ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇİĞ PET MAMALARINDA MİKROBİYOTA ANALİZİ, İNSAN SAĞLIĞINI TEHDİT EDEN BAZI ZOONOZ BAKTERİLERİN VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN TESPİTİ

Gulan Abdullah Zainalabideen ZAINALABIDEEN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Gulan Abdullah Zainalabideen ZAINALABIDEEN tarafından hazırlanan **"Çiğ Pet Mamalarında Mikrobiyota Analizi, İnsan Sağlığını Tehdit Eden Bazı Zoonoz Bakterilerin ve Antibiyotik Dirençliliğinin Tespiti"** adlı tez çalışması 18/07/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman **:** Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN

Jüri Üyeleri **:**

Başkan **:** Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
Ankara Üniversitesi

Üye **:** Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN
Eldivan Sağlık Hizmetleri MYO
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT
Eldivan Sağlık Hizmetleri MYO
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hamit ALYAR

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **"Çiğ Pet Mamalarında Mikrobiyota Analizi, İnsan Sağlığını Tehdit Eden Bazı Zoonoz Bakterilerin ve Antibiyotik Dirençliliğinin Tespiti"** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (18/07/2023).

Gulan Abdullah Zainalabideen ZAINALABIDEEN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇİĞ PET MAMALARINDA MİKROBİYOTA ANALİZİ, İNSAN SAĞLIĞINI TEHDİT EDEN BAZI ZOONOZ BAKTERİLERİN VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN TESPİTİ

Gulan Abdullah Zainalabideen ZAINALABIDEEN

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN

Araştırmanın konusu insan sağlığı açısından risk oluşturan ciddi enfeksiyonlara neden olan 4 zoonoz bakteri olan *E. coli*, *Salmonella spp.*, *S. aureus* ve *A. baumannii*'nin piyasadan toplanan BARF'lardaki varlığı ile sağaltımda yaygın olarak kullanılan 9 antibiyotiğe karşı 15 direnç geninin bu mamalardaki varlığının tespiti; farklı etlerden üretilen BARF'ların mikrobiyotasının araştırılmasıydı. Bunun için piyasadan alınan 20 BARF örneğinde farklı oranlarda olmak üzere bu 4 bakteri de tespit edildi. Kedi BARF'larında sadece *Salmonella spp.* ve *A. baumannii* saptanırken köpeklerinkinde 4'ü de mevcuttu. Kedi mamalarının sadece birinde antbiyotik direnç genleri tespit edilirken köpek mamalarının üçünde tespit edildi. Tüm mamalarda en sık görülen direnç geni *gyrA* ile kodlanan siprofloksasine karşıydı. Bunun dışında amoksisilin-klavulanik asit, kinolonlar, kolistin, metisilin ve sefepime karşı da direnç geni tespit edildi. Mikrobiyota analizlerinde endokarditis, amnionitis, artritis, meningitis ve bakteriyemiye neden olabilen bakteriler tespit edildi. Kuzu ve kuzu/sığır eti karışımı kullanılan BARF'ta insanların tükürük ve vaginasında bulunan türler daha fazlaydı. Bu durum üretim aşamasında hijyenik koşulların yeterli olmadığını gösterir nitelikteydi. Paketlenmiş gıdalarda bozulmadan sorumlu *Lactobacillus spp.*'lerin fazlalığı ürünlerin raf ömrünün daha üretim aşamasından itibaren kısıtlı olduğunu göstermekteydi.

2023, 61 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Mikrobiyota, Çiğ pet maması, Antimikrobiyel direnç, RT-PCR, Zoonoz bakteri, *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella spp.*, *A. baumannii*

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MICROBIOTA ANALYSIS IN RAW PET FOODS, DETECTION OF SOME ZOONOTIC BACTERIA THAT THREATEN HUMAN HEALTH AND ANTIBIOTIC RESISTANCE

Gulan Abdullah Zainalabideen ZAINALABIDEEN

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Özgür KUZUKIRAN

The subject of the research was the detection of four zoonotic bacteria, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *S. aureus*, and *A. baumannii*, which pose serious risks to human health, their presence in collected BARF products, and the identification of 15 resistance genes against 9 commonly used antibiotics in these products. For this purpose, in the 20 collected BARF samples from the market, all four bacteria were detected in varying proportions. Only *Salmonella spp.* and *A. baumannii* were found in cat BARFs, while all four bacteria were present in dog BARFs. Antibiotic resistance genes were detected in only one of the cat food samples, while they were found in three of the dog food samples. The most commonly detected resistance gene in all samples was *gyrA*, which confers resistance to ciprofloxacin. Additionally, resistance genes against amoxicillin-clavulanic acid, quinolones, colistin, methicillin, and cefepime were also identified. Bacteria capable of causing endocarditis, amnionitis, arthritis, meningitis, and bacteremia were detected in the microbiota analysis. BARFs containing lamb and lamb/beef mixture had a higher presence of species found in human saliva and vagina, indicating inadequate hygiene conditions during production. The abundance of *Lactobacillus spp.*, responsible for food spoilage, in packaged foods suggested that the shelf life of the products was limited from the production stage.

2023, 61 pages

Keywords: Microbiota, Raw pet food, Antimicrobial resistance, RT-PCR, Zoonose bacteria, *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella spp.*, *A. baumannii*

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN'a sabrı, rehberliği ve anlayışı için, Prof. Dr. Gülçin AKÇA'ya ve ekibine mikrobiyolojik çalışmalardaki yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Gulan Abdullah Zainalabideen ZAINALABIDEEN
Çankırı, Temmuz 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 BARF Nedir? **3**
2.2 BARF'ın Besin İçeriği **4**
2.3 BARF'ın Fizyolojik Etkileri **5**
2.4 BARF'ta Sağlık Riskine Neden Olan Bakteriyel Patojenler **6**
2.5 Üretime Bağlı Kontaminasyon **8**
2.6 Diğer Koşullara Bağlı Kontaminasyon **10**
2.7 İnsan Sağlığına Yönelik Riskler **11**
2.8 Bağırsak Mikrobiyotası **15**
2.9 Antibiyotik Direnci **16**
2.10 Real Time-PCR **21**
2.11 Mikrobiyota Analizi **22**
3. MATERYAL VE METOT **26**
3.1 Örneklerin Alınması ve Hazırlanması **26**
3.2 16S Amplikon Dizileme **26**
3.3 Biyoinformatik Analiz **27**
3.4 RT-PCR **27**
4. BULGULAR VE TARTIŞMA **30**
4.1 RT-PCR Bulguları **31**
4.2 Mikrobiyota Bulguları **32**
5. SONUÇ VE ÖNERİLER **42**
KAYNAKLAR **44**

EKLER.....60
ÖZGEÇMİŞ.....62

SİMGELER DİZİNİ

g	Bağıl merkezkaç kuvveti
dk	Dakika
CT	Eşik döngüsü
µL	Mikrolitre
mM	Mili molar
s	Saniye
ºC	Santigrat derece

KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BARF	Biyolojik olarak uygun çiğ gıda veya kemikler ve çiğ gıda
ESBL	Genişletilmiş spektrumlu β-laktamaz
HM	Ev yapımı
LPS	Bakteriyel lipopolisakkarit
MDR	Çoklu ilaca dirençli bakteriler
MRSA	Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*
PCR	Polimer zincir reaksiyonu
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimer zincir reaksiyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 Kedi mamalarında bakterilerin dağılımları 30
Şekil 4.2 Köpek mamalarında bakterilerin dağılımları 31
Şekil 4.3 Bakterilerin görülme sıklığı (%) 37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Antibiyotik grupları ve etki mekanizmaları 18
Çizelge 3.1 Antibiyotik direnci için primerler 28
Çizelge 3.2 Bakteri primerleri 29
Çizelge 4.1 Bakteri tespit edilen örneklerdeki et türleri 31
Çizelge 4.2 Direnç genleri ve CT değerleri 32
Çizelge 4.3 Kuzu etli BARF bakterileri (taksonomi ve bulunma sıklıkları) 33
Çizelge 4.4 Sığır/domuz etli BARF bakterileri (taksonomi ve bulunma sıklıkları) 34
Çizelge 4.5 Hindi/ördek etli BARF bakterileri (taksonomi ve bulunma sıklıkları) 35
Çizelge 4.6 Dana/kuzu etli BARF bakterileri (taksonomi ve bulunma sıklıkları) 36

1. GİRİŞ

Evcil kedi ve köpeklere çiğ et ve türevlerinden hazırlanan mamaların verilmesinin dünya çapında son yıllarda popülerleşen bir trend haline geldiği bildirilmektedir Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmalar hayvan sahiplerinin yaklaşık olarak %60'ının tamamen veya kısmen çiğ et ağırlıklı beslenmeyi tercih ettiğini ortaya koymaktadır (Anturaniemi *et al.* 2019). Bu mamalar ev yapımı diyetler olarak hazırlanıp sunulabildiği gibi dondurulmuş olarak veya kurutulmuş olarak piyasadan satın alınabilmektedir. Bu çiğ mamalar muhtemelen pişmiş karbonhidrat premiksi ile tamamlanan, kesilmiş hayvanların organları ile kas dokuları, kemiklerini de kapsayan kesimhane artıklarını temel alan ham bileşenlerden oluşmaktadır. Bu diyetlerin içerikleri karbonhidrat da dahil olmak üzere tamamen ham maddelere dayalı olduğundan "biyolojik olarak uygun çiğ gıda veya kemikler ve çiğ gıda (BARF)" adını almaktadırlar. BARF mamalar ister evde yapılmış olsun isterse çevrimiçi olarak tedarik edilsin genellikle taze hazırlanabilmekte veya -20 ^{o}C'deki dondurucularda saklanmaktadır (Waters 2017).

Çiğ et diyetleriyle beslenmenin, kedi ve köpeğin gastrointestinal mikrobiyomunu değiştirdiği, *Fusobacterium* ve *Clostridium* cinsinin üyeleri de dahil olmak üzere, protein ve yağ kullanımıyla ilişkili bakterilerin nispi bolluğunu arttırdığı gösterilmiştir. İnsanlarda, bu cinsler daha çok hastalıkla ilişkili üyeler olarak bilinirken, gastrointestinal mikrobiyotanın normal bir bileşeni olan zararsız kommensalleri de içeren çeşitli bir gruptur. Ayrıca, bu cinslerin üyelerinin protein ve amino asit fermantasyonu sonucunda bütirat ürettikleri ve çiğ etle beslenen köpek ve kedilerde bağırsak homeostazına katkıda bulundukları bilinmektedir (Butowski *et al.* 2022).

Öte yandan 2017'de Birleşik Krallık'ta, çiğ et ürünlerinin %80'ini etkileyen patojen kontaminasyonu insidansının, tam yemdeki bu tür kontaminantların insidansından beş kat daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Davies *et al.* 2019). Ayrıca yakın tarihli bir çalışma, *Mycobacterium bovis* ile kontamine olmuş çiğ et diyetine bağlı olarak kedilerde tüberküloz insidansını bildirmiştir (O'Halloran *et al.* 2019).

Çiğ diyetlerin hijyeni üzerine yapılan araştırmalar, bu ürünlerin *Escherichia coli, Clostridium spp., Salmonella spp., Listeria spp.* ve *Campylobacter spp.* açısından evcil hayvanlar ve çiğ et ürünleri ile çalışan kişiler için somut bir risk oluşturabileceğini göstermektedir (Ahmed *et al.* 2021).

Şu anda, çiğ et diyetlerinin kedi ve köpek mikrobiyotası üzerindeki etkilerini inceleyen sınırlı sayıda çalışma vardır ve bunların çoğu tanımlayıcıdır. Anahtar mikrobiyal grupların çiğ et diyetlerinin metabolizmasındaki rollerini işlevsel olarak karakterize etmek ve konağın sağlığı ve beslenmesi üzerindeki etkilerini belirlemek için ek kontrollü ve sistem tabanlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu araştırmada piyasada bulunan ve farklı hayvansal kaynaklardan üretilen BARF'lardan örnekler alınarak mikrobiyota analizinin yapılması, insan sağlığı açısından risk oluşturan *Acinetobacter baumannii, E. coli, Salmonella spp.* ve *Staphylococcus aureus* varlığı ile bu bakterilerin yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı taşıdıkları direnç genlerinin tespiti amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 BARF Nedir?

Dünya çapında, nüfusun yarısından fazlasının evcil hayvan beslediği bildirilmektedir. Yalnızca Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde 47 milyon hanede en az bir kedi ve 60 milyon hanede en az bir köpeğin olduğu, toplamda ise 100 milyon kadar kedi ve 90 milyon kadar da köpek olduğu belirtilmektedir (Dodd *et al.* 2020). Bu hayvanların beslenmesinde kullanılan geleneksel kuru ve yaş (konserve, poşet, rulo) mamalar gelişmiş ülkelerde köpek ve kedilerin çoğuna yedirilmiştir ve birçok kişi tarafından köpek ve kedi beslemenin temel yöntemi olarak kabul edilmektedir (Laflamme *et al.* 2008). Bu ürünler kolay ve kullanışlı olacak şekilde tasarlanmıştır ve evcil hayvanların ömrünün kısmen beslenme hedeflerinin geliştirilmesine, eksiksiz ve dengeli ticari ürünlerin sağlanmasına atfedilebileceği öne sürülmüştür (Bontempo 2005).

Küresel olarak toplamda 115 milyar dolarlık evcil hayvan bakım işinin yaklaşık %70'ini evcil hayvan gıda endüstrisinin oluşturduğu belirtilmektedir. Bu pazar içerisinde geleneksel evcil hayvan gıdaları yanında alternatif veya geleneksel olmayan diyetler yani ev yapımı (HM) ve BARF'lara olan ilginin gün geçtikçe arttığı bildirilmektedir (Morgan *et al.* 2017).

Köpekler ve kedilerin evdeki rolleri değişime uğrayarak aile üyesine dönüştükçe, evcil hayvanların beslenmesindeki eğilimler de insan beslenmesi gibi değişikliğe uğramıştır. Mevcut eğilimler arasında doğal, tahılsız HM ve BARF yer almaktadır. Bununla birlikte evcil hayvan maması endüstrisine olan güvenin gün geçtikçe azaldığı ancak veteriner hekimlerin tavsiyelerinin hala güvenilir kabul edildiği bildirilmektedir (Morelli *et al.* 2019).

BARF'lar ticari veya HM olarak hazırlanan, çiftlik hayvanlarından veya vahşi hayvanlardan elde edilen pişmemiş malzemeleri içermektedir. Bu malzemeler taze,

dondurulmuş veya dondurularak kurutulmuş (liyofilize edilmiş) tam diyetler veya çiğ etle tamamlanması amaçlanan ön karışımlar olarak sağlanmaktadır (Wales *et al.* 2019).

2.2 BARF'ın Besin İçeriği

Kedi ve köpekler karnivor olarak sınıflandırılmalarına rağmen, BARF ile beslemenin bu canlılar üzerindeki besinsel etkileri konusunda bilgi eksikliği bulunmaktadır. BARF'ların kuru mamalara kıyasla daha yüksek miktarda makro besin sindirilebilirliğine sahip olduğu ve böylece mamada bulunan makro ve mikro besinlerin biyoyararlanımının arttığı bildirilmektedir (Bermingham *et al.* 2017, Butowski *et al.* 2019).

Evde yapılan ve ticari olarak üretilen BARF'larla ilgili olarak ABD'de yapılan bir çalışmada test edilen HM (n=3) ve ticari BARF'ların (n=2) bazılarının hayvanların sağlığı üzerinde önemli olumsuz etkileri olabilecek çoklu beslenme dengesizliklerine sahip olduğunu ortaya çıkarılmıştır. Örnekler arasında 0,20'lik bir kalsiyum-fosfor oranı; saptanabilir minimum değerin altında A ve E vitamini konsantrasyonları; Amerikan Yem Kontrol Yetkilileri Derneği'nin belirlediği maksimum değerin neredeyse iki katı D vitamini konsantrasyonu tespit edilmiştir. Büyüme çağındaki bir köpeğin diyetindeki böyle bir dengesizliğin D vitaminine bağlı Tip I raşitizm ve beslenmeyle ilgili sekonder hiperparatiroidizme neden olabileceği bildirilmektedir (Freeman *et al.* 2013).

Avrupa'da yapılan bir çalışmada ise köpeklere verilen HM ve ticari BARF'ta kalsiyum, fosfor ve A vitamini miktarı gibi 12 farklı besin maddesinin miktarları hesaplanmıştır. Sonuçta 57 (%60) örnekte önemli beslenme dengesizlikleri tespit edilmiştir. Bu nedenle, hem ticari hem de ev yapımı BARF'ların önemli besin eksiklikleri ve fazlalıkları olabileceği endişesi bulunmaktadır. Ayrıca bu diyetler minimum besin miktarlarını karşılasa ve maksimum miktarları geçmese bile optimal bir besin profili sağlamayabileceği bildirilmektedir. Geleneksel kuru veya yaş mamalara göre BARF'ların yağ oranı daha yüksektir. Sahipler tarafından algılandığı şekliyle tüy parlaklığını artırabilen bir etken olmakla birlikte yüksek yağ içeriği bazı hayvanlarda hafiften şiddetliye kadar değişen şiddette gastrointestinal sorunlara neden olabilmekte veya obezite riskini artırabilmektedir (Dillitzer *et al.* 2011).

2.3 BARF'ın Fizyolojik Etkileri

Özellikle 2000'li yılların başından itibaren yapılan uzman olmayan yayınlarla evcil köpek ve kediler için daha "doğal" bir beslenme şekli olarak çiğ beslenmeye ivme kazandırıldığı belirtilmektedir (Overgaauw *et al.* 2020). Geleneksel işlenmiş diyetlerle karşılaştırıldığında bu tip beslenmenin gelişmiş diş ve cilt sağlığı, ana vücut sistemlerinden herhangi birini etkileyen bozuklukların önlenmesi veya kontrolü ve davranışsal iyileştirmeleri içeren geniş kapsamlı faydaları kapsadığı iddia edilmektedir (Wales *et al.* 2019).

Başlangıçta köpek ardından da kedilerde başlayan bu eğilimde köpeğin atası olan kurda referans verildiği görülmektedir. Bununla birlikte, evcil köpeklerin sahip olduğu farklı gen ifade kalıpları nedeniyle nişasta sindirme kapasitesinin vahşi atalarından yüksek olduğu gösterilmiştir (Freeman and Michel 2001). Bunun yanında evcil köpekgillerin hem yaşam süreleri hem de enerji ve diğer besin ihtiyaçları yabanilerden farklıdır (Kölle and Schmidt 2015). Öte yandan kurtlar da dahil olmak üzere, hayvanat bahçesindeki köpekgillerin beslenmesinde uygulanan çağdaş yöntemler geleneksel işlenmiş köpek mamasının kullanılmasının çoğunlukla daha yararlı olduğunu vurgulamaktadır (Davies *et al.* 2019).

Çiğ beslemeyle ilgili bazı iddialar için doğrulanabilir bir kanıt temeli sağlamak amacıyla az sayıda çalışma yapılmıştır. Bir metagenomik çalışmada, dışkı bakteri çeşitliliğinin, çiğ beslenen köpeklerde (n=6) geleneksel olarak işlenmiş gıdalarla beslenen köpeklere (n=5) göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Kim *et al.* 2017). Boxer ırkı köpeklere verilen gıda takviyesi eklenmiş yüksek kaliteli çiğ sığır eti ile ticari kuru diyetinin karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada ise daha küçük, dışkı oluşumu yanında dışkı bakteri topluluğunda anlamlı olmayan değişiklikler bildirilmiştir (Sandri *et al.* 2016).

Kedilerde yapılan benzer bir çalışmada da BARF'ın dışkı miktarını azaltıp kıvamını geliştirdiği tespit edilmiştir (Butowski *et al.* 2019).

Ticari bir BARF, takviye edilmiş bir çiğ tavuk ve konserve bir diyetin karşılaştırıldığı aynı ebeveynin ardışık yavrularının kullanıldığı bir çalışmada, yavru kedilerin diyet gruplarının hepsinde benzer şekilde büyüdüğü ancak konserve grup dışındakilerde ishal ile karşılaşıldığı bildirilmiştir (Hamper *et al.* 2017).

Çiğ kemik içeren diyetlerin ağız sağlığını iyileştirdiğine dair iddialar, vahşi kedi veya köpeklerde daha az diş taşı olduğunu gösteren çalışmalarla desteklenmektedir. Fakat sınırlı sayıda yayınlanmış kanıt, çiğ beslenmeyle periodontal hastalığın azaldığı iddialarını desteklememektedir (Janssens *et al.* 2016, McKenzie 2019).

Yakın zamanda yapılan kör bir çalışmada, BARF'la beslenen köpeklerin, yüksek kaliteli kuru mamayla beslenen köpeklere kıyasla daha iyi bir bileşik klinik sağlık puanına sahip olduğu gösterilmiştir (Hiney *et al.* 2021). Yazarlar ayrıca çiğ etle beslenen köpeklerde lenfosit sayısının arttığını, ancak inflamatuvar veya antiinnflamatuvar fonksiyonlar arasında ayrım yapamadıklarını kaydetmiştir. Bununla birlikte, bir başka çalışmada, yüksek kaliteli kuru mamayla beslenen köpeklerin gen ifadesinde, çiğ etle beslenen köpeklere kıyasla proinflamatuar bir tepki olduğunu düşündüren değişiklikler tespit edilmiştir (Anderson *et al.* 2018).

Bu nedenle, Dünya Küçük Hayvan Veteriner Derneği tarafından yapılan değerlendirmede daha iyi sindirilebilirlik ve dışkı kalitesi için bazı makul iddiaların yanı sıra, çiğ yem için yapılan çeşitli sağlık için faydalı olduğu iddiaları ilgili verilerle desteklenmeyen birer anekdot ve görüş karışımı olarak kaldığı bildirilmektedir (Anonim 2015).

2.4 BARF'ta Sağlık Riskine Neden Olan Bakteriyel Patojenler

Gıda güvenliği açısından, et içeren pet hayvan diyetleri çiğ diyetler, işlenmiş ısıl işlem görmüş yaş yiyecekler, işlenmiş ısıl işlem görmüş kuru yiyecekler ve pişmemiş veya minimum düzeyde işlenmiş kuru gıda ve ikramlar olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır. Nem içeriği açısından ise pet hayvan mamaları kuru (%11'den az), yarı kuru (%25-35) veya yaş (%60-87) olarak sınıflandırılmaktadır (Zicker 2008, Parr and Remillard 2014).

Diğer gruplardan farklı olarak BARF'larda et, patojen yüklerini azaltmayı amaçlayan herhangi bir ısıtmaya veya başka bir işleme tabi tutulmamaktadır. Genellikle kutularda veya poşetlerde satılan işlenmiş ıslak gıdalarda, et ve diğer bileşenler ya hermetik olarak kapatılmış bir kaba yerleştirilmekte ve daha sonra ticari sterilizasyonu sağlamak için termal olarak işlenmekte veya ticari sterilizasyonu sağlamak için ısıtılmakta ve ardından önceden sterilize edilmiş paketlerde aseptik olarak paketlenmektedir. Paket açıldıktan sonra gıda, uygun şekilde soğutulmazsa hızlı bir bakteriyel çoğalmayı destekleyebilmektedir (Dzanis 2009). Genellikle kuru mama şeklinde torbalarda satılan işlenmiş kuru gıda, olası patojenleri azaltmayı amaçlayan bir pişirme aşamasından geçen, kurutulan ve daha sonra yeniden hidrasyonu önlemek için kapalı kaplarda paketlenen bileşenler içermektedir. Bu nedenle düşük nem oranı depolama sırasındaki bakteriyel çoğalmayı engellemektedir. Ancak ürün ticari olarak steril değildir ve düşük seviyelerde de olsa çeşitli mikroorganizmaları içerebilmektedir. İşlenmiş kuru ödül mamaları da bir ısıtma aşamasından geçirilmekte ve genellikle ara sıra kullanım için küçük porsiyonlarda satılmaktadır. *Salmonella* gibi patojenlerin kuru koşullarda bu matriks üzerinde gelişme olasılığı düşük olsa da, nemin artması ile büyüyebileceği belirtilmektedir. Bu dört gıda kategorisi çok farklı risk profilleri sunmakta ve hiçbiri risksiz olarak değerlendirilmemektedir (Lambertini *et al.* 2016).

BARF'lar potansiyel olarak pişmiş mamalara göre daha sık oranda patojen barındırabilmektedir. BARF'la beslenen evcil hayvan ve zoonoz karekterinden ötürü insan sağlığı açısından risk oluşturan *Salmonella spp.*, çiğ ette yaygın olarak bulunabilen bir patojendir (Mehlenbacher *et al.* 2012, Runesvard *et al.* 2020). Yapılan bir çalışmada piyasadan toplanan BARF örneklerinin %64'ünde *E. coli* ve %20'sinde *Salmonella* tespit edilmiştir (Weese *et al.* 2005). Çiğ mamalarla yapılan diğer çalışmalarda da *Salmonella* kırmızı ette %44,6; tavuk etinde %80; çeşitli ticari BARF'larda ise %21 oranında belirlenmiştir (Chengappa *et al.* 1993, Finley *et al.* 2008, Schlesinger and Joffe 2011).

Jenerik ve patojenik *E. coli, Listeria, Campylobacter* gibi diğer mikroorganizmalar da çiğ ürünlerde sık sık gözlenen bakteriyel patojenlerdir (Runesvard *et al.* 2020). Hayvanat bahçesindeki hayvanların beslenmesi için kullanılan etlerde ve daha az sıklıkta da kuru gıdalarda patojen kontaminasyonu gözlemlenmiştir (Berghofer *et al.* 2003). Bazı

patojenlerin belirli et hayvanları ve bunların kullanıldığı üretim süreçleriyle ilişkili olma olasılığının daha yüksek olabileceği bildirilmektedir. Buna en iyi örnek *Campylobacter* ve *Salmonella*'nın kırmızı etlere göre kümes hayvanlarında daha yüksek prevalansa sahip olmasıdır (Doyla *et al.* 2020).

BARF'la beslenen ev köpekleri, yarış köpekleri ve terapi köpeklerinde enfeksiyon ve hastalık prevalansının daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Lefebvre *et al.* 2008, McKenzie *et al.* 2010, Schlesinger and Joffe 2011). Bugüne kadar hiçbir insan hastalığı çiğ evcil hayvan mamasıyla ilişkilendirilmemiştir. Bu nedenle, çiğ ve ev yapımı diyetlerin evcil hayvanlara ve sahiplerine yönelik gerçek riskleri hala tartışılmaktadır (Parr and Remillard 2014, Sévellec *et al.* 2020).

2.5 Üretime Bağlı Kontaminasyon

İşlenmiş köpek ve kedi mamaları genellikle et, tahıl, sebze, hayvansal ve bitkisel yağlar, vitamin, mineral gibi katkı maddeleri ve lezzeti artırmak için eklenen aromalardan oluşmaktadır. Kedi mamalarına genellikle balık ve deniz ürünleri de eklenebilmektedir. Kuru evcil hayvan mamalarının et kısmı ise genellikle et endüstrisinde rendering yoluyla elde edilen kuru granüler bir yan ürünüdür. Rendering, yağı et ve kemiklerden ayırmak için yüksek sıcaklıklar gerektirmesine rağmen, nihai yemek ürünü genellikle bakteriler tarafından kontamine olmaktadır. Ayrıca, insan tüketimine yönelik olarak üretilen domuz eti ve kümes hayvanı ürünlerinin perakende olarak veya daha sık olarak mezbahada *Salmonella, Campylobacter* ve patojenik *E. coli* gibi patojenik bakterilerle kontamine olduğu bulunmuştur. Kümes hayvanı ürünleri için gözlenen Salmonella prevalansı %0 ile %100 arasında değişmektedir (Lambertini *et al.* 2016). Ne karkaslar ne de perakende et, evcil hayvan yemi üretim zincirinin doğrudan girdileri değildir. Bununla birlikte, evcil hayvan gıda bileşenleri olarak kullanılan hayvansal yan ürünler genellikle daha düşük kalitededir ve insan tüketimine yönelik olanlardan daha az incelemeye tabi tutulur, bu nedenle kontaminasyon seviyeleri muhtemelen daha yüksektir. Ayrıca, tarihsel olarak et, bakteriyel kontaminasyon açısından en fazla risk altında olan bileşen olarak kabul edilirken, diğer bileşenler de enterik patojenleri barındırabilmektedir. Örneğin, *Salmonella* ve patojenik *E. coli* kontaminasyon prevalansı buğday ve unda düşük

seviyelerinde gözlemlenmiştir (Magallanes *et al.* 2021). Evcil hayvan yemi ve hayvan yemi üretimine yönelik yapılan kapsamlı bir araştırmada, 2002-2006 ve 2007-2009 yıllarında alınan numunelerde sırasıyla %30,9'unda (n=337) ve %19,4'ünde (n=206) *Salmonella* tespit edilmiştir (Li *et al.* 2012).

Sıvı yağlar ve yağlı tohumlardaki kontaminasyon hakkında çok az bilgi mevcuttur. Yayınlanan birkaç çalışma, genellikle düşük olan ancak %14'e kadar çıkabilen *Salmonella* yaygınlıklarını vurgulamaktadır. Ek olarak, yağlı küspe tesislerinde kontaminasyon gözlemlenmiş olup, bu da petrol ürünleri için çapraz kontaminasyon riskine işaret etmektedir (Morelli *et al.* 2019).

Ticari olarak üretilen BARF'ların nispeten düşük geri çağırma oranı, tüketicilerin veya veterinerler hekimlerin hastalıkları potansiyel kontaminasyonla ilişkilendirmemesi, üreticiler tarafından titiz kalite kontrol testlerinin yapılmaması veya genel evcil hayvan popülasyonunda bu besleme rejiminin yaygınlığının düşük olması ve ticari BARF'ların pazar payının sınırlı olmasının tespit edilen kontaminasyon vakalarının oranının daha düşük olmasına neden olabileceği değerlendirilmektedir (Freeman *et al.* 2013).

Ticari BARF'lar ve içerik maddeleri kontaminasyon veya başka sorunlar tespit edilirse geri çağrılabilmesine rağmen köpek ve kedilerde gıda kaynaklı hastalıklar nadiren izlendiği için kontaminasyon insan hastalığı ile ilişkili olmadıkça tespit edilemeyebilir. Geri çağırma sayısına ilişkin bilgi mevcut olsa da, ticari ve evde hazırlanmış BARF'ların kontaminasyonu nedeniyle geri çağırmalara ilişkin verilerin olmaması, bu tür diyetlerin güvenli olduğu anlamına gelmemektedir (Freeman *et al.* 2013).

BARF kullanımıyla ilgili gerçek riskleri değerlendirmek için, risk altındaki herkes yani mamayı yiyen köpek veya kedi, diğer evdeki veya bir kulübedeki, kedihanedeki veya klinikteki hayvanlar ve bu hayvanlara, BARF'a ve hayvanların dışkısına maruz kalan insanlarla ilgili bilgi gerekmektedir. Köpek ve kedilerin gastrointestinal yolları insanlara kıyasla daha kısa olmasına rağmen daha kısa gastrointestinal sistemin Salmonella spp veya diğer patojenlerle enfeksiyonu önlediğine dair bir kanıt bulunmamaktadır (Mouhanna and Csivincsik 2020). İnsanlar ve köpekler arasında mide ve bağırsak pH'sı

açısından önemli bir fark bulunmamaktadır (Dressman 1986). Köpeklerin ve kedilerin *Salmonella* organizmalarını taşıyabilecekleri açıktır. Köpek ve kedilerde salmonellozun oluşabileceğini belgeleyen pek çok çalışma mevcuttur. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda bulunan kontaminasyon prevalansı, BARF'ların kontaminasyon oranlarının, geri çağırma sayısına göre gösterilenden çok daha yüksek olduğunu göstermektedir (Morley *et al.* 2006, Selmi *et al.* 2011).

Bazı BARF üreticileri, ticari BARF'larda patojen riskini azaltmak amacıyla yüksek hidrostatik basınçlı işleme (yüksek basınçlı pastörizasyon) kullanmaktadır. Bu süreç birçok patojenin sayısını azaltabilse de, genellikle onları tamamen ortadan kaldırmadığı gibi bakteri ve virüslerin bu sürece duyarlılıkları farklılık göstermektedir Ayrıca, bakteri ve virüsler tarafından yüksek basınca karşı direnç gelişmesi potansiyeli de bulunmaktadır (Rendueles *et al.* 2011, Pitino *et al.* 2022). Bu nedenle, ticari BARF'larda patojenlerden kaynaklanan riski azaltmak için bu işleme yönteminin etkinliği hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2.6 Diğer Koşullara Bağlı Kontaminasyon

Malzemelerin taşınması ve alınması sırasında çapraz kontaminasyon meydana gelebilmektedir. Bir araştırmada hayvan yemi taşıyan kamyonların *Salmonella* ile kontamine olduğu bulunmuştur (Jones 2011). Paylaşılan bir alım alanında, yüksek riskli bir içerik maddesi, düşük riskli bir malzemeyi çapraz kontamine edebilmektedir. Kuru evcil hayvan mamalarında olduğu gibi, tüm içerik maddeleri aynı patojen azaltma adımlarından geçmiyorsa, bu durum özellikle endişe verici olmaktadır. Üretim tesisinde, kontamine içerik veya bitmemiş ürün partisinde bulunan patojenler, örneğin ekipman yüzeyleri, konteynırlar veya konveyör boruları yoluyla diğer ürün partilerine yayıldığında da çapraz kontaminasyon meydana gelebilmektedir. Kuru gıdalar da dahil olmak üzere birçok gıda mihrakına üretim sırasındaki çapraz kontaminasyonun neden olduğu düşünülmektedir (Bottari *et al.* 2020).

Toz da hayvan yemi fabrikalarında ve diğer gıda üretim tesislerinde *Salmonella* çapraz kontaminasyonu için büyük bir tehlike olarak kabul edilmektedir. Ürünle doğrudan temas

halinde olmasa da zeminlerde biriken toz, ürün parçacıkları ve birikintiler, hava akımı, işçiler ve haşereler tarafından hassas tesis konumlarına kolayca taşınabilmektedir (Carrasco *et al.* 2012). Evcil hayvan yemi üretim tesislerinde yüzeylerde ve ekipmanlarda patojen kontaminasyonu hakkında çok az bilgi mevcuttur. Evcil hayvan yemi tesislerinden çok farklı koşullarda, et ve diğer hayvan ürünlerini işleyen tesislerde yüzeylerde ve tozda patojenler tespit edilmiş olup, temassız yüzeylerin çapraz kontaminasyonda veya rezervuar olarak potansiyel rolü vurgulanmaktadır. Fabrikalardaki çapraz kontaminasyon süreçlerine ilişkin nicel risk modelleri ancak son zamanlarda geliştirilmeye başlanmıştır (Collineau et el. 2020).

2.7 İnsan Sağlığına Yönelik Riskler

Çiğ etler sıklıkla mikroorganizmalarla kontamine olmaktadır. En yaygın görülen bakterilerin *E coli, Salmonella spp., Clostridium spp., Campylobacter spp., Listeria spp.* ve *Yersinia enterocolitica* olduğu bildirilmektedir (Fredriksson-Ahomaa *et al.* 2001, Songer *et al.* 2009, Nemser *et al.* 2014, Nilsson 2015, Reimschuessel *et al.* 2017). Ayrıca çiğ etler sıklıkla insanları veya evcil hayvanları enfekte edebilen *Toxoplasma gondii* gibi parazitleri ve daha az sıklıkla da diğer birçok paraziti taşımaktadır (Dhama *et al.* 2013, Belluco *et al.* 2016). Bu patojenlerin evcil hayvanlar için oluşturduğu sağlık risklerine ek olarak, evcil hayvanlar tarafından etrafa saçılmasının neden olduğu çevre kirliliği insanlarda enfeksiyon için bir önemli risk faktörü olarak değerlendirilmektedir.

İnsan hastalığı için potansiyel risk açıkça belgelenmiş olmakla birlikte, evcil köpeklere ve kedilerin BARF'la beslenmesiyle ilişkili gerçek risk ve hastalık prevalansını ölçmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir (Freeman *et al.* 2013).

2.7.1 *Salmonella spp.*

Salmonella, *Enterobacteriaceae* familyasına ait bir Gram negatif basil cinsidir ve White-Kauffmann şemasına uyan *Salmonella bongori* ve *S. enterica* olmak üzere iki türden oluşmaktadır. Bu sınıflandırma, bakteriyel lipopolisakkarit (LPS), flagella ve kapsüler

polisakkarit üzerinde ifade edilen üç yüzey yapısı grubuna göredir (Popoff *et al.* 2004). *S. enterica* türü, yaklaşık 2.659 serovar ile *enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae* ve *indica* olmak üzere 6 alt türden oluşmaktadır. Bunlardan *enterica* alt türü yaklaşık 1.547 serovardan sorumludur ve bunların %99'u hayvanlarda ve insanlarda enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Issenhuth-Jeanjean *et al.* 2014).

Salmonella spp. gıda kaynaklı en önemli patojenler arasındadır ve dünya çapında ishalli hastalıklar arasında insan ölümlerinin üçüncü önde gelen nedenidir. Hayvanlar, bu patojenin birincil kaynağıdır ve hayvansal kökenli gıdalar insanlara ana bulaşma yoludur. Hayvansal kökenli gıdalar içinde en yaygın nedeninin kontamine kümes hayvanı ürünleri olduğu belirtilmektedir. Sadece ABD'de yılda 1,3 milyon insanın Salmonellozdan etkilendiği tahmin edilmektedir (Ferrari *et al.* 2019). *Salmonella* bakterileri sıklıkla hastalığa neden olmadan bağırsak mikroflorasının geçici bir üyesi olarak yaşayabilmekte; bu nedenle, bir insan veya evcil hayvan taşıyıcı olabilmektedir. Enfekte veya taşıyıcı hayvanlarla veya bunların dışkılarıyla doğrudan temas, insanlarda salmonelloz için bir risk faktörü olarak tanımlanmaktadır (Ferrari *et al.* 2019). BARF yiyen köpeklerin dışkıları aracılığıyla *Salmonella spp.* yayma riski taşıdığını belirten çalışmalar mevcuttur (Finley *et al.* 2007, Drozdz *et al.* 2021). Bu çalışmaların sonuçlarında aralıklı olarak veya birincil diyet olarak BARF'la beslenen köpeklerin %3 ila %50'sinin dışkıları aracılığıyla *Salmonella* organizmalarını saçtığı belirlenmiştir. Oranlar arasındaki büyük farkın diyetlerin evde hazırlanmış veya ticari olması ve diyetlerin kontaminasyon prevalansı ile ilgili olabileceği değerlendirilmektedir. Başka bir çalışmada kontamine ticari bir BARF'ın tek bir öğünüyle beslenmesi sonucunda, 16 köpekten 7'sinin dışkılarında 7 güne kadar *Salmonella spp.* saçtığı belirlenmiştir (Finley *et al.* 2007).

2.7.2 *Escherichia coli*

Enterobacteriaceae ailesinin ana yaşam alanı memeli bağırsak sistemidir (Wong and Moran 2016). Bu grup çoğunlukla konaklarıyla simbiyotik bir ilişki içerisindedir. Örnek olarak, sığırlarda görülen diyare yapıcı *E. coli* asymptotik olarak var olmasıyla ilişkilidir. Bu durum, et üretimi sırasında biftekte patojenik *E. coli*'nin varlığıyla ilişkilendirilmiştir (Santos *et al.* 2018). *E. coli*, altı patojenik gruptan oluşmaktadır ve bunlardan bazıları son

yıllarda birçok önemli halk sağlığı vakası ve gıda salgınıyla ilişkilendirilmiştir (Patzi-Vargas *et al.* 2015).

Survey verileri, *E. coli*'de antibiyotik direncinin sürekli olarak insan ve veteriner tıbbında en uzun süredir kullanılan antimikrobiyal ajanlar için en yüksek olduğunu göstermektedir (Tandesse *et al.* 2012). Son 20 yılda sıklıkla çoklu ilaca dirençli (MDR) bakterilerin ortaya çıkması ve yayılmasında, floroakinolonlar ve belirli sefalosporinler gibi yeni bileşiklere karşı direncin artmasında büyük artışlar gözlenmiştir (Mangla *et al.* 2022). Örneğin, bir çalışmada, 12 yıllık bir dönem boyunca (1971-1982) hastanelerden elde edilen *E. coli* izolatlarının duyarlılığı incelenmiş ve test edilen antimikrobiyal ilaçlara karşı direncin herhangi bir önemli değişiklik göstermediği görülmüştür (Atkinson and Lorian 1984). Buna karşılık, 1997-2007 yılları arasında hastalardan alınan idrar örneklerinden elde edilen *E. coli*'nin retrospektif bir analizi, sefalosporinlere karşı artan direnç eğilimi, siprofloksasin, trimetoprim/sulfametoksazol ve amoksisilin/klavulanik asit için bir artışı göstermiştir (Blaetter *et al.* 2009). Benzer şekilde, İsveç'teki 30 yıllık bir (1979-2009) takip çalışması, ampisilin, sülfonamid, trimetoprim ve gentamisine karşı artan bir direnç eğilimi göstermiştir (Kronwall 2010). Çiftliklerde yapılan çalışmalar, çoklu ilaç direncinin kronik antimikrobiyal ilaç maruziyeti ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

ABD'de periyodik olarak değişen antibiyotik direncinin izlenmesinde kullanılan sistemden elde edilen verilere göre bazı antibiyotiklere karşı direnç azalırken bazılarına karşı artış olduğu görülmüştür (Tandesse *et al.* 2012).

Yapılan bir çalışmada bir yıllık bir süre boyunca BARF'la beslenen köpekler üzerinde yapılan bir çalışmada, dışkıda genişletilmiş spektrumlu sefalosporinaz *E. coli*'nin yaygınlık oranının %45'e kadar çıktığı gösterilmiştir (Lefebvre *et al.* 2008).

2.7.3. *Staphylococcus aureus*

S. aureus, insanlar ve diğer hayvan konakçılar arasında bir kolonizatör ve enfeksiyöz bir ajan olarak geniş çapta yaygındır. Türler, çok lokuslu sekans bağlama yoluyla birkaç klonal komplekse bölünebilmektedir. Bazı klonal kompleksler esas olarak belirli konakçı türlerle ilişkilendirilirken, diğerlerinin konakçı özgünlüğü azdır (Cuny *et al.* 2010). İnsan ve hayvana adapte olmuş alt popülasyonlar, çeşitli genetik adaptasyonlara göre farklılık göstermektedir (Fitzgerald 2012). Örneğin, immün kaçınma gen kümesi (IEC) genellikle insana uyarlanmış *S. aureus*'ta bulunurken hayvanlara adapte olmuş alt popülasyonlarda genel olarak yoktur (Sung *et al.* 2008). Bu nedenle, insan ve hayvana adapte olmuş bakteri suşlarının ayrımı için özel belirteçler bulunmaktadır (Resch *et al.* 2013). Fakat Almanya'da yapılan bir araştırmada, domuz eti son ürünlerinin %2,8'inin insana özel bir metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) ile kontaminasyonu bildirilmiştir. Aynı etken hindi eti numunelerinin %32'sinde de tespit edilmiştir (Vossenkuhl *et al.* 2014). Bir başka çalışmada ise etlik piliç karkaslarının %33'ünün eritme sıvısında tespit edilmiştir (Cuny *et al.* 2013).

2.7.4 *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii, fırsatçı nosokomiyal bir patojen olup dünya genelinde hastanelerdeki en önemli çoklu ilaca dirençli mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. Bu insan patojeni çeşitli enfeksiyonlardan sorumludur, bunlar arasında ventilatör ilişkili pnömoni ve kan dolaşımı enfeksiyonları en yaygın olanlardır ve ölüm oranları %35'e kadar çıkabilmektedir. Bunlar yanında toplum kaynaklı enfeksiyonlar da bildirilmiştir. Ancak hastane dışındaki çevresel kaynaklardan ve enfeksiyon rezervuarlarından sadece birkaç suş tespit edilmiştir. *A. baumannii* enfeksiyonlarının çoğu, dünya çapında dağılan iki ana popülasyon klonu tarafından oluşturulmaktadır. Enfeksiyon salgınları genellikle çoklu ilaç direnciyle ilişkilidir ve mevcut tüm antibiyotiklere dirençli suşların ortaya çıkması gibi durumlar da görülmüştür. Bununla birlikte, *A. baumannii*'nin virülens özellikleri ve patojenik potansiyeli çoğunlukla belirsiz kalmıştır. *A. baumannii* sekanslanmış genomlarının son dönemde genişlemesi, büyük ölçekli filogenomik ve fenotipik analizlerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Böylece *A. baumannii*'nin insan

patojeni olarak evrimi ve adaptasyonu konusunda değerli bilgiler sunulmaktadır (Antunes *et al.* 2014).

2.8 Bağırsak Mikrobiyotası

BARF yapımında, ürün olarak satılması mümkün olmayan dokular ana bileşen olarak kullanılmaktadır. Bu dokular içinde yer alan bağırsaklar bağırsak mikrobiyotası olarak atıfta bulunulan karmaşık ve çeşitli mikroorganizma topluluklarını barındırmaktadır. Bu mikroplar, konakçılarıyla birlikte evrimleşen ve konakçının sağlığını ve refahını etkileyebilen doğal simbiyontlar olarak tanımlanmaktadır. Mikrobiyota bakterilerinin vitamin sentezleyebildikleri, bedeni patojenik organizmalara karşı koruyabildikleri, bağırsak epitel hücreleri için enerji substratları sağlayabildikleri ve bağırsak metabolizması ile bağışıklık homeostazına katkıda bulunarak konakçı beslenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Hou *et al.* 2022).

Bağırsak bakterilerinin çoğunluğunun anaerobik olması, standart mikrobiyoloji yöntemleri kullanılarak izolasyon ve karakterizasyonlarını zorlaştırmaktadır. Bunun yanında pek çok bakterinin kültürlenmesi de yapılamamıştır. Bunların kültürlenmesi için birden çok kültür koşulunu kullanan yüksek ölçekli yetiştirme ortamlarının sağlanması gerekmektedir (Lagier *et al.* 2018, Diakite *et al.* 2020).

Kesimhanelerde bakteriyel kontaminasyon ekipman üzerinde birikebilmekte ve yüzeydeki çapraz kontaminasyon, çalışanlar ve hava aracılığıyla tüm tesis genelinde yayılabilmektedir. Bu nedenle, son ürünün mikroflorasının sürecin farklı adımlarından nasıl etkilendiğini ve üretim sırasında antimikrobiyal müdahalelerin nerede uygulanmasının en ihtiyatlı olduğunu anlamak hayati önem taşımaktadır. İlk mikrobiyal yükün önemli bir kısmı kesim noktasından itibaren oluşturulmaktadır. Ekipman ve yüzeylerin sıklıkla ve yeterince temizlenmesinin zor olduğu görülmektedir. Bu nedenle ekipman, et üretim sürecinin başından itibaren mikropların karkasa girmesi için tutarlı bir rezervuar görevi görmektedir (Shao *et al.* 2021). Yapılan çalışmalarda 21'den fazla filum ve 280 cinsin piliç etini kolonileştirdiği bulunmuştur (Kim *et al.* 2017).

2.9 Antibiyotik Direnci

Antimikrobiyal direnç yeni bir olgu değildir. Ancak dirençli organizmaların sayısı, ilaca direnç gösterilen coğrafi bölgeler ve tek bir organizmanın geniş kapsamlı direnci eşi görülmemiş düzeylere ulaşmaktadır. Antibiyotiklerle kontrol altına alındığı düşünülen hastalıklar ve hastalık etkenleri, bu tedavilere dirençli yeni türlerle geri dönmektedir (Zaman *et al.* 2017).

İlaç dirençli suşlar ilk olarak hastanelerde ortaya çıkmıştır. Çünkü antibiyotiklerin çoğu burada kullanılmaktadır (Lee *et al.* 2013). Sulfonamid dirençli *Streptoccoccus pyogenes*, 1930'larda askeri hastanelerde ortaya çıkmıştır (Levy 1982). Penisilin dirençli *S. aureus*, penisilinin 1940'larda tanıtılmasından çok kısa bir süre sonra Londra sivil hastanelerinde tespit edilmiştir (Barber and Rozwadowska-Dowzenko 1948). Benzer şekilde, streptomisine dirençli *Mycobacterium tuberculosis*, bu antibiyotiğin keşfinden kısa bir süre sonra ortaya çıkmıştır (Crofton and Mitchison 1948).

Çoklu ilaca direnç ilk kez bağırsak bakterileri olan *E. coli*, *Shigella* ve *Salmonella*'da 1950'lerin sonlarından 1960'ların başlarına kadar tespit edilmiştir (Rashmi *et al.* 2005). Bu tür suşlar özellikle gelişmekte olan ülkelerde ciddi klinik sorunlar ve can kayıplarına neden olmuştur. Bununla birlikte, direnç sorunu bazı kişiler tarafından, özellikle sanayileşmiş ülkelerdekiler tarafından, uzak ülkelerdeki bağırsak organizmalarıyla sınırlı sağlık sorunu olmayan bir merak olarak algılanmıştır. Bu tutum 1970'lere gelindiğinde değişmiştir. Solunum yolu hastalıklarına neden olan ampisilin, kloramfenikol ve tetrasikline dirençli *Haemophilus influenzae* ve ürogenital sistem hastalıklarına neden olan ampisiline dirençli *Neisseria gonorrhoeae* ortaya çıkmıştır (De Graaff *et al.* 1976, Elwell *et al.* 1977). Artan antimikrobiyal kullanımıyla birlikte direnç sıklığı, özellikle reçetesiz olarak kolayca temin edilebilen antimikrobiyallerin bulunduğu gelişmekte olan ülkelerde birçok farklı bakteride artmıştır. Kötü sanitasyon koşulları yayılımı kolaylaştırmış ve sınırlı sağlık bütçeleri, yeni ve etkili, ancak daha pahalı olan antibiyotiklere erişimi engellemiştir. 1980'lerden bu yana, MDR olan verem yeniden ortaya çıkmış ve insan bağışıklık yetmezliği virüsü enfeksiyonu ile birlikte artmıştır

(Bloom and Murray 1992). MDR suşların ciddiyeti ve tedavisinin zorluğu, bazen altı ila yedi farklı ilacın kombine olarak kullanılmasını gerektirmektedir (Iseman 1993).

MDR bakteriler tedaviyi daha riskli ve maliyetli hale getirmekte ve bazen tedavinin başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olmaktadır. Özellikle gelişmekte olan dünyada, tüm mevcut ilaçlar başarısız olduğunda bireyler MDR enfeksiyonlarına yenik düşebilmektedir. Önemli küresel örnekler arasında *Mycobacterium tuberculosis, Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus, Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın hastane ve toplumdaki MDR suşları yer almaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde, *Salmonella enteritidis, Shigella flexneri* ve *Vibrio cholerae* gibi MDR bağırsak hastalığı etkenleri, halk sağlığı önlemlerini tehdit etmektedir (Walsh and Amyes 2004, Alkatheri *et al.* 2023).

Genel olarak, ABD ve Birleşik Krallık'ta, hastane kökenli *S. aureus* suşlarının %40-60'ı MRSA ve genellikle MDR özellik göstermektedir (Magid *et al.* 2021). MRSA ile ilişkili ölümlerin, metisiline duyarlı suşlardan daha fazla olduğu belirtilmektedir. Giderek artan bir şekilde, MRSA artık vankomisine de direnç göstermekte ve tedavi başarısızlığına yol açmaktadır. Bu suşlar direnç özelliğini vankomisine dirençli enterokoklardan kazanmışlardır. Özellikle *E. faecium*'un MDR suşları, ABD ve diğer yerlerdeki hastanelerde bağışıklık sistemi zayıflamış bireyleri tedavi eden klinisyenlerin başını birkaç on yıldır ağrıtmaktadır. Daha yeni olan daptomisin, linezolid ve streptogramin kombinasyonu dalfopristin/quinopristin, vankomisine dirençli enterokoklara, MRSA'ya ve vankomisine dirençli *S. aureus*'a karşı kullanılmaktadır, ancak bazı suşların bu iki ajana da dirençli olduğu ortaya çıkmıştır (Gajdacs 2019).

Toplum, MDR organizmalarla benzer şekilde yüklü hale gelmiştir. İdrar yolu enfeksiyonunun yaygın bir nedeni olan *E. coli*'nin bazı suşları, görece yeni fluorokinolonlar da dahil olmak üzere altı ilaç grubuna direnç göstermektedir. Güneydoğu Asya ve Çin'in bazı bölgelerinde, *E. coli*'nin %60-70'i fluorokinolonlara dirençliyken ABD ve diğer sanayileşmiş ülkelerde bu oran %10'u geçmektedir. Hastane suşlarından farklı olan ve yeni bir virülens toksine (Panton-Valentine lökositin) sahip olan MRSA suşları, sanayileşmiş ülkelerin toplumlarında ortaya çıkmıştır. Toplum kaynaklı

MRSA olarak adlandırılan bu suşlar, β-laktam antibiyotiklere dirençlidir ve MRSA şüphesi durumunda doktorların alternatif tedavilere başlamasını gerektirmektedir. Birçok çocuğun, etkili bir tedavi başlatıldığında hastalık çok ilerlemiş olduğu için toplum kaynaklı MRSA enfeksiyonuna yenik düştüğü tespit edilmiştir (Romandini *et al.* 2021).

Direnç sorunu basit olarak iki ana bileşenli bir denklem olarak görülebilir: duyarlı organizmaları engelleyen ve dirençli olanları seçen antibiyotik veya antimikrobiyal ilaç ve antimikrobiyal ilaç tarafından seçilen mikroorganizmalardaki genetik direnç belirleyicisi. İlaç direnci ancak iki bileşenin bir ortamda veya konakta bir araya gelmesiyle ortaya çıkar ve klinik bir soruna yol açabilir. Seçilen direnç genleri ve konakçıları, sorunu büyütmek ve diğer konakçılara ve diğer coğrafi bölgelere yaymak için sürekli antimikrobiyal seçilim altında yayılır ve çoğalır. Hedefleri bakteri hücresinin temel fizyolojik veya metabolik işlevleriyle ilgili olan 15'ten fazla antibiyotik sınıfı bulunmaktadır. Başlıca antibiyotik grupları ve etki şekilleri Çizelge 2.1'de verilmiştir. Her yıl milyonlarca kilogram antimikrobiyal, dünya çapında insanların, hayvanların ve tarımın profilaksi ve tedavisinde kullanılmaktadır. Bu da duyarlı suşları öldürerek ve dirençli olanları seçerek direnç sorununu artırmaktadır (Mshana *et al.* 2021).

Çizelge 2.1 Antibiyotik grupları ve etki mekanizmaları

Antibiyotik Grubu	**Etki Mekanizması**
Penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, daptomisin, monobaktamlar, glikopeptidler	Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu
Tetrasiklinler, aminoglikozitler, oksazolidinonlar, streptograminler, ketolidler, makrolidler, linkozamidler	Protein sentezinin inhibisyonu
Florokinolonlar	DNA sentezinin inhibisyonu
Sülfonamidler, trimetoprim	Folik asit sentezinin yarışmalı inhibisyonu
Rifampin	RNA sentezinin inhibisyonu
Metronidazol	Diğer

İlaç direnci hareketlidir. Direnç özelliklerine sahip genler, bakteriyofajlar, plazmidler, çıplak DNA veya transpozonlar gibi hareketli genetik elementler aracılığıyla farklı taksonomik ve ekolojik gruplara ait bakteriler arasında aktarılabilmektedir. Bu genler genellikle tek bir antibiyotik ailesine veya tipine karşı yönlendirilir. Ancak her biri tek bir

ilaç direnç özelliği taşıyan çoklu genler aynı organizmada birikim yapabilmektedir. Antibiyotiklerin kendileri gibi, direnç mekanizmaları da çeşitlilik göstermektedir (Uddin *et al.* 2017).

Genellikle yüksek düzeyde dirence aracılık eden plazmidler ve transpozonlar olmadığında, bakterilerde düşük düzeyden yüksek düzey dirence doğru adım adım bir ilerleme gerçekleşmektedir. Bu da kromozomlarda ardışık mutasyonlar yoluyla olmaktadır. Bu süreç, *N. gonorrhoeae*'da penisilin ve tetrasiklin direncinin ilk ortaya çıkmasından sorumlu tutulmaktadır. Organizma daha sonra bu ilaçlara yüksek düzeyde dirence sahip genleri taşıyan transpozonları kazanmaktadır (Uddin *et al.* 2017). *E. coli* ve diğer *Enterobacteriaceae* suşları, hedef enzimlerdeki (topoizomerazlar) mutasyonlar ve ilaçları hücreden dışarı pompalayan membran proteinlerinin ekspresyonunda artış sonucunda fluorokinolonlara karşı direncini artırmıştır (Piddock 1999).

Vankomisine karşı orta düzeyde dirence sahip kromozomal mutantlar ilk olarak vankomisin kullanımına yanıt olarak ortaya çıkmıştır. Bunu enterokoklardan yüksek düzeyde dirence sahip transpozon kazananlar izlemiştir. Bir antimikrobiyale karşı minimum inhibitör konsantrasyonda küçük bir artış, hastanelerde ve toplumlarda klinik mikrobiyologları direnç sorunuyla ilgili bir başlangıç uyarısı olarak harekete geçirmektedir. Hala duyarlı olarak sınıflandırılan bir suş, ilaca karşı duyarlılığının azalmasıyla birlikte daha yüksek düzeyde direncin sonradan ortaya çıkacağını haber vermekte ve bu antimikrobiyalin o ortamda kullanımını değiştirmeye yönelik çabaları teşvik etmektedir (Lee *et al.* 2013).

Hayvanlarda antimikrobiyal kullanımı ile insanlardaki direnç sorunu arasındaki ilişki hakkında önemli bir tartışma bulunmaktadır. Gıda hayvanlarında büyüme teşvikinde subterapötik dozlarda antibiyotiklerin kronik kullanımı Avrupa Birliği'nde yasaklanmış olmasına rağmen, ABD'de hala devam etmektedir. Ancak Gıda ve İlaç Dairesi Veteriner Tıp Merkezi tarafından yoğun bir şekilde denetlenmektedir. Düşük düzeyde uygulanmalarına rağmen, antibiyotikler yüksek düzeyde, klinik olarak önemli direnci etkileyen belirleyicileri seçmektedir (Uddin *et al.* 2017). *Salmonella, Campylobacter, Listeria*, enterokoklar ve bazı *E. coli* suşları gibi enterik organizmalar öncelikle hayvanlar

arasında yayılmakta ve daha sonra insanları enfekte etmektedir. Bu transfer, besin zinciri aracılığıyla veya hayvan işleyicileri aracılığıyla gerçekleşebilmektedir. Eğer organizmalar MDR ise, dirençlerinin ortaya çıkması büyük ölçüde hayvanlarda antibiyotik kullanımı ve aşırı kullanımına bağlanmaktadır. Genel olarak, hayvanların insan enfeksiyonlarındaki direnç sorununa katkısı küçük ve önemsiz değildir. Özellikle enterik organizmalar söz konusu ise önemli bir rol oynarlar. Antibiyotikler ayrıca hastalık önlemeye yönelik olarak kullanılmaları ve antibiyotik içeren hayvan gübresinin tarım arazilerine uygulanmasıyla çevreye saçılmaktadır. Bu uygulamalar, dirençli bakterilerin sürekli olarak seçilmesine katkıda bulunmaktadır (Barza and Gorbach 2002).

Hollanda'da yapılan bir çalışmada 35 BARF'ın 28'inde genişletilmiş spektrumlu β-laktamaz (ESBL) *E. coli* tespit edilirken (van Bree *et al.* 2018), hayvan yemi olarak kullanılan, kullanım tarihi geçmiş çiğ insan gıdalarında *Salmonella spp.* tespit edilmiştir (Bacci *et al.* 2019). Hollanda'da yapılan ikinci bir çalışmada ise 18 BARF'ın 14'ünde ESBL veya AmpC içeren *Enterobacteriaceae* tespit edilmiştir (Baede *et al.* 2017).

BARF'larda ısıyla işlenmiş yiyeceklere kıyasla geniş spektrumlu sefalosporin direnci riskinin görünüşte daha yüksek olduğu; çiğ gıdalarda *E. coli* ve ilgili organizmaların görece yüksek sayılarının, dirençli organizmaların varlığı veya yoğun yayılımı riskinin arttığı bildirilmektedir. Kanada'daki terapi köpeklerinde, 18 ay süresince uygulanan çiğ beslenme ile AmpC tipi direnç gösteren *E. coli*'nin dışkıyla saçılma olasılığı arasında güçlü bir ilişki bulunmuştur (Lefebvre *et al.* 2008). Hollanda'da yapılan bir çalışmada, çiğ beslenme ile ESBL direncine sahip köpeklerde (Baede *et al.* 2015) veya ESBL/AmpC direncine sahip kedilerde dışkı Enterobacteriaceae arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (Baede *et al.* 2017). Bu son çalışmada, fenotipik olarak dirençli Enterobacteriaceae izole edildiğinde, çiğ beslenen kedilerdeki böyle izolatlar için ortalama sayının (gram dışkı başına koloni oluşturan birimler) kontrol grubundakilere kıyasla iki sıra büyüklüğünden daha yüksek olduğu bulunmuştur.

İngiltere'deki iki kesitsel çalışmada, çiğ beslenme ile AmpC fenotipi *E. coli* ve üçüncü nesil sefalosporinlere dirençli *E. coli* arasında ilişkiler bulunmuştur (Schmidt *et al.* 2015). Başka bir İngiltere kesitsel çalışması, veteriner kliniğine başvuran köpekler arasında çiğ

tavuk yeme ve dışkı ESBL *E. coli* arasında güçlü bir ilişki olduğunu bildirmiştir (Wedley *et al.* 2017).

ESBL/AmpC direnç çalışmalarının yanı sıra, BARF tüketmenin köpeklerin diğer antimikrobiyal ilaç dirençlerini sergilemesi açısından da bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir (Leonard *et al.* 2015, Groat *et al.* 2016). Bu, dirençli *Salmonella* (Leonard *et al.* 2015) veya çoklu ilaç direncine sahip *E. coli* (Groat *et al.* 2016, Wedley *et al.* 2017) için de geçerlidir. Çiğ etle beslenen Greyhound'ların sık sık çoklu dirençli *Salmonella* suşlarını dışkıladığı bildirilmiştir (Morley *et al.* 2006).

İtalya'da evcil hayvan maması üretimi için mevcut olan kümes hayvanı ve domuz materyalleri arasında çoklu dirençli *E. coli* ve *Salmonella* suşları yaygındır (Bacci *et al.* 2019) ve İngiltere'de BARF üretimi için ithal edilen kümes hayvanı etinin kullanımı konusunda özel bir endişe vardır. Şu anda İngiltere'deki gıda hayvanlarında bulunmayan *S. kentucky*, *S. infantis*, *S. stanley*, *S. heidelberg* ve siprofloksasin *dirençli S. enteritidis* gibi çoklu dirençli salgın *Salmonella* serovarlarının köpekler ve kediler tarafından tüketilmesi, evcil hayvanlar aracılığıyla bu dirençli suşların İngiliz kümes hayvanı sürülerine yayılma riskini oluşturmaktadır. Serbest dolaşan sürülerdeki kamu yolları ve köpeklerin yaşadığı kümes çiftlikleri özellikle risk altındadır (Shah *et al.* 2017).

2.10 Real Time-PCR

"Polimeraz zincir reaksiyonu" (PCR) ilk kez yaklaşık olarak yarım yüzyıl kadar önce DNA molekülünün enzim kullanılarak amplifikasyonunu isimlendirmek amacıyla kullanılmıştır (Zhu *et al.*2020). Başlangıçta PCR'nin çok da uygulanabilir bir yöntem olmadığı düşünülmekteyken *Thermus aquaticus*'tan elde edilen ısıya dayanıklı bir polimeraz enzimi sayesinde pratik olarak kullanılabilir hale gelmiştir. Bunun ardından DNA'nın amplifikasyonu için ihtiyaç duyulan sıcaklıkları sağlamak için kullanılan sıcaklık döngüleyicileri ve reaksiyon için gerekli diğer kimyasalların seri üretimine bağlı olarak düşen maliyetler sayesinde tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Gerekli olan kimyasallar ve ekipmanlar sürekli olarak gelişmesine rağmen temelde bir farklılık olmamıştır (Kralik and Ricchi 2017).

PCR'de DNA'nın amplifikasyonu, kullanılan floresan özellikli DNA bağlayıcı boyalar veya kullanılan primerlere özgü problar sayesinde gerçek zamanlı olarak gözlemlenebilmektedir (Kralik and Ricchi 2017, Klymus *et al.* 2020). "Real-Time PCR (RT-PCR)" terimi amplifikasyonun anlık olarak gözlemlenebilmesi nedeniyle kullanılan bir terimdir (Kralik and Ricchi 2017). RT kısaltması ile ilgili kafa karışıklığını önlemek için, kantitatif gerçek zamanlı DNA ölçüm PCR 'si için qPCR ve ters transkripsiyondan sonra RNA seviyelerini ölçmek için yapılana RT-qPCR teriminin kullanılmasının daha uygun olduğu belirtilmektedir (Courts *et al.* 2019).

Çeşitli ve fazla sayıda kaynaktan alınan örneklerdeki düşük miktarlarda bulunan nükleik asitlerin tespit edilebilmesi için sağlık, tarım ve daha bir çok bilim dalında kullanılan bir teknik olan qPCR, temelde çok basit, kolay uygulanabilir, hızlı, spesifik ve hassas bir tekniktir (Klymus *et al.* 2020). Araştırma aracı olarak kullanılması yanında, kantitatif mikrobiyal ölçüm, gen dozunun belirlenmesi, genetiği değiştirilmiş gıdalardaki transgenlerin tespit edilmesi, kanser vakalarının tekrarlama ihtimalinin değerlendirilmesi ve özellikle adli tıp olmak üzere pek çok alanda teşhis amacıyla kullanılabilmesi gibi geniş bir yelpazede kullanımı söz konusudur (Courts *et al.* 2019).

Bu olumlu özellikleri yanında numunenin saklanması ve hazırlanması aşamalarındaki koşullara bağlı olarak elde edilen nükleik asit miktarının veya kalitesinin düşüklüğü, reaksiyon için seçilen primelerin yetersizliği gibi bazı teknik eksiklikler nedeniyle elde eidlemn sonuçlar olumsuz olarak etkilenmektedir. Belirtilen bu nedenle bilimsel sonuçların birbirleriyle çelişebildiği ve gerçeği yansıtmayan sonuçların elde edilebildiği bildirilmektedir (Klymus *et al.* 2020).

2.11. Mikrobiyota Analizi

Mikrobiyota terimi, bir insanın kolonu, bir köpeğin duodenumu, bir atın midesi gibi bir ortamda yaşayan tüm mikroorganizmaları ifade etmektedir. Mikrobiyota sadece bakterilerden değil aynı zamanda Archaea, mantarlar, protozoalar ve virüslerden de oluşmaktadır. Mikrobiyom terimi, bir ortamda bulunan bakteri topluluğu ile eşanlamlı olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, mikrobiyom bir ortamdaki mikropların genetik

bileşimi olduğu için bu tanım yetersiz olarak değerlendirilmektedir. Mikrobiyota ve mikrobiyom geçmişte birbirinin yerine kullanılsa da, bu durum artık kesin olmayan ve yanlış bir tanımlama olarak kabul edilmektedir. Bakterilerin tamamen taksonomik sınıflandırmasını araştıran 16S rRNA geninin dizilimi çalışmalar mikrobiyota terimini benimserken, bu toplulukta bulunan tüm genetik materyalin araştırılması yani metagenomik analizleri kapsayan çalışmalarda mikrobiyom terimi kullanılmaktadır (Costa and Weese 2019).

Mikrobiyal toplulukların karmaşıklığı, onları incelemeyi zorlaştırmaktadır. Yüzlerce farklı tür olabileceği için hangi organizmaların mevcut olduğunu standart mikrobiyolojik tekniklerle saymak mümkün olmamaktadır. Bunun nedenlerinden biri birçoğunun kültürde hiç yetiştirilmemiş olması ve henüz bilinmeyen özel büyüme koşullarına ihtiyaç duymalarıdır. Ek olarak, bazı mikropların bolluğu büyüklük dereceleri üzerinde değişebileceği için daha az bulunan üyeleri tespit etmek için derin örnekleme gerekmektedir (Weinstock 2012).

Kültürden bağımsız mikrobiyal sayımı yöntemleri yaklaşık 25 yıl önce başlamıştır. Her tür için farklı olan ve uygun bir tanımlayıcı olan 10 tane 5S ve 16S ribozomal RNA geninin dizilişine dayanmaktadır. Bu izlenebilir bir araştırma alanı haline geldikçe, yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri geliştirilerek hem hedeflenen 16S rRNA gen dizilimi hem de topluluklardaki bekterilerin toplu genom dizilimi olan daha kapsamlı analizlere olanak sağlamıştır (Olsen *et al.* 1986).

Modern metagenomik analizler, mikrobiyal toplulukların içinde bulunan organizmaların sayımını ve yaygınlıklarını kültür bağımsız yöntemlerle belirlemek için kullanılmaktadır. DNA reasosiasyon kinetiği, topluluk çeşitliliği ve yapısı hakkında bilgi sağlasa da organizmaların örnekler arasındaki geçişlerinin takibini hesaba katmamaktadır (Gans *et al.* 2005).

16S rRNA genlerinin dizilenmesi, populasyon sayımının ana yöntemidir. Çünkü parmak izi yöntemleri düşük yaygınlıkta olan organizmaları yeterince ölçememektedir (Bent *et al.* 2007). 16S rRNA, her bakteri türü için farklılık göstermektedir. Bakteri türünü tek

olarak tanımlamak zordur. Ancak genellikle en az %97 benzerliğe sahip 16S rRNA gen dizisi olan organizmalar bir işlevsel taksonomik birim (OTU) olarak kabul edilmektedir. Yaklaşık 1,5 kilobaz uzunluğundaki 16S rRNA gen dizisi, bakteriyel taksonları ayırt eden dokuz kısa hiperdeğişken bölgeye sahiptir. Topluluk sayımında bu bölgelerin bir veya daha fazlasının dizilenmesi hedeflenmektedir (Zinger *et al.* 2019).

NGS yöntemlerinin tanıtılmasından önce, yaygın yaklaşım geniş bir organizma yelpazesinden genleri çoğaltan primerlerle PCR'dan sonra tam uzunlukta 16S rRNA genlerini klonlamaktı. Klonlanan 16S rRNA genleri Sanger yöntemiyle dizilenmekte, tüm geni kapsamak için iki veya üç okuma gerekmekteydi. Dizileme hataları yanlış sınıflandırmaya yol açtığından doğruluk önemli olmaktadır. Sanger yönteminin gerektirdiği maliyet ve çaba, örnekleme derinliğini sınırlamakta ve çalışmalar genellikle her örnekte yaklaşık 100 dizi üretmekteydi. Bu yöntem topluluktaki baskın organizmaları tanımlamakta ancak daha az yaygın olan organizmaların analizini sınırlamaktadır (Suchodolski 2020).

NGS'nin 16S rRNA gen analizine tanıtılması, maliyet ve örnekleme derinliğinde belirgin iyileştirmelere yol açmıştır. Roche-454 platformu mikrobiyal topluluk analizini domine etmiştir (Sogin *et al.* 2006).”454 pyrosequencing” için okuma uzunluğu yaklaşık 400 baz çiftidir. Bu nedenle 16S rRNA geninin bir kısmı örneklenebilmekte ve birçok farklı çalışma, farklı çalışmalarda farklı hiperdeğişken bölgelerin hedeflendiği bir ila üç arasında değişen hedefli çalışmalar gerçekleştirilebilmektedir. 16S rRNA geninin bir kısmının kullanılması, hassasiyet kaybına neden olmakla birlikte örnekleme derinliği ve maliyet tasarrufu bu sakınca üzerinde ağır basmaktadır. ABD İnsan Mikrobiyom Projesi (HMP)32, 16S rRNA geninin V3-V5 bölgelerine hedeflenerek, 454 platformunda sağlıklı yetişkinlerden 10.000'den fazla örneği dizilemiş ve ortalama olarak her örnekte 7.000 diziyi sağlamıştır. Bu tür analizlerin, *C. difficile* gibi patojenlerin aşırı büyümesi veya hayatı tehdit eden antibiyotik ilişkili ishal gibi yan etki riski altındaki bireyleri belirlemede önemli olacağı bildirilmektedir (Dethlefsen *et al.* 2006).

Bireyleri karşılaştırmak için 16S rRNA gen dizilemesi kullanılırken hangi organizmaların bulunduğunu bilmek gerekli değildir, sadece 16S rRNA gen dizilerinin spektrumu ve

örnekler arasındaki fark derecesi önemlidir. Sağlıklı grupları ve hastalığı olanları karşılaştıran projeler, mikrobiyomdaki farklılıkları belirlemek veya diyetin, antibiyotik tedavisinin veya çevresel faktörlerin mikrobiyom üzerindeki etkilerini incelemek, gerçek taksonları tanımlamaktan ziyade topluluklardaki farklılıkları tespit etmeye odaklanmaktadır (Lazarevic 2009).

Illumina dizileme platformu metagenomik projelere uygulanmıştır. Ancak bu dizileme platformu şu anda 100 baz (HiSeq sistemi) ila 150 baz (MiSeq sistemi) okuma ürettiği için yalnızca tek bir hiperdeğişken bölge dizilenebilmektedir. İstisnai okuma sayısındaki artışlar ve Illumina platformuyla ilişkili düşük maliyet nedeniyle, 16S rRNA gen dizisi profillemesi için daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Claesson *et al.* 2010, Masella *et al.* 2012).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

Araştırma için Mart-Nisan 2022 tarihleri arasında ticari olarak satılan tavuk, kuzu, balık ve sığır etli olmak üzere 4 farklı grup BARF'tan 5'er örnek olmak üzere toplam 20 adet örnek alındı. Örneklerin 5'i kedi 15'i ise köpek mamasıydı. Her numune steril koşullar altında steril kaşık kullanılarak homojen bir şekilde 10 g olacak şekilde 50 mL'lik falcon tüplere aktarılıp analize kadar -80 °C'de saklandı.

Analiz için örnekler üzerine steril 1X PBS solüsyonundan 40 mL eklendi. Dokuların çözülmesi için 10 dakika boyunca çalkalandı. Büyük parçacıkların çökebilmesi için kısa bir süre 5000 g'de santrifüj edildi ve tüm süpernatant yeni bir tüpe transfer edildi. Ardından, 5000 g'de 30 dakika boyunca santrifüj yapıldı ve tüm içerikler çökeltildi. Süpernatant dikkatlice alındı ve pelletten ayrıştırıldı. Pelletten DNA ekstraksiyonu için DiaRex® Stool Genomik DNA Ekstraksiyon Kiti (Katalog No: SD-0323, Ankara) kullanıldı. Pellet, 250 µL Fecal Lysis (SLD) çözeltisi ve 25 µL Proteinaz K (PKD) çözeltisi ile birleştirilerek 56°C'de 60 dakika inkübe edildi. 200 µL Lysis (LBD) çözeltisi ekledikten sonra, tüpler 15 saniye boyunca çalkalandı ve 70°C'de 10 dakika inkübe edildi. Ardından, tüplere 250 µL %99'luk soğuk etanol eklenerek 15 saniye boyunca çalkalandı. Mikro santrifüj tüpündeki tüm hacim kolona aktarıldı. 8000 g x 1 dakika boyunca santrifüj yapıldıktan sonra, kolon yeni bir tüpe aktarıldı. Ardından, kit protokolüne göre yıkama işlemi gerçekleştirilip100 µL Elution (EBD) çözeltisi eklenerek ve 2 dakika inkübe edildi. Genomik DNA'yı elde etmek için 8000 g x 1 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulandı.

3.2 16S Amplikon Dizileme

Elde edilen DNA, 16S V3-V4 314F-860R primer setleri ile amplifiye edildi ve kütüphane hazırlığı Nextera XT DNA kütüphane hazırlama kiti ve indeksler (Illumina) ile gerçekleştirildi. Üretici protokolüne uygun olarak belirli bir boyutta seçilmiş birleştirilmiş

kütüphaneler, spesifik boyut seçimi ile temizlendi (AMPure XP, Beckman Coulter). Kütüphane hazırlığından sonra, MiSeq (Illumina) cihazı kullanılarak dizileme yapıldı.

3.3 Biyoinformatik Analiz

Eşlenik uçlu Illumina verileri (2x250) qiime2 ortamına aktarıldı (Bolten *et al.* 2019). Tüm örneklerin 100X'ten fazla dizilim derinliği vardı ve hiçbir örnek çalışmadan çıkarılmadı. Qiime2 Dada2 iş akışı (q2-dada2 aracılığıyla) kullanılarak kalite kesimi, kimer tespiti ve dizilerin temizlenmesi uygulandı (Callahan *et al.* 2016). Düşük phred skoruna (<Q30) sahip bazlar kesildi. Dada2 tarafından oluşturulan Amplicon Dizi Varyantları (ASV), Silva 138 "https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/" veritabanına (Werner *et al.* 2012, Schloss 2021) haritalandı. Qiime2 artefakt dosyalarından R 4.1 ortamında Phyloseq (30) nesnesi oluşturuldu (McMurdie and Holmes 2013, Anonim 2021). Bir örnekteki ilgili taksonomik birimlerin çeşitliliğini değerlendirmek için kullanılan alfa çeşitlilik değerlendirmesi, Chao1, Shannon ve Simpson gibi üç farklı indeks kullanılarak yorumlandı. Gruplar arasındaki P değerleri, Kruskal-Wallis testi ile hesaplandı (Kruskal *et al.* 1952). Bireyler arasındaki taksonomik farklılıkları değerlendirmek için kullanılan beta çeşitlilik analizi, jaccard, bray-curtis, ağırlıklı ve ağırlıksız unifrac temel alınarak hesaplandı. Gruplar arasındaki özel farklılıklar, Deseq2 R paketi ile diferansiyel bolluk analizi ile belirlendi (Love *et al.* 2014). Lineer Diskriminant Analizi Etki Büyüklüğü (LEFSe) analizi, istatistiksel olarak anlamlı taksonomileri göstermek için gruplar arasında gerçekleştirildi (Segata *et al.* 2011).

3.4 RT-PCR

RT-PCR çalışmaları için ilk olarak bakteri ve antibiyotik direnç genlerine spesifik olarak tasarlanan primerlerin sentezleri gerçekleştirildi (Biomers, Almanya). Yaygın olarak kullanılan 9 antibiyotiğe karşı 15 direnç geninin varlığının araştırılması için kullanılan primerler Çizelge 3.1'de verilmiştir. *A. baumannii, E. coli, Salmonella spp.* ve *S. aureus* için kullanılan primerler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Liyofilize haldeki primerler 100 Mm olacak şekilde nükleaz free dH_2O ile çözdürüldü. qPCR işlemi için Diagen 2X Sybrgreen master miks (Diagen, Turkiye) kullanıldı. 1X master miks (2X), 0,5 mM forward ve reverse primerler (10 mM) ve 5 µL gDNA ile toplam hacim 20 µL'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon, realtime PCR cihazında (Roche 480, ABD) 8'li strip tüpler kullanılarak, ilk denatürasyon 95 ºC 5 dk, 40 tekrar 95 ºC 10 sn, 60 ºC 30 sn (okuma), 72 ºC 30 sn ve 95 ºC 5 sn, 65 ºC 1 dk ve 97 ºC'ye kadar HRM analizi ile fragment çoğaltma işlemi yapılmıştır. Real time PCR işlemi sonucunda elde edilen CT değerleri kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.1 Antibiyotik direnci için primerler

Amoksisilin+klavulanik asit *TEM* -F	GAAGCCATACCAAACGAC
Amoksisilin+klavulanik asit *TEM*-R	CAGCAATAAACCAGCCAG
Amoksisilin+klavulanik asit *OXA* 1-F	TTTTCTGTTGTTTGGGTTTC
Amoksisilin+klavulanik asit *OXA* 1-R	CTATGGTGTTTTCTATGGCT
Eritromisin *ermA*-F	CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT
Eritromisin *ermA*-R	TCAAAAAGCATGTAAAAGAA
İmipenem-F	GAGTGGCTTAATTCTCRATC
İmipenem-R	AACTAYCCAATAYRTAAC
Kinolon *qnrA*-F	TTTGGCATAGAGTTCAGG
Kinolon *qnrA*-R	CATTGCTCCAGTTGTTTT
Kolistin *mcr 1*-F	GTCCGTTTGTTCTTGTGG
Kolistin *mcr 1*-R	GTCTGTAGGGCATTTTGG
Kolistin *mcr 2*-F	GTATTCTGTGCCGTGTATG
Kolistin *mcr 2*-R	GTATTGTTGGTTGCTGATTT
Kolistin *mcr 3*-F	GCCTCATTTTGATTGGTTTC
Kolistin *mcr 3*-R	TAAGTTTGGTTTCGCCATTT
Kolistin *mcr 4*-F	CCCGAACACTAAACCTAAC
Kolistin *mcr 4*-R	AAACATACAGGGTAGAGACA
Kolistin *mcr 5*-F	ACTGATTCTGCTTGCTGT
Kolistin *mcr 5*-R	TCATTACCGCTTGTTTCC
Metisilin *MecA*-F	GCAGTTATTGGTAAAAAGGGA
Metisilin *MecA*-R	GTTTGAGGGTGGATAGCA
Sefepim *ampC*-F	TTCTTGTCTACTTTTATCCCC
Sefepim *ampC*-R	ACTGCTATTTACGGCTTTTT
Seftriakson-F	CGCAACCGTGCCGTT
Seftriakson-R	GGGTATTGAATGTGTCTGTTGGA
Siprofloksasin *gyrA Salmonella*-F	CAATAGAACCGAAGTTACCC
Siprofloksasin *gyrA Salmonella* -R	GGCAATGACTGGAACAAA
Siprofloksasin *gyrA* Escherichia-F	GGCAATGACTGGAACAAA
Siprofloksasin *gyrA* Escherichia-R	GATAGAACCGAAGTTACCC
Vankomisin *vanA*-F	GATACAGGAAACGGCAAAAA
Vankomisin *vanA*-R	CATCATACGGGGATAACGA
Vankomisin *vanB*-F	GCTTACCTACCCTGTCTTT
Vankomisin *vanB*-R	AATCAAATCATCCTCGTTCC

Çizelge 3.2 Bakteri primerleri

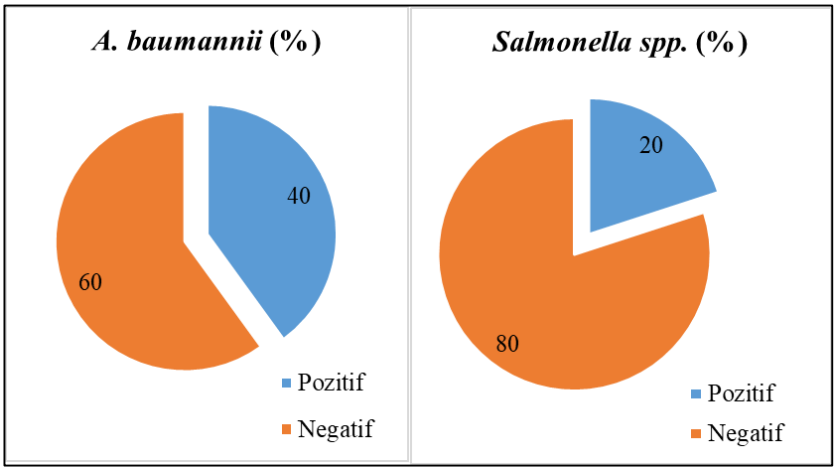
A.baumannii efp-F	GTGATGCTGCTAAATGGT
A.baumannii efp-R	ACAACTTTCAAWACAACGAAG
E. coli malK-F	TAAGACTGAAACACCATACC
E. coli malK-R	CAAAATGTAACGAAAGCCTG
Salmonella spp. invA-F	TACGGCTATTTTGACCATTT
Salmonella spp. invA -R	ACGACCCTTCTTTTTCCT
S. aureus FemA-F	GAAGAAACCAGCAGAGATAG
S. aureus FemA-R	CACAYAACAAGCGAGATAA

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. RT-PCR Bulguları

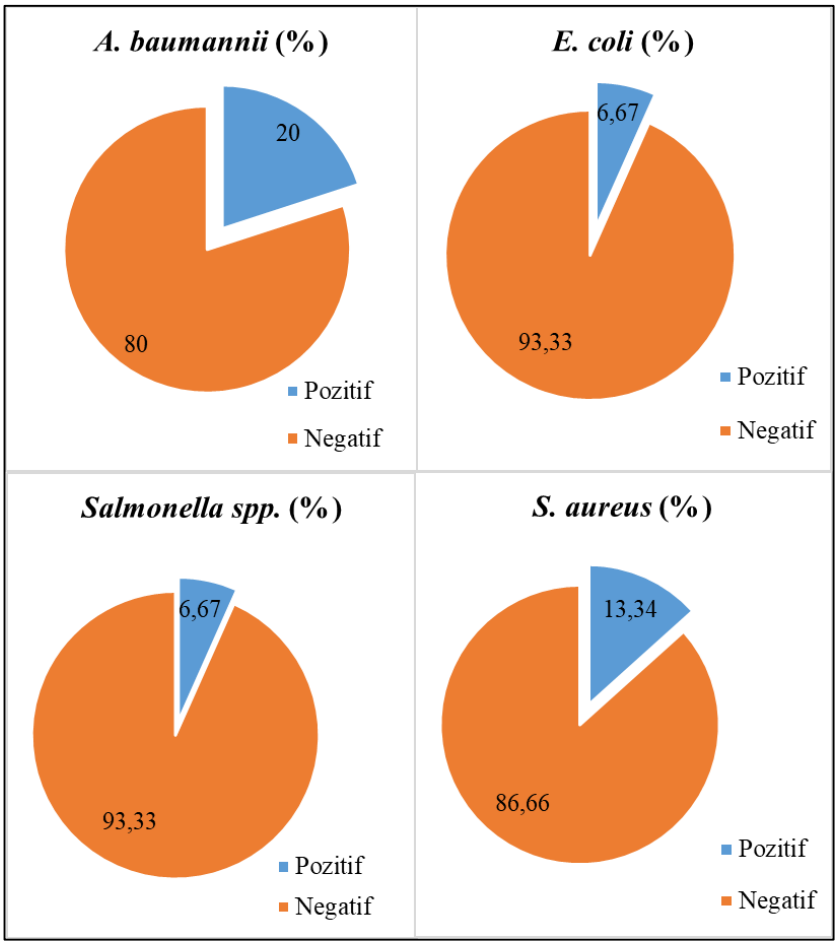
Araştırma için Mart-Nisan 2022 tarihlerinde piyasadan toplanan sığır, kuzu, tavuk, balık, hindi, ördek ve domuz eti içeren kediler için üretilen 5 ve köpekler için üretilen 15 BARF'tan insan sağlığı açısından risk oluşturabilecek 4 farklı bakteri için RT-PCR analizi yapıldı. Numunelerde gıda enfeksiyonlarının en önemli Gram negatif etkenlerinden *E. coli* ve *Salmonella spp.*; Gram pozitif patojen *S. aureus* ile antibiyotik direncinin yayılmasında en önemli etkenlerden biri olan Gram negatif bakteri *A. baumannii* tespit edildi.

Kediler için olan BARF'ların (n=5) %40'ında *A. baumannii*, %20'sinde ise *Salmonella spp.* geni bulundu. Hiçbir kedi mamasında *E. coli* ve *S. aureus*'a rastlanmadı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Kedi mamalarında bakterilerin dağılımları

Köpekler için olan BARF'ların (n=15) %20'sinde *A. baumannii*, %6,67'sinde *E. coli*, %6,67'sinde *Salmonella spp.* ve %13,34'ünde de *S. aureus* geni bulundu (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Köpek mamalarında bakterilerin dağılımları

Bakteri tespit edilen BARF'lar ve içerdikleri çiğ et türünü gösterir bilgiler Çizelge 4.1'de verildi. Buna göre *A. baumannii* neredeyse tüm et çeşitlerinden yapılan BARF'larda tespit edildi. *Salmonella spp.* sadece tavuk eti içeren BARF'larda tespit edildi. *S. aureus* ise sığır ve kuzu eti kullanılan BARF'larda tespit edilmiştir. Bu mamaların içerikleri incelendiğinde sığır memesi, derisi ve kuzu sakatatları da kullanıldığı görüldü.

Çizelge 4.1 Bakteri tespit edilen örneklerdeki et türleri

Et türü	***A. baumannii***	***E. coli***	***Salmonella spp.***	***S. aureus***
Kuzu	X	-	-	-
Sığır-domuz	X	-	-	-
Tavuk	-	-	X	-
Balık	X	-	-	-
Sığır-Tavuk	X	-	-	-
Dana-kuzu	X	-	-	-
Balık-tavuk	-	-	X	-
Sığır-balık	-	X	-	X
Kuzu	-	-	-	X

Toplam 20 mama içinde sadece 4 tanesinde antibiyotik direnç geni tespit edildi. Bunlardan biri kedi 3'ü ise köpekler içindi. Ek sık tespit edilen direnç geni siprofloksasin direncinden sorumlu *gyrA* (*Salmonella*) idi. Direnç tespit edilen tüm numunelerde bu gen de mevcuttu.

Direnç geni bulunan tek kedi BARF'ında 4 antibiyotiğe karşı 6 direnç geni görüldü. Bu örnekte kolistin direncinden sorumlu 5 genin 3'ü de vardı. Köpek BARF'larında ise 2-4 antibiyotiğe karşı 2-4 gen tespit edildi.

Köpek BARF'larının sadece birinde metisilin, birinde ise sefepim direnci görüldü. En sık görülen direnç ise kolistine karşı idi. Numunelerin birinde ise 4 farklı antibiyotiğe karşı 4 direnç geni bulundu. Tespit edilen direnç genleri ve CT değerleri Çizelge 4.2'de, RT-PCR grafikleri ise Ek 1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2 Direnç genleri ve CT değerleri

	Numuneler			
Antibiyotikler ve genleri	Köpek-1	Köpek-2	Köpek-3	Kedi
Amoksisilin-klavulanik asit (*OXA1)*	-	28,89	-	28,61
Kinolon (*qnrA*)	-	-	-	36,41
Kolistin (*mcr2*)	-	-	-	34,51
Kolistin (*mcr3*)	24,88	30,89	-	-
Kolistin (*mcr4*)	-	-	32,07	-
Kolistin (*mcr5*)	-	-	-	32,39
Metisilin	-	33,90	-	33,42
Sefepim (*ampC*)	24,40	-	-	-
Siprofloksasin (*gyrA*)	25,89	32,65	36,22	34,21

4.2. Mikrobiyota Bulguları

Numunelerin %20'sine mikrobiyota analizi yapıldı. Bunların 3'ü köpek 1'i ise kediler içindi olan BARF'dı. Bu BARF'ların ana et türü kuzu, sığır/domuz, hindi/ördek ve dana/kuzu idi. Kuzu etinden yapılan BARF'ta 27 filum, 59 sınıf, 121 sıra, 168 aile, 210 cinse ait genetik materyal tespit edildi. Sıklık yüzde olarak 0,018'e kadar inildiğinde tanımlanan bakteri türü sayısı 65 oldu. Çizelge 4.3'te tespit sıklığı %1'e kadar olan bakteri türleri ve taksonomik sırayla bulunma oranları verilmiştir.

Çizelge 4.3 Kuzu etli BARF bakterileri (taksonomi ve bulunma sıklıkları)

Filum	%	Sınıf	%	Sıra	%	Aile	%	Cins	%	Tür	%
Proteobacteria	68,29	Gammaproteobacteria	65,22	Vibrionales	48,70	Vibrionaceae	48,70	Photobacterium	48,70	Lactococcus piscium	24,28
Firmicutes	18,71	Bacilli	18,52	Lactobacillales	18,20	Moraxellaceae	9,96	Acinetobacter	9,61	Streptococcus anginosus	15,79
Acidobacteriota	5,35	Acidobacteriae	3,84	Pseudomonadales	12,16	Listeriaceae	5,04	Brochothrix	5,04	Carnobacterium maltaromaticum	11,95
Actinobacteriota	2,10	Alphaproteobacteria	3,07	Burkholderiales	2,12	Streptococcaceae	4,93	Kültürlenemeyen	4,01	Gardnerella aginalis	10,57
Bacteroidota	1,81	Bacteroidia	1,81	Bifidobacteriales	1,43	Lactobacillaceae	3,88	Lactobacillus	3,88	Lactobacillus iners	8,12
Verrucomicrobiota	1,07	Actinobacteria	1,64	Acidobacteriales	1,31	Carnobacteriaceae	3,63	Carnobacterium	3,63	Kültürlenemeyen bacterium	6,16
Myxococcota	0,45	Verrucomicrobiae	1,06	Xanthomonadales	1,26	Pseudomonadaceae	2,20	Lactococcus	3,05	Kültürlenemeyen Desulfovirga	2,15
Gemmatimonadota	0,37	Vicinamibacteria	0,66	Rhizobiales	1,10	Kültürlenemeyen	1,70	Pseudomonas	2,20	Kültürlenemeyen forest	2,03
Desulfobacterota	0,27	Holophagae	0,48	Altgrup 2	1,06	Bifidobacteriaceae	1,43	Streptococcus	1,88	Kültürlenemeyen Acidobacteria	1,86
Chloroflexi	0,26	Polyangia	0,42	Solibacterales	0,85	Altgrup 2	1,06	Gardnerella	1,39	Kültürlenemeyen Prosthecobacter	1,83
MBNT15	0,23	Gemmatimonadetes	0,37	Chthoniobacterales	0,82	Solibacteraceae	0,85	Altgrup 2	1,06	Kültürlenemeyen Xanthomonadaceae	1,81
Methylomirabilota	0,22	Kültürlenemeyen	0,27	Micropepsales	0,62	Chthoniobacteraceae	0,82	Candidatus Solibacter	0,85	Kültürlenemeyen proteobacterium	1,21

Sığır/domuz etinden yapılan BARF'ta 22 filum, 38 sınıf, 66 sıra, 87 aile, 89 cinse ait genetik materyal tespit edildi. Sıklık yüzde olarak 0,17'e kadar inildiğinde tanımlanan bakteri türü sayısı 26 oldu. Çizelge 4.4'te tespit sıklığı %1'e kadar olan bakteri türleri ve taksonomik sırayla bulunma oranları verilmiştir.

Çizelge 4.4 Sığır/domuz etli BARF bakterileri (taksonomi ve bulunma sıklıkları)

Filum	%	Sınıf			%	Aile	%	Cins	%	Tür	%
Proteobacteria	77,97	Gammaproteobacteria	76,95	Vibrionales	57,07	Vibrionaceae	57,07	Photobacterium	56,97	Lactococcus piscium	40,82
Firmicutes	17,22	Bacilli	17,22	Pseudomonadales	18,82	Moraxellaceae	18,06	Acinetobacter	17,86	Kültürlenemeyen forest	15,78
Acidobacteriota	2,88	Acidobacteriae	2,72	Lactobacillales	17,21	Listeriaceae	14,91	Brochothrix	14,91	Lactobacillus algidus	14,68
Chloroflexi	0,40	Alphaproteobacteria	1,02	Alt grup 2	1,49	Alt grup 2	1,49	Kültürlenemeyen	1,71	Kültürlenemeyen toprak	4,71
Actinobacteriota	0,39	RCP2-54	0,28	Acidobacteriales	0,69	Streptococcaceae	1,06	Alt grup 2	1,49	Kültürlenemeyen bacterium	3,61
RCP2-54	0,28	Actinobacteria	0,25	Rhizobiales	0,60	Leuconostocaceae	0,77	Lactococcus	1,06	Kültürlenemeyen proteobacterium	3,53
Gemmatimonadota	0,22	Gemmatimonadetes	0,22	Solibacterales	0,41	Pseudomonadaceae	0,76	Pseudomonas	0,76	Kültürlenemeyen Candidatus	1,88
Myxococcota	0,14	AD3	0,17	Burkholderiales	0,40	Kültürlenemeyen	0,72	Leuconostoc	0,67	Ktedonobacterales bacterium	1,57
WPS-2	0,12	Ktedonobacteria	0,15	RCP2-54	0,28	Xanthobacteraceae	0,48	Candidatus Solibacter	0,41	Dyella halodurans	1,41
Verrucomicrobiota	0,10	Polyangia	0,13	Alteromonadales	0,27	Solibacteraceae	0,41	Lactobacillus	0,40	soil metagenome	1,33
NB1-j	0,06	WPS-2	0,12	Frankiales	0,25	Lactobacillaceae	0,40	RCP2-54	0,28	metagenome	1,18
Bacteroidota	0,05	Verrucomicrobiae	0,09	Gemmatimonadales	0,22	RCP2-54	0,28	Acidothermus	0,25	Kültürlenemeyen Desulfovirga	1,18
Desulfobacterota	0,04	Acidimicrobiia	0,09	AD3	0,17	Acidothermaceae	0,25	Psychrobacter	0,20	Kültürlenemeyen Armatimonadetes	1,10
SAR324 clade (Marine group B)	0,03	Vicinamibacteria	0,09	Micropepsales	0,16	Gemmatimonadaceae	0,22	AD3	0,17	Kültürlenemeyen Holophaga	1,02

Hindi/ördek etinden yapılan BARF'ta 10 filum, 17 sınıf, 49 sıra, 78 aile, 111 cinse ait genetik materyal tespit edildi. Sıklık yüzde olarak 0,21'e kadar inildiğinde tanımlanan bakteri türü sayısı 55 oldu. Çizelge 4.5'te tespit sıklığı %1'e kadar olan bakteri türleri ve taksonomik sırayla bulunma oranları verilmiştir.

Çizelge 4.5 Hindi/ördek etli BARF bakterileri (taksonomi ve bulunma sıklıkları)

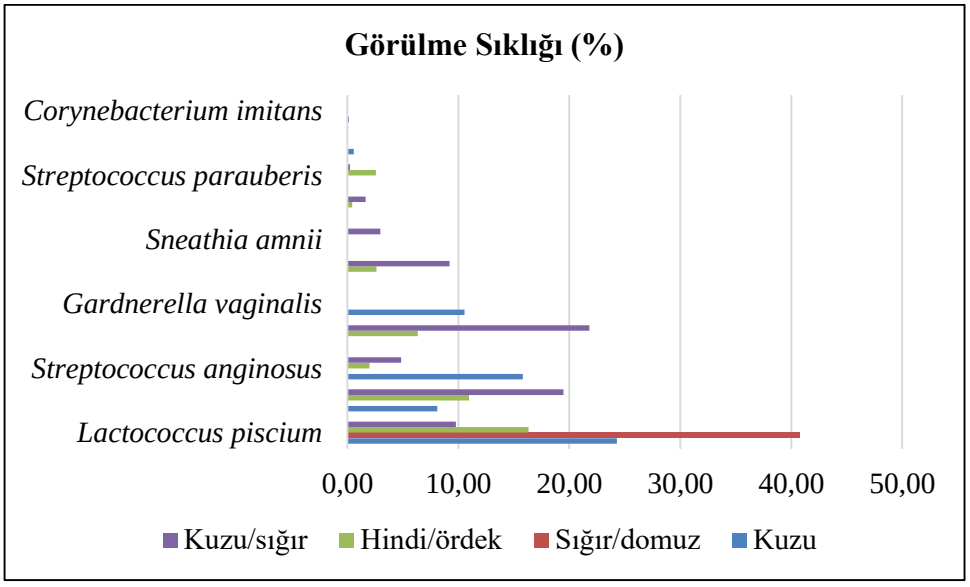
Filum	**%**	**Sınıf**		**Sıra**	**%**	**Aile**	**%**	**Cins**	**%**	**Tür**	**%**
Firmicutes	71,71	Bacilli	61,48	Lactobacillales	60,41	Carnobacteriaceae	19,25	Carnobacterium	22,09	Carnobacterium maltaromaticum	38,03
Proteobacteria	22,46	Gammaproteobacteria	21,07	Enterobacterales	10,11	Vagococcaceae	14,19	Vagococcus	16,29	Lactococcus piscium	16,33
Bacteroidota	3,72	Clostridia	8,52	Pseudomonadales	6,08	Lactobacillaceae	8,08	Lactobacillus	9,27	Lactobacillus iners	10,96
Actinobacteriota	0,90	Bacteroidia	3,72	Lachnospirales	5,87	Streptococcaceae	6,63	Brochothrix	7,52	Veillonella montpellierensis	6,35
Cyanobacteria	0,75	Negativicutes	1,70	Bacteroidales	3,59	Listeriaceae	6,55	Lactococcus	6,21	Acinetobacter harbinensis	3,56
Verrucomicrobiota	0,35	Alphaproteobacteria	1,39	Alteromonadales	2,17	Lachnospiraceae	6,05	Leuconostoc	5,32	Providencia sp.	2,95
Desulfobacterota	0,06	Actinobacteria	0,81	Aeromonadales	1,98	Leuconostocaceae	5,51	Pseudomonas	3,82	Prevotella bivia	2,61
Fusobacteriota	0,05	Cyanobacteriia	0,73	Oscillospirales	1,78	Enterobacteriaceae	4,66	Bacteroides	2,74	Streptococcus parauberis	2,57
Campilobacterota	0,01	Verrucomicrobiae	0,35	Veillonellales-Selenomonadales	1,54	Pseudomonadaceae	3,33	Shewanella	2,56	Shewanella profunda	2,17
Acidobacteriota	0,01	Coriobacteriia	0,08	Acetobacterales	1,13	Moraxellaceae	2,94	Aeromonas	2,28	Streptococcus anginosus	2,00
		Desulfovibrionia	0,06	Chloroplast	0,74	Morganellaceae	2,42	Moellerella	2,03	Morganella psychrotolerans	1,79
		Fusobacteriia	0,05	Clostridia vadinBB60 group	0,61	Bacteroidaceae	2,39	Veillonella	1,76	Kültürlenemeyen bacterium	1,71
		Vampirivibrionia	0,01	Bifidobacteriales	0,57	Shewanellaceae	2,23	Psychrobacter	1,72	Lactobacillus algidus	0,93

Dana/kuzu etinden yapılan BARF'ta 11 filum, 14 sınıf, 46 sıra, 78 aile, 109 cinse ait genetik materyal tespit edildi. Sıklık yüzde olarak 0,025'e kadar inildiğinde tanımlanan bakteri türü sayısı 49 oldu. Çizelge 4.6'te tespit sıklığı %1'e kadar olan bakteri türleri ve taksonomik sırayla bulunma oranları verilmiştir.

Çizelge 4.6 Dana/kuzu etli BARF bakterileri (taksonomi ve bulunma sıklıkları)

Filum	%	Sınıf		Sıra	%	Aile	%	Cins	%	Tür	%
Proteobacteria	71,76	Gammaproteobacteria	71,45	Pseudomonadales	69,61	Pseudomonadaceae	68,239	Pseudomonas	71,52	Veillonella montpellierensis	21,80
Firmicutes	23,19	Bacilli	15,83	Lactobacillales	14,96	Listeriaceae	6,026	Brochothrix	6,32	Lactobacillus iners	19,48
Bacteroidota	2,77	Clostridia	5,58	Lachnospirales	3,69	Lachnospiraceae	3,701	Lactobacillus	3,40	Lactococcus piscium	9,79
Verrucomicrobiota	0,74	Bacteroidia	2,77	Bacteroidales	2,71	Streptococcaceae	3,346	Streptococcus	2,49	Prevotella bivia	9,20
Actinobacteriota	0,72	Negativicutes	1,78	Veillonellales-Selenomonadales	1,62	Lactobacillaceae	3,248	Carnobacterium	1,94	Streptococcus anginosus	4,83
Cyanobacteria	0,46	Verrucomicrobiae	0,74	Oscillospirales	1,30	Carnobacteriaceae	1,856	Veillonella	1,66	Tanımlanamayan	4,81
Fusobacteriota	0,27	Actinobacteria	0,63	Enterobacterales	1,14	Veillonellaceae	1,618	Bacteroides	1,51	Kültürlenmeyen bacterium	3,33
Desulfobacterota	0,09	Cyanobacteriia	0,45	Verrucomicrobiales	0,74	Moraxellaceae	1,506	Psychrobacter	1,06	Carnobacterium maltaromaticum	3,20
Planctomycetota	0,01	Alphaproteobacteria	0,31	Erysipelotrichales	0,53	Bacteroidaceae	1,442	Lactococcus	1,02	Sneathia amnii	2,96
Gemmatimonadota	0,00	Fusobacteriia	0,27	Bifidobacteriales	0,46	Oscillospiraceae	0,906	Prevotella	0,78	Acinetobacter harbinensis	2,66
Patescibacteria	0,00	Desulfovibrionia	0,09	Chloroplast	0,45	Prevotellaceae	0,744	Akkermansia	0,78	Clostridium saccharogumia	2,13
		Coriobacteriia	0,08	Burkholderiales	0,28	Akkermansiaceae	0,74	Acinetobacter	0,52	Lactobacillus algidus	1,89
		Vampirivibrionia	0,01	Peptostreptococcales-Tissierellales	0,27	Enterobacteriaceae	0,67	Gardnerella	0,48	Lactococcus garvieae	1,72
		Planctomycetes	0,01	Fusobacteriales	0,27	Bifidobacteriaceae	0,461	Chloroplast	0,47	Ureaplasma parvum	1,63
		Gemmatimonadetes	0,00	Mycoplasmatales	0,24	Chloroplast	0,452	Escherichia-Shigella	0,39	Parabacteroides johnsonii	1,20
		Saccharimonadia	0,00	Clostridia vadinBB60 group	0,19	Tannerellaceae	0,333	Lachnospiraceae NK4A136 group	0,31	Bacteroides fragilis	1,15

Tür çeşitliliği yönünden en yüksekten alçağa doğru olarak kıyaslandığında BARF'lar kuzu, hindi/ördek, dana/kuzu ve sığır/domuz şeklinde sıralandı. Her bir BARF'ta ortak ve farklı olarak bulunan bakteriler vardı. İnsanlar ve özellikle de sucul canlılar için patojen birçok bakteri tespit edildi. %1 ve üzerinde oranda tespit edilen bakteri sayısı 11 idi. Bunlar *Lactococcus piscium*, *Lactobacillus iners*, *Streptococcus anginosus*, *Veillonella montpellierensis*, *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*, *Sneathia amnii*, *Ureaplasma parvum*, *Streptococcus parauberis*, *Aerococcus christensenii* ve *Corynebacterium imitans*'tı. Bu bakterilerin görülme sıklığını gösterir bilgiler Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3 Bakterilerin görülme sıklığı (%)

Bu bakterilerden en sık görüleni somon balıkları için patojen olarak tanımlanan *Lactococcus piscium* idi (Williams *et al.* 1990). Ana et kaynağı olarak sığır/domuz eti kullanılan BARF'taki bulunma sıklığı %40,82 olarak tespit edildi. Bunu sırasıyla kuzu (%24,28), hindi/ördek (%16,33) ve kuzu/sığır'dan (%9,79) yapılan BARF takip etti.

En çok tespit edilen bakterilerden ikincisi *Lactobacillus iners* idi. Bu bakteri kadınların vagina florasında bulunan bir bakteridir (Petrova *et al.* 2017). Bu bakteriye en sık kuzu/sığır (%19,48) etinden yapılan BARF'ta rastlanmadı. Hindi/ördek'te %10,96,

kuzuda ise %8,12 oranında bulundu. Sığır/domuz etinden yapılanda ise hiç tespit edilemedi.

En sık tespit edilen üçüncü tür ise insan patojeni olan *Streptococcus anginosus* idi. Bu bakteri insan florasının bir parçası olup belirli koşullar altında beyin ve karaciğer apsesi gibi hastalıklara neden olabilmektedir (Fazili *et al.* 2017). Kuzu BARF'ında %15,79 oranında tespit edildi. Kuzu/sığırda %4,83, hindi/ördekte ise %2 oranında bulundu. Sığır/domuzda ise hiç tespit edilemedi.

Kuzu/sığır eti kullanılan BARF'ta *Veillonella montpellierensis* %21,8 oranında tespit edildi. Hindi/ördekte ise %6,35 oranında tespit edildi. Bu bakteri insanlarda nadiren enfeksiyona neden olduğu bildirilen bir patojendir.

Gardnerella vaginalis ergenlik öncesi kızlarda normal vaginal mikrobiyotasında bulunmaktadır. Bunun yanında erkeklerin genital sisteminde de izole ediliştir (Holst 1990). Kuzu Barf'ında %10,57 oranında bulundu. Diğer BARF'larda tespit edilmedi.

Prevotella bivia en çok kuzu/sığır BARF'ında (%9,2) tespit edilmiştir. Hindi/ördek'te de %2,61 oranında bulunmuştur. Diğer BARF'larda tespit edilmemiştir.

Sneathia amnii sadece kuzu/sığır etinden yapılan BARF'ta (%2,96) bulunmuştur. Diğerlerinde tespit edilememiştir.

Ureaplasma parvum ise umumi tuvaletlerden veya cinsel yolla bulaşan bir bakteridir. Bu bakteri de üriner sistemde bulunan ve kadınlarda akıntıya veya vaginal kötü kokuya neden olmaktadır (Yarbrough *et al.* 2015). Kuzu/soğır BARF'ında %1,63 oranında, hindi/ördekte ise %0,42 oranında tespit edildi.

Streptococcus parauberis hayvancılıkta mastitis vakalarından izole edilen patojen bir bakteridir. Hindi/ördek BARF'ında %2,57; kuzu/sığırda ise %0,22 oranında bulundu.

Aerococcus christensenii vaginal bir bakteridir (Tohno *et al.* 2014). İncelenen örneklerden sadece kuzu BARF'ında %0,57 oranında bulundu. Diğerlerinde tespit edilmedi.

Corynebacterium imitans insan ve hayvanların deri florasında bulunan bir bakteridir (Capdevila *et al.* 2016). Sadece kuzu BARF'ında %0,15 oranında bulundu.

Lactococcus piscium değiştirilmiş atmosferik koşullarda paketlenmiş soğutulmuş ürünlerde bozulmadan sorumlu bir bakteri olarak paketlenmiş vakumlu etlerde de tespit edildiği bildirilmiştir (Sakala *et al.* 2002, Andreevskaya *et al.* 2018). Mevcut çalışmada da BARF'lar içinde yüksek oranda genetik materyali tespit edilmiştir.

Kadın vaginal mikrobiyotası içinde yer alan *L. iners*'in baskın olduğu bir vajinal topluluk tipinin diğer topluluk türlerine göre daha az kararlı veya daha fazla geçiş halinde ve vajinal disbiyoz ile daha fazla ilişkili göründüğü bildirilmiştir. Genom dizilimi sonucunda ise *L. iners*'in insan vajinasında parazitik veya simbiyotik bir yaşam tarzının göstergesi olan alışılmadık derecede küçük bir genoma sahip olduğunu ortaya çıkarılmıştır. Biyokimyasal ve fonksiyonel deneyler, *L. iners* bakterilerinin probiyotik laktobasillerin yanı sıra vajinal patojenlerin özelliklerini içerdiğini göstermektedir (Petrova *et al.* 2017). Cinsel yolla taşındığı bildirilmektedir (Carter *et al.* 2023). Bu bakterinin BARF'larda veya herhangi bir gıda ürününde tespit edildiği hiçbir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu bakımdan mevcut araştırma ilk olma niteliği taşımaktadır. Bu bakterinin genetik materyallerinin bulunması üretim aşamasında hijyenik koşulların yeterince sağlanmadığını düşündürmektedir.

S. anginosus'un yaşam alanı, insan vücudundaki çok çeşitli alanlardır. Ağız, sinüsler, boğaz, dışkı ve vajinadan alınan kültürlerde hemolitik (ağız) ve hemolitik olmayan (fekal ve vajinal) suşlar elde edilmiştir. *S. anginosus*'un neden olduğu bir dizi enfeksiyon içinde derin boyun, yumuşak doku, beyin, akciğer ve karaciğer gibi iç organlardaki enfeksiyonlar; farenjit ve bakteriyemi sayılabilir (Ruoff 1988). ABD'de yapılan bir çalışmada bu bakterinin izole edildiği hastaların %40'ının 35-54 yaş aralığında olduğu, %84'ünün ise kentlerde yaşadığı belirtilmiştir (Fazili *et al.* 2017). Diğer streptokoklar

kadar yaygın olmamakla birlikte endokardite neden olduğu da bildirilmiştir (Woo *et al.* 2004). Fransa'da yapılan bir çalışmada ise enfeksiyoz artrit vakalarının %11'inden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Teran *et al.* 2001). İnsan mikrobiyotasında bulunan bu bakterinin gıdalardan bulaştığına dair yapılmış bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu bakterinin BARF'ta bu oranda tespit edilmiş olması hijyen eksikliğini düşündürmektedir.

Veillonella montpellierensis'in nadiren de olsa meningitis, osteomiyelitis, pleura ve akciğer enfeksiyonu, endokardit ve bakteriyemiye neden olduğu bildirilmiştir (Palmer *et al.* 2006). Bunun yanında gebelik diabeti bulunan kadınlarda potansiye patojen olarak *Corynebacterium* ve *Ureaplasma* cinsleriyle birlikte vaginadan izole edildiği bildirilmiştir (Houttu *et al.* 2022).

Provotella bivia ise kadınların vaginal mikrobiyotasında bulunan bir bakteridir. Üreme sorunları yaşayan kadınlardanda izole edilmiştir. Aynı zamanda infertil erkeklerde semende de bulunmuştur. Spermelerin motilitesini düşürdüğü tespit edilmiştir (Campisciano *et al.* 2020). Bunun yanında Finlandiya'da gündüz bakımevindeki 83 çocuğun katıldığı bir çalışmada *Veillonella montpellierensis* ve *Provotella bivia*'nın tükrük mikrobiyotasında bulunduğu ve özellikle kız çocuklarında erkek çocuklarına göre daha yüksek oranda tespit edildiği bildirilmiştir (Roslund *et al.* 2021). Bu bakterilerin BARF'lardaki varlığı da hijyenik koşulların eksikliğini işaret etmektedir.

Gardnerella vaginalis erkeklerin rezervuar olduğu düşünülmektedir. Semenle kadınlara bulaştırıldığı değerlendirilmektedir. Kadınlarda asemptomatik vaginitis olgularında da tespit edilmiştir ve kötü kokuya neden olmaktadır (Schwebke *et al.* 2014). Bu bakterinin vagina ortamındaki *Prevotella bivia* ile simbiyotik bir ilişkisi olduğu değerlendirilmektedir (Pybus *et al.* 1997). Gıda bulaşıklığıyla ilgili bir çalışmaya ise rastlanmamıştır. BARF'ta bulunmasının hijyen eksikliğine bağlı olduğu değerlendirilmektedir.

Sneathia amnii gebelik sonucunu etkileyebilen patojen bir bakteridir. Ürettitis ve amnionitise neden olduğu bildirilmektedir (Fettweis *et al.* 2019). Tıpkı *Streptococcus*

parauberis'te olduğu gibi gıda bulaşıklığıyla ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. BARF'ta bulunmasının hijyen eksikliğine bağlı olduğu değerlendirilmektedir.

Streptococcus parauberis hayvancılıkta mastitis vakalarından izole edilen patojen bir bakteridir (Rambeaud *et al.* 2003). Bunun yanısıra özellikle vakumlu paketleme yapılmış deniz ürünlerinde de bulunmuştur (Susiluoto *et al.* 2005, Fernandez *et al.* 2012). Paketlenmiş marine piliç etinde de varlığı gösterilmiştir (Björkoth *et al.* 2005).

Corynebacterium imitans deri florasında izole edilmesinin yanısıra difterili hastalarda da izole edilmiştir (Funke *et al.* 1997). *Corynebacterium imitans* bakteriyofajla etkileşmesi sonucu difteri toksini üretmektedir. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda granülomatöz lenfadenopati, pnömonit, farenjit, deri enfeksiyonları ve endokardit oluşturabilmektedir. İnsan tükürük mikrobiyomunda da bulunmuştur (Riegel *et al.* 2006). Bunun dışında bakteriyemili hastalarda da tespit edildiği bildirilmiştir. Yapılan çok çalışma olmamasına rağmen ciddi sonuçlara neden olabilen insan patojenlerinden biri olarak tanımlanmıştır (Jezek *et al.* 2014). Gıda bulaşıklığına dair herhangi bir yayına rastlanmamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mevcut araştırmanın konusu insan sağlığı açısından ciddi enfeksiyonlara neden olan 3 bakteri *E. coli*, *Salmonella spp.* ve *S. aureus* ile antibiyotik direncinin taşınmasında çok önemli bir konumda bulunan *A. baumannii'*nin piyasadan toplanan 20 BARF'taki varlığı ile sağaltımda yaygın olarak kullanılan 9 antibiyotiğe karşı 15 direnç geninin bu mamalardaki varlığının tespiti ve farklı etlerden üretilen BARF'ların mikrobiyotasının araştırılmasıydı. BARF'ta farklı oranlarda olmak üzere bu 4 bakteri de tespit edildi. Kedi BARF'larında sadece *Salmonella spp.* ve *A. baumannii* saptanırken köpeklerinkinde 4'ü de mevcuttu. Kedi mamalarının sadece birinde antbiyotik direnç genleri tespit edilirken köpek mamalarının üçünde tespit yapılabildi. Tüm mamalarda en sık görülen direnç geni gyrA geniyle kodlanan siprofloksasine karşıydı. Bunun dışında amoksisilin-klavulanik asit, kinolonlar, kolistin, metisilin ve sefepime karşı da direnç geni tespit edildi.

Mikrobiyota analizlerinde endokarditis, amnionitis, artritis, meningitis ve bakteriyemiye neden olabilen bakteriler tespit edildi. Kuzu ve kuzu/sığır eti karışımı kullanılan BARF'ta insanların tükürük ve vaginasında bulunan türler daha fazlaydı. Bu durum üretim aşamasında hijyenik koşulların yeterli olmadığını gösterir niteliktedir. Paketlenmiş gıdalarda bozulmadan sorumlu Lactobacillusların fazlalığı ürünlerin raf ömrünün daha üretim aşamasından itibaren kısıtlı olduğunu göstermekteydi.

BARF'ların üretimi için malzeme olarak genellikle kesimhane artıklarının ve insan gıdası olarak tüketilmesi uygun olmayan hayvansal kökenli gıdaların kullanılması yanında üretim sırasında ısıl işlem uygulanmaması da hem bakteriyel kontaminasyonu hem de kontamine olan mamalarda bakteriyel bozulmanın önlenememesine neden olmaktadır.

Üretim koşullarının iyileştirilmesi yanında kullanılan materyallerin kalitesinin de artırılması ürün kalitesini ve raf ömrünü uzatmanın yanında zoonoz patojenlerin insanlara bulaşmasını da önleyebilecektir. Türkiye pet mama piyasasında yeni yeni satılmaya başlanan BARF mamaların üretimleri ve denetimleriyle ilgili eksiklikler bulunmaktadır. Piyasadaki tüm marka ve ürünlerinden birer örnekle yapılan bu araştırmanın tamamlandığı tarihte piyasadaki ürün sayısı ve çeşitlilik arttığı gözlenmiştir. Bu artışın

dünyaya paralel olarak devam edeceği düşünülmektedir. Sonraki çalışmalarda daha fazla örneklem ve aynı ürünün farklı serilerinin de değerlendirilmesi üretim koşulları ve standardizasyonu hakkında da bilgi sahibi olunmasını sağlayacaktır. Hayvanlar ve dolayısıyla da insanlar açısından sağlık riski oluşturabilecek mevcut patojenler yanında başka patojenlerin de tespit edilebileceği değerlendirilmektedir.

KAYNAKLAR

Ahmed, F., Cappai, M. G., Morrone, S., Cavallo, L., Berlinguer, F., Dessì, G. and Varcasia, A. 2021. Raw meat based diet (RMBD) for household pets as potential door opener to parasitic load of domestic and urban environment. Revival of understated zoonotic hazards? A review. One Health, 13: 100327.

Alkatheri, A. H., Yap, P. S. X., Abushelaibi, A., Lai, K. S., Cheng, W. H. and Erin Lim, S. H. 2023. Microbial Genomics: Innovative Targets and Mechanisms. Antibiotics, 12(2): 190.

Anderson, R. C., Armstrong, K. M., Young, W., Maclean, P., Thomas, D. G. and Bermingham, E. N. 2018. Effect of kibble and raw meat diets on peripheral blood mononuclear cell gene expression profile in dogs. The Veterinary Journal, 234: 7-10.

Andreevskaya, M., Jääskeläinen, E., Johansson, P., Ylinen, A., Paulin, L., Björkroth, J. and Auvinen, P. 2018. Food spoilage-associated Leuconostoc, Lactococcus, and Lactobacillus species display different survival strategies in response to competition. Applied and Environmental Microbiology, 84(13): e00554-18.

Anonim. 2015. World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). Global Nutrition Committee Statement on Risks of Raw Meat-Based Diets. WSAVA. Web sitesi. http://www.wsava.org/About/Postion-statement. Erişim Tarihi: 12.05.2023.

Anonim. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Web sitesi. https://www.R-project.org/. Erişim Tarihi: 11.02.2023.

Antunes, L. C., Visca, P., and Towner, K. J. 2014. Acinetobacter baumannii: evolution of a global pathogen. Pathogens and Disease, 71(3): 292-301.

Anturaniemi, J., Barrouin-Melo, S. M., Zaldivar-López, S., Sinkko, H. and Hielm-Björkman, A. 2019. Owners' perception of acquiring infections through raw pet food: a comprehensive internet-based survey. Veterinary Record, 185(21): 658-658.

Atkinson, B. A., and Lorian, V. 1984. Antimicrobial agent susceptibility patterns of bacteria in hospitals from 1971 to 1982. Journal of Clinical Microbiology, 20(4): 791-796.

Bacci, C., Vismarra, A., Dander, S., Barilli, E. and Superchi, P. 2019. Occurrence and antimicrobial profile of bacterial pathogens in former foodstuff meat products used for pet diets. Journal of Food Protection, 82(2): 316-324.

Baede, V. O., Broens, E. M., Spaninks, M. P., Timmerman, A. J., Graveland, H., Wagenaar, J. A. and Hordijk, J. 2017. Raw pet food as a risk factor for shedding of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in household cats. PLoS One, 12(11): e0187239.

Baede, V. O., Wagenaar, J. A., Broens, E. M., Duim, B., Dohmen, W., Nijsse, R. and Hordijk, J. 2015. Longitudinal study of extended-spectrum-β-lactamase-and AmpC-producing Enterobacteriaceae in household dogs. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59(6): 3117-3124.

Barber, M., and Rozwadowska-Dowzenko, M. 1948. Infection by Penicillin-Resistant Staphyloeoeci. Lancet, 64: 4.

Barza, M., and Gorbach, S. L. 2002. The Need to Improve Antimicrobial Use in Agriculture: Ecological and Human Health Consequences. A Report of the Facts about Antibiotics in Animals and the Impact on Resistance (FAAIR) Project. Clinical Infectious Diseases, 34.

Belluco, S., Mancin, M., Conficoni, D., Simonato, G., Pietrobelli, M. and Ricci, A. 2016. Investigating the determinants of Toxoplasma gondii prevalence in meat: a systematic review and meta-regression. PloS One, 11(4): e0153856.

Bent, S. J., Pierson, J. D., and Forney, L. J. 2007. Measuring species richness based on microbial community fingerprints: the emperor has no clothes. Applied and Environmental Microbiology, 73(7): 2399-2401.

Berghofer, L. K., Hocking, A. D., Miskelly, D. and Jansson, E. 2003. Microbiology of wheat and flour milling in Australia. International Journal of Food Microbiology, 85(1-2): 137-149.

Bermingham, E. N., Maclean, P., Thomas, D. G., Cave, N. J. and Young, W. 2017. Key bacterial families (Clostridiaceae, Erysipelotrichaceae and Bacteroidaceae) are related to the digestion of protein and energy in dogs. PeerJ, 5: e3019.

Björkroth, J., Ristiniemi, M., Vandamme, P. and Korkeala, H. 2005. Enterococcus species dominating in fresh modified-atmosphere-packaged, marinated broiler legs are

overgrown by Carnobacterium and Lactobacillus species during storage at 6 C. International Journal of Food Microbiology, 97(3): 267-276.

Blaettler, L., Mertz, D., Frei, R., Elzi, L., Widmer, A. F., Battegay, M. and Flückiger, U. 2009. Secular trend and risk factors for antimicrobial resistance in Escherichia coli isolates in Switzerland 1997-2007. Infection, 37: 534-539.

Bloom, B. R., and Murray, C. J. 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. Science, 257(5073): 1055-1064.

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A. and Caporaso, J. G. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nature Biotechnology, 37(8): 852-857.

Bontempo, V. 2005. Nutrition and health of dogs and cats: evolution of petfood. Veterinary Research Communications, 29: 45-50.

Bottari, B., Bancalari, E., Barera, A., Ghidini, S. and Gatti, M. 2020. Evaluating the presence of human pathogens in commercially frozen, biologically appropriate raw pet food sold in Italy. Veterinary Record, 187(7): e50-e50.

Butowski, C. F., Moon, C. D., Thomas, D. G., Young, W. and Bermingham, E. N. 2022. The effects of raw-meat diets on the gastrointestinal microbiota of the cat and dog: a review. New Zealand Veterinary Journal, 70(1): 1-9.

Butowski, C. F., Thomas, D. G., Young, W., Cave, N. J., McKenzie, C. M., Rosendale, D. I. and Bermingham, E. N. 2019. Addition of plant dietary fibre to a raw red meat high protein, high fat diet, alters the faecal bacteriome and organic acid profiles of the domestic cat (Felis catus). PloS One, 14(5): e0216072.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A. and Holmes, S. P. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nature Methods, 13(7): 581-583.

Campisciano, G., Iebba, V., Zito, G., Luppi, S., Martinelli, M., Fischer, L. and Comar, M. 2020. Lactobacillus iners and gasseri, Prevotella bivia and HPV belong to the microbiological signature negatively affecting human reproduction. Microorganisms, 9(1): 39.

Carrasco, E., Morales-Rueda, A. and García-Gimeno, R. M. 2012. Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: a review. Food Research International, 45(2): 545-556.

Carter, K. A., Fischer, M. D., Petrova, M. I. and Balkus, J. E. 2023. Epidemiologic evidence on the role of Lactobacillus iners in sexually transmitted infections and bacterial vaginosis: a series of systematic reviews and meta-analyses. Sexually Transmitted Diseases, 50(4): 224.

Chengappa, M. M., Staats, J., Oberst, R. D., Gabbert, N. H. and McVey, S. 1993. Prevalence of Salmonella in raw meat used in diets of racing greyhounds. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 5(3): 372-377.

Chlebicz, A., and Śliżewska, K. 2018. Campylobacteriosis, salmonellosis, yersiniosis, and listeriosis as zoonotic foodborne diseases: a review. International Journal of Environmental Research and Public Health, 15(5): 863.

Claesson, M. J., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J. R., Ross, R. P. and O'Toole, P. W. 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. Nucleic Acids Research, 38(22): e200-e200.

Collineau, L., Chapman, B., Bao, X., Sivapathasundaram, B., Carson, C. A., Fazil, A. and Smith, B. A. 2020. A farm-to-fork quantitative risk assessment model for Salmonella Heidelberg resistant to third-generation cephalosporins in broiler chickens in Canada. International Journal of Food Microbiology, 330: 108559.

Costa, M., and Weese, J. S. 2019. Methods and basic concepts for microbiota assessment. The Veterinary Journal, 249: 10-15.

Courts, C., Pfaffl, M. W., Sauer, E. and Parson, W. 2019. Pleading for adherence to the MIQE-Guidelines when reporting quantitative PCR data in forensic genetic research. Forensic Science International: Genetics, 42: e21-e24.

Crofton, J., and Mitchison, D. A. 1948. Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. British Medical Journal, 2(4588): 1009.

Cuny, C., Friedrich, A., Kozytska, S., Layer, F., Nübel, U., Ohlsen, K. and Witte, W. 2010. Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in different animal species. International Journal of Medical Microbiology, 300(2-3): 109-117.

Cuny, C., Layer, F., and Witte, W. 2011. Staphylococcus aureus and MRSA in thawing liquid of broiler chicken carcasses and their relation to clonal lineages from humans. In International Journal of Medical Microbiology, 301: 117-117.

Davies, R. H., Lawes, J. R., and Wales, A. D. 2019. Raw diets for dogs and cats: a review, with particular reference to microbiological hazards. Journal of Small Animal Practice, 60(6): 329-339.

De Graaff, J., Elwell, L. P., and Falkow, S. 1976. Molecular nature of two beta-lactamase-specifying plasmids isolated from Haemophilus influenzae type b. Journal of Bacteriology, 126(1): 439-446.

Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L. and Relman, D. A. 2008. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. PLoS Biology, 6(11): e280.

Dhama, K., Rajagunalan, S., Chakraborty, S., Verma, A. K., Kumar, A., Tiwari, R. and Kapoor, S. 2013. Food-borne pathogens of animal origin-diagnosis, prevention, control and their zoonotic significance: a review. Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS, 16(20): 1076-1085.

Diakite, A., Dubourg, G., Dione, N., Afouda, P., Bellali, S., Ngom, I. I. and Raoult, D. (2020). Optimization and standardization of the culturomics technique for human microbiome exploration. Sci. Rep. 10: 9674.

Dillitzer, N., Becker, N., and Kienzle, E. 2011. Intake of minerals, trace elements and vitamins in bone and raw food rations in adult dogs. British Journal of Nutrition, 106: 53-56.

Dodd, S., Cave, N., Abood, S., Shoveller, A. K., Adolphe, J. and Verbrugghe, A. 2020. An observational study of pet feeding practices and how these have changed between 2008 and 2018. Veterinary Record, 186(19): 643-643.

Dressman, J. B. (1986). Comparison of canine and human gastrointestinal physiology. Pharmaceutical Research, 3: 123-131.

Dróżdż, M., Małaszczuk, M., Paluch, E., and Pawlak, A. 2021. Zoonotic potential and prevalence of Salmonella serovars isolated from pets. Infection Ecology & Epidemiology, 11(1): 1975530.

Dzanis, D. A. 2009. Regulation of pet foods in the United States. Compendium, 31(7): 324-328.

Elwell, L. P., Roberts, M., Mayer, L. W., and Falkow, S. 1977. Plasmid-mediated beta-lactamase production in Neisseria gonorrhoeae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 11(3): 528-533.

Fazili, T., Riddell, S., Kiska, D., Endy, T., Giurgea, L., Sharngoe, C. and Javaid, W. 2017. Streptococcus anginosus group bacterial infections. The American Journal of the Medical Sciences, 354(3): 257-261.

Ferrari, R. G., Rosario, D. K., Cunha-Neto, A., Mano, S. B., Figueiredo, E. E. and Conte-Junior, C. A. 2019. Worldwide epidemiology of Salmonella serovars in animal-based foods: a meta-analysis. Applied and Environmental Microbiology, 85(14): e00591-19.

Fettweis, J. M., Serrano, M. G., Brooks, J. P., Edwards, D. J., Girerd, P. H., Parikh, H. I. and Buck, G. A. 2019. The vaginal microbiome and preterm birth. Nature Medicine, 25(6): 1012-1021.

Finke, M. D. 1991. Evaluation of the energy requirements of adult kennel dogs. The Journal of Nutrition, 121: 22-28.

Finley, R., Ribble, C., Aramini, J., Vandermeer, M., Popa, M., Litman, M. and Reid-Smith, R. 2007. The risk of salmonellae shedding by dogs fed Salmonella-contaminated commercial raw food diets. The Canadian Veterinary Journal, 48(1): 69.

Fitzgerald, J. R. 2012. Livestock-associated Staphylococcus aureus: origin, evolution and public health threat. Trends in Microbiology, 20(4): 192-198.

Fredriksson-Ahomaa, M., Korte, T., and Korkeala, H. 2001. Transmission of Yersinia enterocolitica 4/O: 3 to pets via contaminated pork. Letters in Applied Microbiology, 32(6): 375-378.

Freeman, L. M. and Michel, K. E. 2001. Evaluation of raw food diets for dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association 218: 705- 709.

Freeman, L. M., Chandler, M. L., Hamper, B. A. and Weeth, L. P. 2013. Current knowledge about the risks and benefits of raw meat–based diets for dogs and cats. Journal of the American Veterinary Medical Association, 243(11): 1549-1558.

Funke, G., Efstratiou, A., Kuklinska, D., Hutson, R. A., De Zoysa, A., Engler, K. H. and Collins, M. D. 1997. Corynebacterium imitans sp. nov. isolated from patients with suspected diphtheria. Journal of Clinical Microbiology, 35(8): 1978-1983.

Gajdács, M. 2019. The continuing threat of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antibiotics, 8(2): 52.

Gans, J., Wolinsky, M., and Dunbar, J. 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. Science, 309(5739): 1387-1390.

Hamper, B. A., Bartges, J. W., and Kirk, C. A. 2017. Evaluation of two raw diets vs a commercial cooked diet on feline growth. Journal of Feline Medicine and Surgery, 19(4): 424-434.

Hiney, K., Sypniewski, L., Rudra, P., Pezeshki, A. and McFarlane, D. 2021. Clinical health markers in dogs fed raw meat-based or commercial extruded kibble diets. Journal of Animal Science, 99(6): 133.

Holst, E. 1990. Reservoir of four organisms associated with bacterial vaginosis suggests lack of sexual transmission. Journal of Clinical Microbiology, 28(9): 2035-2039.

Hou, K., Wu, Z. X., Chen, X. Y., Wang, J. Q., Zhang, D., Xiao, C. and Chen, Z. S. 2022. Microbiota in health and diseases. Signal Transduction and Targeted Therapy, 7(1): 135.

Houttu, N., Mokkala, K., Saleem, W. T., Virtanen, S., Juhila, J., Koivuniemi, E. and Laitinen, K. 2022. Potential pathobionts in vaginal microbiota are affected by fish oil and/or probiotics intervention in overweight and obese pregnant women. Biomedicine & Pharmacotherapy, 149: 112841.

Iseman, M. D. 1993. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis. New England Journal of Medicine, 329(11): 784-791.

Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., De Pinna, E., Nair, S. and Weill, F. X. 2014. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the white–Kauffmann–Le minor scheme. Research in Microbiology, 165(7): 526-530.

Janssens, L., Verhaert, L., Berkowic, D. and Adriaens, D. 2016. A standardized framework for examination of oral lesions in wolf skulls (Carnivora: Canidae: Canis lupus). Journal of Mammalogy, 97(4): 1111-1124.

Jones, E. L., Kramer, A., Gaither, M. and Gerba, C. P. 2007. Role of fomite contamination during an outbreak of norovirus on houseboats. International Journal of Environmental Health Research, 17(2): 123-131.

Jones, E. L., Kramer, A., Gaither, M. and Gerba, C. P. 2007. Role of fomite contamination during an outbreak of norovirus on houseboats. International Journal of Environmental Health Research, 17(2): 123-131.

Jones, F. T. 2011. A review of practical Salmonella control measures in animal feed. Journal of Applied Poultry Research, 20(1): 102-113.

Kim, J., An, J. U., Kim, W., Lee, S. and Cho, S. 2017. Differences in the gut microbiota of dogs (Canis lupus familiaris) fed a natural diet or a commercial feed revealed by the Illumina MiSeq platform. Gut Pathogens, 9: 1-11.

Kim, S. A., Park, S. H., Lee, S. I., Owens, C. M. and Ricke, S. C. 2017. Assessment of chicken carcass microbiome responses during processing in the presence of commercial antimicrobials using a next generation sequencing approach. Scientific Reports, 7.

Klymus, K. E., Merkes, C. M., Allison, M. J., Goldberg, C. S., Helbing, C. C., Hunter, M. E. and Richter, C. A. 2020. Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. Environmental DNA, 2(3): 271-282.

Kölle, P., and Schmidt, M. 2015. Raw-meat-based diets (RMBD) as a feeding principle for dogs. Tierarztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere, 43(6): 409-19.

Kralik, P., and Ricchi, M. 2017. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. Frontiers in Microbiology, 8: 108.

Kronvall, G. 2010. Antimicrobial resistance 1979-2009 at Karolinska hospital, Sweden: normalized resistance interpretation during a 30-year follow-up on Staphylococcus aureus and Escherichia coli resistance development. Apmis, 118(9): 621-639.

Kruskal, W. H., and Wallis, W. A. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. Journal of the American Statistical Association, 47(260): 583-621.

Kwong, W. K., and Moran, N. A. 2016. Gut microbial communities of social bees. Nature Reviews Microbiology, 14(6): 374-384.

Laflamme, D. P., Abood, S. K., Fascetti, A. J., Fleeman, L. M., Freeman, L. M., Michel, K. E. and Willoughby, K. N. 2008. Pet feeding practices of dog and cat owners in the United States and Australia. Journal of the American Veterinary Medical Association, 232(5): 687-694.

Lagier, J. C., Dubourg, G., Million, M., Cadoret, F., Bilen, M., Fenollar, F. and Raoult, D. 2018. Culturing the human microbiota and culturomics. Nature Reviews Microbiology, 16(9): 540-550.

Lambertini, E., Buchanan, R. L., Narrod, C. and Pradhan, A. K. 2016. Transmission of bacterial zoonotic pathogens between pets and humans: The role of pet food. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56(3): 364-418.

Lazarevic, V., Whiteson, K., Huse, S., Hernandez, D., Farinelli, L., Østerås, M. and François, P. 2009. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. Journal of Microbiological Methods, 79(3): 266-271.

Lee, C. R., Cho, I. H., Jeong, B. C. and Lee, S. H. 2013. Strategies to minimize antibiotic resistance. International Journal of Environmental Research and Public Health, 10(9): 4274-4305.

Lefebvre, S. L., Reid-Smith, R., Boerlin, P. and Weese, J. S. 2008. Evaluation of the risks of shedding Salmonellae and other potential pathogens by therapy dogs fed raw diets in Ontario and Alberta. Zoonoses and Public Health, 55(8-10): 470-480.

Leonard, E. K., Pearl, D. L., Janecko, N., Finley, R. L., Reid-Smith, R. J., Weese, J. S. and Peregrine, A. S. 2015. Risk factors for carriage of antimicrobial-resistant Salmonella spp and Escherichia coli in pet dogs from volunteer households in Ontario, Canada, in 2005 and 2006. American Journal of Veterinary Research, 76(11): 959-968.

Levy, S. 1982. Microbial resistance to antibiotics: an evolving and persistent problem. The Lancet, 320(8289): 83-88.

Li, X., Bethune, L. A., Jia, Y., Lovell, R. A., Proescholdt, T. A., Benz, S. A. and McChesney, D. G. 2012. Surveillance of Salmonella prevalence in animal feeds and characterization of the Salmonella isolates by serotyping and antimicrobial susceptibility. Foodborne Pathogens and Disease, 9(8): 692-698.

Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology, 15(12): 1-21.

Lumbis, R., and Chan, D. L. 2015. The raw deal: clarifying the nutritional and public health issues regarding raw meat-based diets. The Veterinary Nurse, 6(6): 336-341.

Magallanes López, A. M., and Simsek, S. 2021. Pathogens control on wheat and wheat flour: A review. Cereal Chemistry, 98(1): 17-30.

Magid, E., Zakiev, A., Tsoy, T., Lavrenov, R. and Rizvanov, A. 2021. Automating pandemic mitigation. Advanced Robotics, 35(9): 572-589.

Mangla, D., Sharma, A., and Ikram, S. 2022. Critical review on adsorptive removal of antibiotics: Present situation, challenges and future perspective. Journal of Hazardous Materials, 425: 127946.

Masella, A. P., Bartram, A. K., Truszkowski, J. M., Brown, D. G. and Neufeld, J. D. 2012. PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. BMC bioinformatics, 13: 1-7.

McKenzie, B. 2019. Debating raw diets. Vet. Pract. News, 30: 31.

McKenzie, E., Riehl, J., Banse, H., Kass, P. H., Nelson, Jr, S. and Marks, S. L. 2010. Prevalence of diarrhea and enteropathogens in racing sled dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine, 24(1): 97-103.

McMurdie, P. J., and Holmes, S. 2013. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. PloS One, 8(4): e61217.

Mehlenbacher, S., Churchill, J., Olsen, K. E. and Bender, J. B. 2012. Availability, brands, labelling and Salmonella contamination of raw pet food in the Minneapolis/St. Paul area. Zoonoses and Public Health, 59(7): 513-520.

Morelli, G., Bastianello, S., Catellani, P. and Ricci, R. 2019. Raw meat-based diets for dogs: survey of owners' motivations, attitudes and practices. BMC Veterinary Research, 15: 1-10.

Morgan, S. K., Willis, S. and Shepherd, M. L. 2017. Survey of owner motivations and veterinary input of owners feeding diets containing raw animal products. PeerJ, 5: e3031.

Morley, P. S., Strohmeyer, R. A., Tankson, J. D., Hyatt, D. R., Dargatz, D. A. and Fedorka-Cray, P. J. 2006. Evaluation of the association between feeding raw meat and Salmonella enterica infections at a Greyhound breeding facility. Journal of the American Veterinary Medical Association, 228(10): 1524-1532.

Mouhanna, A., and Csivincsik, Á. 2020. One Health approach to companion carnivores with special regard to raw-feeding. Acta Agraria Kaposváriensis, 24(2): 75-88.

Mshana, S. E., Sindato, C., Matee, M. I. and Mboera, L. E. 2021. Antimicrobial use and resistance in agriculture and food production systems in Africa: a systematic review. Antibiotics, 10(8): 976.

Nemser, S. M., Doran, T., Grabenstein, M., McConnell, T., McGrath, T., Pamboukian, R. and Reimschuessel, R. 2014. Investigation of Listeria, Salmonella, and toxigenic Escherichia coli in various pet foods. Foodborne Pathogens and Disease, 11(9): 706-709.

Nilsson, O. 2015. Hygiene quality and presence of ESBL-producing Escherichia coli in raw food diets for dogs. Infection Ecology & Epidemiology, 5(1): 28758.

O'Halloran, C., Ioannidi, O., Reed, N., Murtagh, K., Dettemering, E., Van Poucke, S. and Gunn-Moore, D. 2019. Tuberculosis due to Mycobacterium bovis in pet cats associated with feeding a commercial raw food diet. Journal of Feline Medicine and Surgery, 21(8): 667-681.

Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R. and Stahl, D. A. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. Annual Reviews in Microbiology, 40(1): 337-365.

Overgaauw, P. A., Vinke, C. M., van Hagen, M. A. and Lipman, L. J. 2020. A one health perspective on the human–companion animal relationship with emphasis on zoonotic aspects. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(11): 3789.

Palmer Jr, R. J., Diaz, P. I., and Kolenbrander, P. E. 2006. Rapid succession within the Veillonella population of a developing human oral biofilm in situ. Journal of Bacteriology, 188(11): 4117-4124.

Parr, J. M., and Remillard, R. L. 2014. Handling alternative dietary requests from pet owners. Veterinary Clinics: Small Animal Practice, 44(4): 667-688.

Patzi-Vargas, S., Zaidi, M. B., Perez-Martinez, I., León–Cen, M., Michel-Ayala, A., Chaussabel, D. and Estrada-Garcia, T. 2015. Diarrheagenic Escherichia coli carrying supplementary virulence genes are an important cause of moderate to severe diarrhoeal disease in Mexico. PLoS Neglected Tropical Diseases, 9(3): e0003510.

Petrova, M. I., Reid, G., Vaneechoutte, M. and Lebeer, S. 2017. Lactobacillus iners: friend or foe?. Trends in Microbiology, 25(3): 182-191.

Piddock, L. J. 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994:1998. Drugs, 58: 11-18.

Pitino, M. A., Unger, S., Gill, A., McGeer, A. J., Doyen, A., Pouliot, Y. and O'Connor, D. L. 2022. High pressure processing inactivates human cytomegalovirus and hepatitis A virus while preserving macronutrients and native lactoferrin in human milk. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 75: 102891.

Popoff, M. Y., Bockemühl, J. and Gheesling, L. L. 2004. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann–White scheme. Research in Microbiology, 155(7): 568-570.

Pybus, V., and Onderdonk, A. B. 1997. Evidence for a commensal, symbiotic relationship between Gardnerella vaginalis and Prevotella bivia involving ammonia: potential significance for bacterial vaginosis. Journal of Infectious Diseases, 175(2): 406-413.

Rambeaud, M., Almeida, R. A., Pighetti, G. M. and Oliver, S. P. 2003. Dynamics of leukocytes and cytokines during experimentally induced Streptococcus uberis mastitis. Veterinary Immunology and Immunopathology, 96(3-4): 193-205.

Rashmi, S., Chaman, L. S. and Bhuvneshwar, K. 2005. Antibacterial resistance: current problems and possible solutions. Indian J. Med. Sci., 59: 120-9.

Reimschuessel, R., Grabenstein, M., Guag, J., Nemser, S. M., Song, K., Qiu, J. and Okwumabua, O. 2017. Multilaboratory survey to evaluate Salmonella prevalence in diarrheic and nondiarrheic dogs and cats in the United States between 2012 and 2014. Journal of Clinical Microbiology, 55(5): 1350-1368.

Rendueles, E., Omer, M. K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R. and Prieto, M. 2011. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. LWT-Food Science and Technology, 44(5): 1251-1260.

Resch, G., François, P., Morisset, D., Stojanov, M., Bonetti, E. J., Schrenzel, J. and Moreillon, P. 2013. Human-to-bovine jump of Staphylococcus aureus CC8 is associated with the loss of a β-hemolysin converting prophage and the acquisition of a new staphylococcal cassette chromosome. PloS One, 8(3): e58187.

Riegel, P., Creti, R., Mattei, R., Nieri, A. and von Hunolstein, C. 2006. Isolation of Corynebacterium tuscaniae sp. nov. from blood cultures of a patient with endocarditis. Journal of Clinical Microbiology, 44(2): 307-312.

Romandini, A., Pani, A., Schenardi, P. A., Pattarino, G. A. C., De Giacomo, C. and Scaglione, F. 2021. Antibiotic resistance in pediatric infections: global emerging threats, predicting the near future. Antibiotics, 10(4): 393.

Roslund, M. I., Puhakka, R., Nurminen, N., Oikarinen, S., Siter, N., Grönroos, M. and Vari, H. K. 2021. Long-term biodiversity intervention shapes health-associated commensal microbiota among urban day-care children. Environment International, 157: 106811.

Runesvärd, E., Wikström, C., Fernström, L. L. and Hansson, I. 2020. Presence of pathogenic bacteria in faeces from dogs fed raw meat-based diets or dry kibble. Veterinary Record, 187(9): e71-e71.

Ruoff, K. L. 1988. Streptococcus anginosus (" Streptococcus milleri"): the unrecognized pathogen. Clinical Microbiology Reviews, 1(1): 102-108.

Sakala, R. M., Hayashidani, H., Kato, Y., Kaneuchi, C. and Ogawa, M. 2002. Isolation and characterization of Lactococcus piscium strains from vacuum-packaged refrigerated beef. Journal of Applied Microbiology, 92(1): 173-179.

Sandri, M., Dal Monego, S., Conte, G., Sgorlon, S. and Stefanon, B. 2016. Raw meat based diet influences faecal microbiome and end products of fermentation in healthy dogs. BMC Veterinary Research, 13(1): 1-11.

Santos, E. C. C. D., Castro, V. S., Cunha-Neto, A., Santos, L. F. D., Vallim, D. C., Lisboa, R. D. C. and Figueiredo, E. 2018. Escherichia coli O26 and O113: H21 on carcasses and beef from a slaughterhouse located in Mato Grosso, Brazil. Foodborne Pathogens and Disease, 15(10): 653-659.

Schlesinger, D. P., and Joffe, D. J. 2011. Raw food diets in companion animals: a critical review. The Canadian Veterinary Journal, 52(1): 50.

Schloss, P. D. 2021. Amplicon sequence variants artificially split bacterial genomes into separate clusters. Msphere, 6(4): e00191-21.

Schmidt, V. M., Pinchbeck, G. L., Nuttall, T., McEwan, N., Dawson, S. and Williams, N. J. 2015. Antimicrobial resistance risk factors and characterisation of faecal E. coli isolated from healthy Labrador retrievers in the United Kingdom. Preventive Veterinary Medicine, 119(1-2): 31-40.

Schwebke, J. R., Muzny, C. A. and Josey, W. E. 2014. Role of Gardnerella vaginalis in the pathogenesis of bacterial vaginosis: a conceptual model. The Journal of Infectious Diseases, 210(3): 338-343.

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S. and Huttenhower, C. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome Biology, 12: 1-18.

Selmi, M., Stefanelli, S., Bilei, S., Tolli, R., Bertolotti, L., Marconi, P. and Pagani, A. 2011. Contaminated commercial dehydrated food as source of multiple Salmonella serotypes outbreak in a municipal kennel in Tuscany. Vet. Ital., 47(2): 183-190.

Sévellec, Y., Granier, S. A., Le Hello, S., Weill, F. X., Guillier, L., Mistou, M. Y. and Cadel-Six, S. 2020. Source attribution study of sporadic Salmonella Derby cases in France. Frontiers in Microbiology: 11, 889.

Shah, D. H., Paul, N. C., Sischo, W. C., Crespo, R. and Guard, J. 2017. Population dynamics and antimicrobial resistance of the most prevalent poultry-associated Salmonella serotypes. Poultry Science, 96(3): 687-702.

Shao, L., Chen, S., Wang, H., Zhang, J., Xu, X. and Wang, H. 2021. Advances in understanding the predominance, phenotypes, and mechanisms of bacteria related to meat spoilage. Trends in Food Science & Technology, 118: 822-832.

Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Welch, D. M., Huse, S. M., Neal, P. R. and Herndl, G. J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(32): 12115-12120.

Songer, J. G., Trinh, H. T., Killgore, G. E., Thompson, A. D., McDonald, L. C. and Limbago, B. M. 2009. Clostridium difficile in retail meat products, USA, 2007. Emerging Infectious Diseases, 15(5): 819.

Suchodolski, J. S. 2022. Analysis of the gut microbiome in dogs and cats. Veterinary Clinical Pathology, 50: 6-17.

Sung, J. M. L., Lloyd, D. H. and Lindsay, J. A. 2008. Staphylococcus aureus host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. Microbiology, 154(7): 1949-1959.

Susiluoto, T., Korkeala, H. and Björkroth, K. J. 2003. Leuconostoc gasicomitatum is the dominating lactic acid bacterium in retail modified-atmosphere-packaged marinated broiler meat strips on sell-by-day. International Journal of Food Microbiology, 80(1): 89-97.

Tadesse, D. A., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M. J. and McDermott, P. F. 2012. Antimicrobial drug resistance in Escherichia coli from humans and food animals, United States, 1950-2002. Emerging Infectious Diseases, 18(5): 741.

Terán, B. G., Roiz, M. P., Jimeno, T. R., Rosas, J. and Calvo-Alen, J. 2001. Acute bacterial arthritis caused by group C streptococci. In Seminars in arthritis and rheumatism 31(1): 43-51.

Tohno, M., Kitahara, M., Matsuyama, S., Kimura, K., Ohkuma, M. and Tajima, K. 2014. Aerococcus vaginalis sp. nov., isolated from the vaginal mucosa of a beef cow, and emended descriptions of Aerococcus suis, Aerococcus viridans, Aerococcus urinaeequi, Aerococcus urinaehominis, Aerococcus urinae, Aerococcus christensenii and Aerococcus sanguinicola. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64(4): 1229-1236.

Uddin, B. M. M., Yusuf, M. A. and Ratan, Z. A. 2017. A review of superbug: A global threat in health care system. Bangladesh Journal of Infectious Diseases, 4(1): 25-28.

van Bree, F. P., Bokken, G. C., Mineur, R., Franssen, F., Opsteegh, M., van der Giessen, J. W. and Overgaauw, P. A. 2018. Zoonotic bacteria and parasites found in raw meat-based diets for cats and dogs. Veterinary Record, 182(2): 50-50.

Vossenkuhl, B., Brandt, J., Fetsch, A., Käsbohrer, A., Kraushaar, B., Alt, K. and Tenhagen, B. A. 2014. Comparison of spa types, SCC mec types and antimicrobial resistance profiles of MRSA isolated from turkeys at farm, slaughter and from retail meat indicates transmission along the production chain. PloS One, 9(5): e96308.

Wales, A., Lawes, J. and Davies, R. 2019. How to… Advise clients about raw feeding dogs and cats. BSAVA Companion, 2019(8): 10-15.

Walsh, F. M., and Amyes, S. G. 2004. Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens. Current Opinion in Microbiology, 7(5): 439-444.

Wang, Y. J., J. Deering, A. and Kim, H. J. 2021. Effects of plant age and root damage on internalization of shiga toxin-Producing Escherichia coli in leafy vegetables and herbs. Horticulturae, 7(4): 68.

Waters, A. 2017. Raw diets: are we at a turning point?. The Veterinary Record, 181(15): 384.

Wedley, A. L., Dawson, S., Maddox, T. W., Coyne, K. P., Pinchbeck, G. L., Clegg, P. and Williams, N. J. 2017. Carriage of antimicrobial resistant Escherichia coli in dogs: Prevalence, associated risk factors and molecular characteristics. Veterinary Microbiology, 199: 23-30.

Weese, J. S., Rousseau, J. and Arroyo, L. 2005. Bacteriological evaluation of commercial canine and feline raw diets. The Canadian Veterinary Journal, 46(6): 513.

Weinstock, G. M. 2012. Genomic approaches to studying the human microbiota. Nature, 489(7415): 250-256.

Werner, J. J., Koren, O., Hugenholtz, P., DeSantis, T. Z., Walters, W. A., Caporaso, J. G. and Ley, R. E. 2012. Impact of training sets on classification of high-throughput bacterial 16s rRNA gene surveys. The ISME Journal, 6(1): 94-103.

Williams, A. M., Fryer, J. L. and Collins, M. D. 1990. Lactococcus piscium sp. nov. a new Lactococcus species from salmonid fish. FEMS Microbiology Letters, 68(1-2): 109-113.

Woo, P. C., Tse, H., Chan, K. M., Lau, S. K., Fung, A. M., Yip, K. T. and Yuen, K. Y. 2004. "streptococcus milleri" endocarditis caused by S treptococcus anginosus. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 48(2): 81-88.

Yarbrough, V. L., Winkle, S. and Herbst-Kralovetz, M. M. 2015. Antimicrobial peptides in the female reproductive tract: a critical component of the mucosal immune barrier with physiological and clinical implications. Human Reproduction Update, 21(3): 353-377.

Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T. and Hossain, N. 2017. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. Cureus, 9(6).

Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M. and Neužil, P. 2020. PCR past, present and future. Biotechniques, 69(4): 317-325.

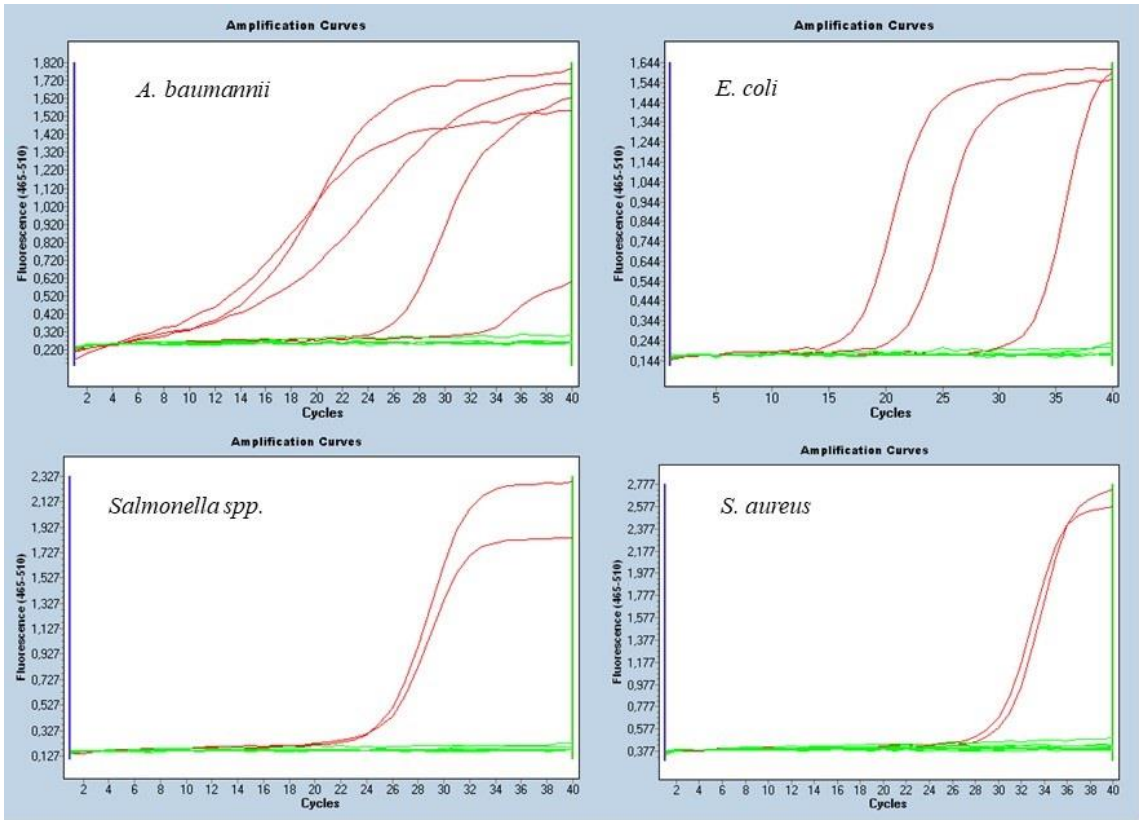
Zicker, S. C. 2008. Evaluating pet foods: how confident are you when you recommend a commercial pet food?. Topics in companion animal medicine, 23(3): 121-126.

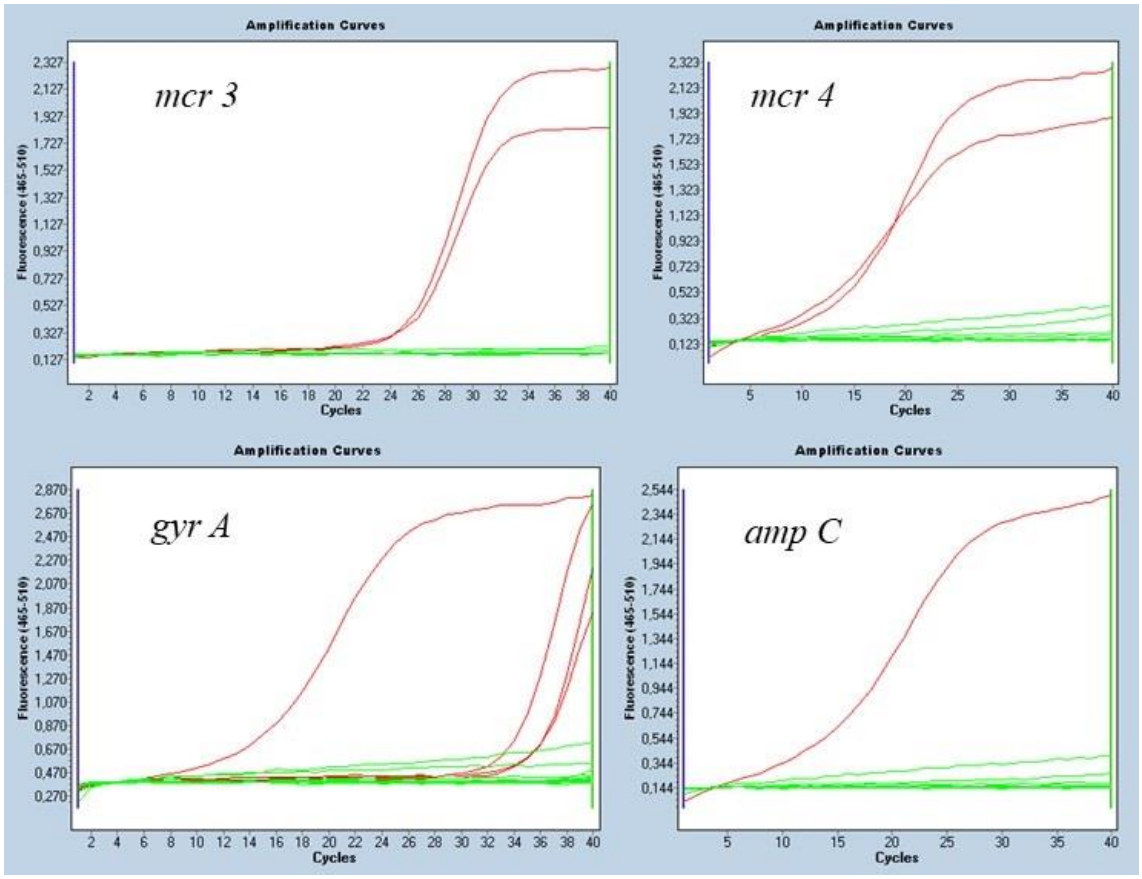
Zinger, L., Bonin, A., Alsos, I. G., Bálint, M., Bik, H., Boyer, F. and Taberlet, P. 2019. DNA metabarcoding-Need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. Molecular Ecology, 28(8): 1857-1862.

EKLER

EK 1. RT-PCR grafikleri

EK 1. RT-PCR grafikleri





ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Gulan A. Zainalabideen ZAINALABIDEEN

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2021-2023
Lisans	Tikrit Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi Biyoloji/Mikrobiyoloji Bölümü	1998-2003