is a periodical;** Durmuş İ, Demirtaş ŞE, Can M, Kalebaşı S. Determining egg consumption habits in Ankara. Tavukçuluk Araştırma Dergisi 2007; 7: 42-45 (article in Turkish with an English abstract).
 - b) Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. Infection and Drug Resistance 2018; 11: 1645-1658. doi: 10.2147/IDR.S173867.
 - c) **If the source is a chapter from the edited book;** Gay CC, Besser TE. Escherichia coli septicaemia in calves. Gyles CL. eds. In: Escherichia Coli in Domestic Animals and Humans. Wallingford: CAB International, 1994; pp.75-90.
 - d) **If the source book;** Varley H, Gowenlock AH, Bell M. Practical Clinical Biochemistry. Fifth Edition. London: William Heinemann Medical Books Ltd, 1984; p. 685.
 - e) **If the source is an edited book;** Constable PD, Hinckliff KW, Done SH, Grunberg W. Veterinary Medicine. Eleventh Edition. London: W.B. Saunders Company, 2017; p.57.
 - f) **If the source is the congress notice;** Kirbas A, Degirmencay S., Kilinc AA, Eroglu MS. Increased cardiac troponin-I concentration and cardiac enzyme activities in neonatal calves

with sepsis. Second International Veterinary Internal Medicine Congress. October, 11-13, 2019; Ankara-Türkiye

- g) **If the source is thesis**; : Kırbaş A. Elâzığ, Samsun, Sivas, Tokat ve Yozgat illerindeki sığır ve koyunlarda Kırım Kongo Kanamalı Ateş virüs enfeksiyonunun seroprevalansının araştırılması, Doktora tezi, Fırat Üniv Sağlık Bil Ens, Elâzığ 2009; s.1-2. (thesis in Turkish with an English abstract).

Web-based access should not be cited as a source.

- f) **Tables**; After the references part, each table should be given on a separate page. Only the first letters of table titles should be capitalized. Table headings should be above the table and numbered as Table 1. (Table 1.). Inside and side guide lines should not be used in tables. Descriptive information and explanations should be placed below the tables.

Sample :

Table 1. Determination of elements in Dogfish Liver certified reference material

	Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	Certified ^a	Found ^b	R(%)
Al ^c	200	215 \pm 10	108
V ^c	0.6	0.56 \pm 0.01	93
Cr ^c	1.4	1.52 \pm 0.02	109
Co ^c	0.25	0.28 \pm 0.02	112
As	9.66 \pm 0.62	9.55 \pm 0.16	99
Cd	24.3 \pm 0.8	24.2 \pm 0.3	100
Cu	31.2 \pm 1.1	31.7 \pm 0.4	102
Fe	1833 \pm 75	1914 \pm 65	104
Pb	0.16 \pm 0.04	0.16 \pm 0.02	100
Hg	2.58 \pm 0.22	2.31 \pm 0.02	90
Ni	0.97 \pm 0.11	0.94 \pm 0.03	97
Se	8.3 \pm 1.3	8.3 \pm 0.2	100
Ag	0.93 \pm 0.07	0.86 \pm 0.01	92
Zn	116 \pm 6	113 \pm 1	97

^a At 95 % confidence level

^b $\bar{x} \pm SD$, n=3, ^cInformation value

Every picture, graphic and drawing; should be accepted as figures and written like Figure 1. (Figure 1.), each one should be given on a separate page. Descriptive information and explanations should be placed under the figure along with the figure name. Pictures must be at 300dpi resolution.

Sample:

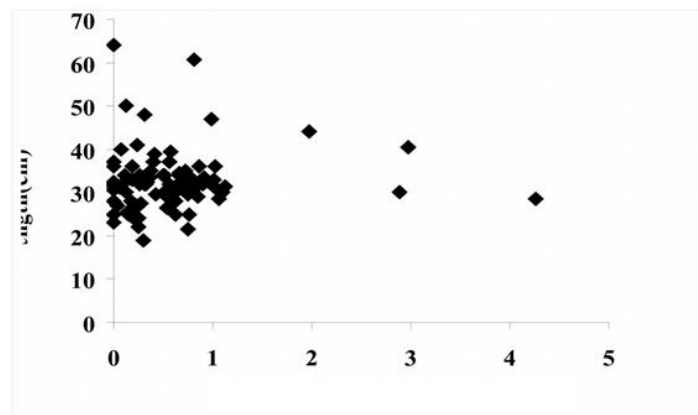


Figure 1. Concentration of Hg (mg kg⁻¹)

The prepress proof of the publication is sent to the corresponding author and it is requested to be checked and returned to the journal within three days.

For each publication, the relevant issue of Bozok Veterinary Sciences is sent to the corresponding author. PDF-type full-text files of the articles can be accessed from the journal's web page.

BOZOK VETERİNER BİLİMLERİ
Yayın Hakları Devri Sözleşmesi

Makale Türü: () Araştırma () Olgu Sunumu () Derleme () Kısa bildiri () Editöre mektup

Makale Başlığı:.....

Biz türü ve başlığı yukarıda belirtilmiş makalenin yazarları olarak; Bozok Veteriner Bilimleri'nin yazım ve yayın şartlarını bilerek ve kabul ederek hazırlayıp yayımlanması dileğiyle Bozok Veteriner Bilimleri Editörlüğüne gönderdiğimiz makalenin orijinal olduğunu, kısmen veya tamamen daha önce yayımlanmadığını veya eşzamanlı olarak başka bir yayın kuruluşuna gönderilmediğini, makale yayımlandıktan sonra ortaya çıkabilecek her türlü bilimsel ve etik sorumluluğun bize ait olduğunu ve Bozok Veteriner Bilimleri'nin hiçbir sorumluluk taşımayacağını, danışman ve dergi editörü tarafından gerekli görülen düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkını, yazının yayımlandığı tarihten itibaren Bozok Veteriner Bilimleri'ne devrettiğimizi taahhüt ederiz.

Bununla birlikte yazarların telif hakkı dışında kalan patent vb. tescil edilmiş hakları, yazarların kitap ve dersler gibi çalışmalarında makalenin tümü ya da bir bölümünü ücret ödemeksizin kullanım hakkı, ticari amaçla kullanmamak üzere makaleyi çoğaltma hakkı saklıdır.

Sorumlu Yazar

Adı ve Soyadı:

Adres:

Tel/Fax:

E-posta:

Tarih:.....İmza:.....

Not: Lütfen formu doldurduktan sonra pdf formatında, başlangıç sayfası ve esas doküman ile birlikte e-posta adresimize gönderiniz.

Elektronik posta:

bvs@bozok.edu.tr

bvs@yobu.edu.tr

Adres:

Yozgat Bozok Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Sorgun Meslek Yüksekokulu Binası, Ahmet Efendi Mah. Toki konutları
Yanı 3500.Cad. No:4 66700 SORGUN/YOZGAT

**BOZOK VETERINARY SCIENCES
COPYRIGHT RELEASE FORM**

Article Type: Research Case Report Review Short Paper Letter to Editor

Manuscript Title:

.....

As the authors of the article whose type and title are mentioned above; We wish to prepare and publish Bozok Veterinary Sciences with the knowledge and acceptance of the editorial and publication terms, and the article that we sent to Bozok Veterinary Sciences Editor is original, partially or completely not published before or not sent to another publication institution simultaneously, any scientific and ethical issues that may arise after the article is published. We undertake that we are responsible and that Bozok Veterinary Sciences will not bear any responsibility, and that we have transferred all rights of publication to Bozok Veterinary Sciences as of the date of publication, together with the corrections required by the consultant and journal editor.

However, patents, other than the copyright of the authors, etc. registered rights, authors' right to use all or part of the article free of charge in their works such as books and lessons, and the right to reproduce the article for non-commercial use.

Corresponding Author

Name and Surname:

Address:

Phone/Fax:

E-mail:

Date:..... Signature:.....

Notes: Please fill the form and send it to our e-mail address in pdf format with the start page and the main document.

E-mail: bvs@bozok.edu.tr

bvs@yobu.edu.tr

Adress: Yozgat Bozok University, Faculty of Veterinary Medicine, Sorgun Vocational School Building, Ahmet Efendi Mah. Toki konutları Yanı 3500.Cad. No:4 66700 SORGUN/YOZGAT



İçindekiler / Contents

2024, 5 (2)

Araştırma Makaleleri / Research Articles

- Aslandoğan O, Güneş V. *İshalli Buzağılarda Prokalsitonin ve Sitokin Düzeyleri*.....35-42
- Atalay T, Vuruş SN. *Sahipsiz Hayvanların İç ve Dış Parazit Mücadelesi İçin Yaş Mama-İlaç Karışımı Hazırlanması ve Uygulamasının Denenmesi*.....43-47
- Özkaya Y, Gündoğ D, Güngör C, Ertaş-Onmaz N. *Hayvansal Gıdalardan Elde Edilen Kocuria Varians İzolatlarının Biyofilm Üretim ve Antibakteriyel Direnç Profillerinin Araştırılması*.....48-54
- Çöllü EM, Özalp T, Erdoğan S, Ural K, Erdoğan H. *Investigation Of Zonulin Levels in Dogs Infected with Canine Distemper Virus*.....55-61
- Karaoğlu S, Ural K. *Köpeklerde Atopik Dermatit, Leishmaniazis ve Demodikoze Klinik Skorlamaların Araştırılması*.....62-68
- Yılmaz E, Atıcı E. *İki Farklı Ağır Metalin (Bakir ve Çinko) Tıbbi Sülükler (Hirudo Verbana) ve Salya Antimikrobiyal Özellikleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması*.....70-75

Olgu Sunumu / Case Reports

- Tüfekçi E, Ekinci G, Tuzcu M, Güneş V, Abozaid AMA, Ersöz B, Bali B, Bendeş C. *A Case of Acute Lymphoblastic Leukemia in a Cats*.....76-84
- Kocaman Y, Orhun ÖT, Turgut F, Gölgeli-Bedir A, Okur S, Şenocak MG, Gözegir B. *Secondary Healing Following Trauma-Induced Partial Glossectomy: Case Report of an Arabian Horse*.....85-88
- Ural K, Erdoğan H, Gültekin M, Paşa S, Erdoğan S, Balıkçı C, Tendar İ. *Parvoviral Gastroenteritisli Bir Köpekte İnce Bağırsakta Aşırı Bakteriyel Kolonizasyon ve İntestinal Metanojen Artışı: Laktuloz Probu Kullanılarak Nefes Testi ile Ölçüm*.....89-94