



Detection of *Clostridium perfringens* Contamination in Retail Minced Beef and Poultry Meat Retailed in Afyon*

Şebnem PAMUK¹, Gözde ÇELİKELOĞLU²

¹ Food Hygiene and Technology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar-TURKEY

² Food Engineer in a Private Company, Afyonkarahisar-TURKEY

Summary: The aim of the present study was to determine the prevalence and contamination level of *Clostridium perfringens* (*Cl. perfringens*) in minced poultry and beef sold at retail in Afyon. The contamination level of *Cl. perfringens* was detected by Most Probable Number (MPN) method. A total of 100 samples, consisting of 50 raw minced poultry meat, and 50 minced beef were collected from various retail stores and butchers. Our results demonstrated that 61 of 100 samples (61%) were contaminated with between 3.0 and 20.0 MPN/g *Cl. perfringens*. Thirty four of 50 minced beef samples (68%) and 27 out of 50 minced poultry meat samples (54%) were found to be contaminated with *Cl. perfringens*. Mean contamination level for minced beef and poultry meat samples were 4.9 MPN/g and 3.5 MPN/g, respectively. In our study, it was determined that the increase in air temperature results in increase in *Cl. perfringens* prevalence and contamination level of the samples collected from were higher than those collected from supermarket.

Key Words: Beef, *Clostridium perfringens*, poultry meat

Afyon'da Satışa Sunulan Sığır ve Tavuk Kıymalarında *Clostridium perfringens* Kontaminasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Özet: Bu çalışmada, Afyon'da süpermarket ve kasaplarda satışa sunulan tavuk ve sığır eti kıymalarında *Clostridium perfringens*'in (*Cl. perfringens*) prevalansı ve kontaminasyon düzeyinin belirlenmesi amaçlandı. Kontaminasyon düzeyi EMS (En Muhtemel Sayı) yöntemi ile belirlendi. Farklı kasap ve satış yerlerinden toplam 100 örnek (50 tavuk kıyma; 50 sığır kıyma) toplandı. Çalışmanın sonuçları 100 örneğin 61'inin (%61) 3.0-20.0 EMS/g düzeyleri arasında kontamine olduğunu gösterdi. Sığır kıyma örneklerinin 34'ü (%68), tavuk kıyma örneklerinin ise 27'si (%54) *Cl. perfringens* ile kontamine bulundu. Sığır kıyma ve tavuk kıyma örneklerinin sırasıyla ortalama 4.9 EMS/g ve 3.5 EMS/g düzeylerinde kontamine olduğu belirlendi. Artan hava sıcaklığına bağlı olarak prevalansın ve kontaminasyon düzeyinde arttığı, kasaplardan toplanan örneklerin, süpermarketlerden toplananlara göre daha kontamine olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Clostridium perfringens*, kanatlı eti, sığır eti

Introduction

Clostridium perfringens is a gram-positive, non-motil, rod, sporulated and is a widely distributed bacteria in the environment and normal intestinal flora of humans and animals. Since the first large-scale outbreaks of food poisoning associated with this organism reported by Knox and MacDonald in 1943 (21), the organism has been responsible for foodborne poisoning in the

industrialized world (36). The organism is a major cause of human foodborne disease, and an important pathogen of human gastrointestinal (GI) tract diseases such as food poisoning, antibiotic-associated diarrhea, and sporadic diarrhea as well as nosocomial diarrheal disease outbreaks (27, 28). Most pathogenic *Clostridium* species are known to produce toxins, which are responsible for a wide range of diseases (17). An estimated 9.4 million cases of foodborne disease occur each year in the United States and 1 million (10%) of these cases have been found to be the result of *Cl. perfringens* poisoning (36). Deaths from *Cl. perfringens* type A food poisoning are not common but do occur in the elderly and debilitated. Per year this food poisoning is

Geliş Tarihi/Submission Date : 15.11.2013

Kabul Tarihi/Accepted Date : 09.04.2014

* This manuscript was prepared from a master degree thesis and was supported by the Afyon Kocatepe University Research Fund (BAP/VF-10-11).

estimated to kill seven people in the United States and between 50 and 100 people in the United Kingdom (1, 30).

Foodborne illness as occur after the ingestion of food contaminated with a large number (10^6 – 10^7 cells/g) of type A viable vegetative *Cl. perfringens* cells. *Cl. perfringens* enterotoxin (CPE) are produced during *in vivo* sporulation, which usually occurs in the small intestine and is stimulated by acid conditions (5, 29). Approximately 8 to 12 h after eating the contaminated food, the symptoms start with acute abdominal pain, nausea and diarrhea. The contaminated food is almost always heat-treated, which kills competing flora, while the *Cl. perfringens* spores survive and germinate (6, 20). This organism has two main characteristics that contribute to its ability to cause foodborne diseases. Firstly, its low generation time (reportedly <10 min for vegetative cells) allows *Cl. perfringens* to quickly multiply in foods (28, 38), and secondly its relatively higher heat tolerance enhances its ability to survive in undercooked foods. Generally, *Cl. perfringens* is a difficult target bacterium for microbial source tracking because it is so broadly distributed in the environment (18, 34). However, only a small proportion of isolates of this bacterium can produce toxins specific for human and animal gastrointestinal diseases (7, 19, 23). Type A strains have been found in 5% of human fecal samples or environmental sources such as nonoutbreak retail foods (26, 31, 42).

All *Cl. perfringens* food poisoning outbreaks have been caused by strains type (A) for which meat is an excellent growth medium (3). *Cl. perfringens* requires more than a dozen amino acids and several vitamins for its growth, both of which are typically present in meat. Recent Central for Diseases Control and Prevention (CDC) statistics indicate that the leading food vehicles for this bacterium in the United States are meats, notably beef and poultry, and meat-containing products, such as gravies, stews, and Mexican food (24, 28).

The aim of the present study was to determine the prevalence and contamination level of *Cl. perfringens* in minced poultry and beef sold at retail markets.

Material and Methods

Collection of food samples

Fifty raw minced poultry and 50 minced beef samples were purchased from different butchers and supermarkets in Afyon between April and July 2011. Total of 100 samples (33 from butchers

and 67 from supermarkets) (Table 2). All of minced poultry meat were obtained from poultry breast meat and all of minced meat were obtained from lobes meat. The samples were taken aseptically and transported to the laboratory in refrigerated containers and tested within 1-2 h of sampling. The Most Probable Number (MPN) counts of *Cl. perfringens* were estimated according to the MPN table (13).

Determination of the MPN of *Cl. perfringens* bacteria per gram in samples

The techniques described by Labbe (1989), Baumgart et al. (1990), and Schalch et al. (1996) (4, 22, 37) were used to isolate and identify *Cl. perfringens*. The contamination level of analyzed samples with *Cl. perfringens* was determined by the MPN (Most Probable Number) technique (22). For enrichment and MPN-determination (3 tubes) of *Cl. perfringens*, a 25-g portion of each sample was aseptically placed in a sterile plastic bag containing 225 ml of Perfringens Enrichment Medium [(PEM; Fluid Thioglycollate Medium, supplemented with Perfringens (TSC) supplement, Oxoid SR 88, Oxoid, UK)] and homogenized by a stomacher (Colworth Stomacher 400, UK) for approximately 2 min. Ten milliliters of these homogenates were transferred into 3 tubes, and 1 and 0.1 ml each of these homogenates were also added to 3 tubes containing 9 and 10 ml of PEM broth, respectively. The tubes were overlaid with sterile melted paraffin to create an anaerobic environment and then incubated at 46°C for 20 h without agitation. After the samples were enriched in PEM, one loopful from each tube that produced gas and turbidity was streaked onto Tryptose Sulphite Cycloserine agar (TSC agar, Oxoid CM 857, Oxoid, UK) and the plates were further incubated at 46°C for 20 h in a Gas Pak system (Gas generating kit, B 36, Oxoid) anaerobically. In order to confirm the isolates, up to 5 suspect black colonies from each positive TSC agar plate were purified and identified biochemically by using catalase test, lactose fermentation, gelatinase production, nitrate reduction, motility test, acid phosphatase reaction, haemolysis test and the reverse CAMP-test.

Statistical Analysis

Chi square test was used to evaluate the results.

Results

Of the 100 samples tested, 61 (61%) were found to be contaminated with *Cl. perfringens* and a total of 61 strains were isolated (Table 1). All samples showed *Cl. perfringens* contamination rates ranging from 68% (beef) to 54% (minced poultry meat) (Table 1). Most of the samples surveyed in this study had very high MPN per-gram values higher than 3 (average 4.9 MPN/g) (Table 1). The samples were found to be contaminated with *Cl. perfringens* between the levels of 3.0 and 20.0 MPN/g. In this study, minced beef and poltry meat samples were found to be contaminated with *Cl. perfringens* at average of 4.9 MPN/g and 3.5 MPN/g, respectively.

According to the results, the contamination level of the samples collected from butchers found to be

higher than that collected from the supermarkets. It has been observed that butchers are more unfavorable in terms of hygienic conditions and rules. Prevalance of *Cl. perfringens* in different sampling places are summerized in Table 2. With an increase in air temperature, *Cl. perfringens* was seen to increase in prevalence and contamination level. Prevalence of *Cl. perfringens* increased steadily from April to July as seen in Table 3.

Discussion

Various results are reported concerning the presence of *Cl. perfringens* in food, human feces, and the environment (7, 19, 23, 26, 31, 42). Meat and poultry products have been implicated in numerous outbreaks of foodborne disease associated with the organism (14). It is prevalent in

Table 1. Incidence of *Cl. perfringens* in different samples.

Food	No. of samples examined	No. (%) of samples contaminated with <i>Cl. perfringens</i>	MPN/g average range
Minced beef	50	34 (68%)	4.9-20
Minced poultry meat	50	27 (54%)	3.5-20
Total	100	61 (61%)	4.2

Table 2. Prevalance of *Cl. Perfringens* in different sampling places.

		<i>Cl. perfringens</i>		Total	Value of p
		(+)	(-)		
Butcher	(n)	21	12	33	0.704
	(%)	63.6	36.4	100	
Supermarket	(n)	40	27	67	
	(%)	59.7	40.3	100	
Total	(n)	61	39	100	
	(%)	61.0	39.0	100	

(n) :number of samples

Value of p : Value of significance

Table 3. Prevalance of *Cl. Perfringens* and distributions in months.

		<i>Cl. perfringens</i>		Total	Value of p
		(+)	(-)		
April	(n)	6	9	15	0.097
	(%)	40.0	60.0	100.0	
May	(n)	19	16	35	
	(%)	54.3	45.7	100.0	
June	(n)	17	8	25	
	(%)	68.0	32.0	100.0	
July	(n)	19	6	25	
	(%)	76.0	24.0	100.0	
Total	(n)	61	39	100	
	(%)	61.0	39.0	100.0	

(n) : number of samples

Value of p : value of significance

broiler chicken operations; isolation rates from processed chicken carcasses range from 8 to 68% (11, 12). Animal carcasses and cuts of meat can become contaminated with *Cl. perfringens* from contact with soil or animal feces, or during slaughtering and processing (8). Many organisms that compete with *Cl. perfringens* are killed when meat and poultry are cooked, but *Cl. perfringens* spores are difficult to eliminate (15).

Minced meat is a very common meat product in Turkey. Meat when turned into minced meat, there are no natural barriers of muscle tissue and microorganisms that may spread to each side of the meat. Cell fluid of the meat prepare an environment suitable for the development of bacterial reproduce and growth.

Contamination of meat and meat products with *Cl. perfringens* may be through different sources; mainly internally from animal after slaughter as postmortem invasion or externally from contaminated hands, skin of animals, soil, water and processing equipments (35).

In this study, the incidence of *Cl. perfringens* in minced beef (68%) was high in comparison with minced poultry meat (54%). *Cl. perfringens* was found in 61% (average 4.9 MPN/g) of samples. Similarly, *Cl. perfringens* was isolated from 88% of chicken carcasses consumed in Beijing (16); and

70.4% of chicken meat collected from slaughterhouses and markets in India (39). An earlier survey by Wen and McClane (42) reported that 56 of 147 chicken samples (%38), 17 of 83 (%21) cattle meat samples, and 25 of 108 (%23) minced beef samples at 2-5 MPN/g, 1-10 MPN/g, 3-32 MPN/g. In addition, it is reported that in 84% out of 50 chicken samples, 16% beef samples in Japan were contaminated with *Cl. perfringens* (32). *Cl. perfringens* were isolated from 24% of minced meat consumed in *San Luis* (40), 70.4% of chicken meat collected from slaughterhouses and markets in India (39), 66% of wing and chicken leg quarter samples in Canada (33), and 8.7-29.6% out of 150 minced beef samples in Casablanca (8). In present study, it was observed that the samples were contaminated with *Cl. perfringens* between the levels of 3.0 and 20.0 MPN/g, while Craven (10), Lin and Labbe (26), and Miwa et al. (32) found 1.20 MPN log₁₀ in chicken carcasses, 3.05 and >1.100 MPN/g in chicken meat parts, <10² ve 10⁴ MPN/100g in poultry meat respectively.

Generally, the contamination level of poultry meat samples was higher than that of cattle meat samples in other studies. In this study, the contamination level of beef samples was higher than that of poultry samples. This situation could be due to increased contamination risk of the

cattle carcass during evisceration as the organism is natural flora of the gut and soil. Traditionally, food raw materials have been considered to be the main source of food contamination with *Cl. perfringens*. The high prevalence of toxin positive strains in the human gastrointestinal tract may serve as an important source of contamination for healthy people handling foods or food raw materials (19). On the other hand, it can be related to stress from shipping and different management conditions prior to arrival such as hygiene, population, stocking density along with potential geographic variation and differences in methodology (9). Overall, the findings in regard to *Cl. perfringens* (54% positive) are very similar to those in other studies that examined retail poultry meat, where the positivity rate ranged from 26 to 98% (26, 31). It is not surprising that, in this study results show that a high number of retail minced poultry meats are positive for *Cl. perfringens*. The presence of this enteropathogen in the intestines of birds can contaminate the final product. Foods of animal origin, which are rich in protein have great importance in the occurrence of food poisoning caused by *Cl. perfringens*. Factors are widely available in the products of raw meat and raw or inadequately cooked meats.

Cl. perfringens were isolated from 88% of chicken carcasses consumed in Beijing (16), 70.4% of chicken meat in India (39) and 66% of wing and chicken leg quarter samples in Canada (33). However, in a study conducted in different retail stores in the United States, it was reported that 4 (21%) of 19 chicken meat samples were contaminated with *Cl. perfringens*. In another study where samples were collected from different broiler chicken slaughterhouses in Sweden, 114 (18%) out of 636 chicken carcasses were determined to be contaminated with *Cl. perfringens* (25, 26). The reasons for the differences between the research findings are thought to be due to the technological differences between the slaughterhouses and different methodology used. High rate of prevalence in the chicken meat can also be attributed to: i) the bacterium being ubiquitous and the availability of poultry intestinal flora, ii) the inevitability of cross-contamination due to the poultry slaughter process, and iii) the lack of sanitation and hygiene conditions (2, 41).

Conclusion

The result of the present study highlighted that *Cl. perfringens* contamination rates in raw poultry and

beef minced meat and its products in Turkey may constitute a health hazard to consumers, especially to people at greater risk.

Products, especially minced meat is gaining popularity in Turkey as they represent easily prepared meals. Cooking should be done under ideal conditions. Efforts to reduce illnesses from *Cl. perfringens* in ready-to-eat and partially-cooked meat and poultry products should focus on retail and consumer storage and preparation methods. Besides, proper control strategies are required to reduce the number of disease cases and outbreaks frequently caused by this organism.

Acknowledgments

This manuscript was prepared from studied as a master degree thesis and it was supported by the Afyon Kocatepe University Research Fund (BAP/ VF-10-11).

References

1. Adak GK, Long SM, O'Brien SJ. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut* 2002; 51: 832-41.
2. Atasever M. Besin işyerlerinde hijyen, besinlerin hazırlanması ve muhafazası. *YYÜ Vet Fak Derg* 2001; 11: 117-22.
3. Atwa EI, Abou EI-Roos NA. Incidence of *Clostridium perfringens* in meat products at some Egyptian governorates. *Int J Microbiol Res* 2011; 2: 196-203.
4. Baumgart J, Baum O, Lippert S. Schneller und direkter Nachweis von *Clostridium perfringens*. *Fleisch* 1990; 70: 1010-4.
5. Brynestad S, Granum PE. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *Int J Food Microbiol* 2002; 74: 195-202.
6. Byrne B, Scannell AG M, Lyng J, Bolton DJ. An evaluation of *Clostridium perfringens* media. *Food Control* 2008; 19: 1091-5.
7. Carman RJ, Sayeed S, Li J, Genheimer CW. *Clostridium perfringens* toxin genotypes in the feces of healthy North Americans. *Anaerobe* 2008; 14: 102-8.
8. Cohen N, Fillio I, Karraouan B, Badri S, Carle I, Ennaji H, Bouchrif B, Hassar M, Karib H. Microbial quality control of raw ground beef and fresh sausage in Casablanca. *J Environ Health* 2008; 71: 51-5.

9. Costa MC, Reid-Smith R, Gow S, Hannon SJ, Booker C, Rousseau J, Benedict KM, Morley PS, Weese JS. Prevalence and molecular characterization of *Clostridium difficile* isolated from feedlot beef cattle upon arrival and mid-feeding period. BMC Veterinary Res 2012; 8: 1-7.
10. Craven SE. Occurrence of *Clostridium perfringens* in the broiler chicken processing plant as determined by recovery in iron milk medium. J Food Protect 2001; 64: 1956-60.
11. Craven SE, Stern NJ, Bailey JS, Cox NA. Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing. Avian Disease 2001; 45: 887-96.
12. Craven SE, Cox NA, Bailey, JS, Cosby DE. Incidence and tracking of *Clostridium perfringens* through an integrated broiler chicken operation. Avian Dis 2003; 47: 707-1.
13. De Man JC. MPN tables, corrected. J Appl Microbiol Biotechnol 1983; 17: 301-5.
14. Doyle ME. Survival and growth of *Clostridium perfringens* during the cooling step of thermal processing of meat products. Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison. 2002.
15. Garcia S, Heredia N. *Clostridium perfringens* a dynamic foodborne pathogen. Food Bioprocess Technol 2011; 4: 624-30.
16. Guang-Hua W, Xiao-Ling Q. Fleisch und fleisch produkte aus dem einzelhandel in beijing. vorkommen von *Cl. perfringens*, *S. aureus*, *Salmonellen* und *L. monocytogenes*. Fleisch 1994; 74: 326-8.
17. Hathaway CL. Toxigenic Clostridia. J Clin Microbiol 1990; 3: 66-98.
18. Hayes PR. Food Microbiology and Hygiene. Second Edition. New York: Elsevier Applied Science, 1992.
19. Heikinheimo A, Lindstrom AM, Granum PE, Korkeala H. Human as reservoir for enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* type A. Emerg Infect Dis 2006; 12: 1724-9.
20. Juneja VK, Marks H, Thippareddi H. Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked ground chicken. Innov Food Sci Emerg Technol 2009; 10: 260-6.
21. Knox R, MacDonald EK. Outbreaks of food poisoning in certain Leicester institutions. Medical Officer 1943; 69: 21-2.
22. Labbe RG. *Clostridium perfringens*. Doyle MP. eds. In: Foodborne Bacterial Pathogens. New York: New York and Basel Marcel Decker Inc, 1989, pp. 191-227.
23. Li J, Sayeed S, McClane BA. Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates in Pittsburgh (Pennsylvania) area soil and home kitchens. Appl Environ Microbiol 2007; 73: 7218-24.
24. Linch M, Painter J, Woodruff R, Braden C. Surveillance for foodborne-disease outbreaks in United States, 1998–2002. Morb Mort Weekly Report 2006; 55: 1-34.
25. Lindblad M, Lindmark H, Lambertz ST, Lindqvist R. Microbiological baseline study of broiler chickens at Swedish slaughterhouses. J Food Protect 2006; 69: 2875-82.
26. Lin Y, Labbe R. Enterotoxigenicity and genetic relatedness of *Clostridium perfringens* isolates from retail foods in the United States. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 1642-6.
27. Kobayashi S, Wada A, Shibasaki S, Annaka M, Higuchi H, Adachi K, Mori N, Ishikawa T, Masuda Y, Watanabe H, Yamamoto N, Yamaoka S, Inamatsu T. Spread of a large plasmid carrying the *cpe* gene and the *tcp* locus amongst *Clostridium perfringens* isolates from nosocomial outbreaks and sporadic cases of gastroenteritis in a geriatric hospital. Epidemiol Infect 2009; 137: 108-13.
28. McClane BA. *Clostridium perfringens*. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. eds. In: Food microbiology Fundamentals and Frontiers. Washington DC: ASM Press, 2001, pp. 351-72.
29. McClane BA, Rood JI. Clostridial toxins involved in human enteric and histotoxic infection. Bahl H, Dürre P. eds. In: Clostridia: Biotechnology and Medical Applications. Wiley-VHC Weinheim, 2001, pp. 169–220.
30. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffen PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis 1999; 5: 607-25.
31. Miki Y, Miyamoto K, Kaneko-Hirano I, Fujiuchi K, Akimoto S. Prevalence and characterization of enterotoxin gene-carrying *Clostridium*

- perfringens* isolates from retail meat products in Japan. Appl Environ Microbiol 2008; 74: 5366–72.
32. Miwa N, Nishina T, Kubo S, Atsumi M, Honda H. Amount of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat detected by nested PCR. Intl J Food Microbiol 1998; 42: 195-200.
 33. Nowell VJ, Poppe C, Parreira VR, Jiang YF, Reid-Smith R, Prescott JF. *Clostridium perfringens* in retail chicken. Anaerobe 2010; 16: 314-5.
 34. Pillai SD, Vega E. Molecular detection and characterization tools. Santo Domingo JW, M. Sadowsky J. eds. In: Microbial source tracking. Washington, DC: ASM Press, 2007, pp. 65-91.
 35. Satio M. Production of enterotoxin by *C. perfringens* derived from humans, animals, foods and the natural environment in Japan. J Food Protect 1990; 53: 115-8.
 36. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy, SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States- major pathogens. Emerg Infect Dis 2011; 17: 7-15.
 37. Schalch B, Eisgruber H, Geppert P, Stolle A. Vergleich von vier Routineverfahren zur Bestätigung von *Clostridium perfringens* aus. Arch Lebensmittel 1996; 47: 27-30.
 38. Setlow P, Johnson EA. Spores and their significance. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. eds. In: Food microbiology Fundamentals and Frontiers. Washington DC: ASM Press, 2001, pp. 33-70.
 39. Singh RV, Bhilegaonkar KN, Agarwal RK. Studies on occurrence and characterization of *Clostridium perfringens* from select meats. J Food Safety 2005; 25: 146-56.
 40. Stagnitta PV, Micalizzi B, Guzman AMS. Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meats in San Luis, Argentina. Anaerobe 2002; 8: 253-8.
 41. Tschirdewahn B, Notermans S, Wernars K, Untermann F. The presence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in faeces of various animals. Int J Food Microbiol 1991; 14: 175-8.
 42. Wen Q, McClane BA. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail food. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 2685-91.

Correspondence author:

Assist. Prof. Dr. Şebnem PAMUK
 Faculty of Veterinary Medicine,
 Food Hygiene and Technology Department,
 Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar-TURKEY
 e-mail: spamuk@aku.edu.tr



Sütçü İneklerde Subklinik Mastitisin Tedavisinde *Aloe vera* Kullanımının Etkinliği*

Hasan ORAL¹, Armağan ÇOLAK², Bülent POLAT², Mehmet CENGİZ²,
Seyda CENGİZ³, Ayhan BAŞTAN⁴, Semra KAYA¹

¹ Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Kars; TÜRKİYE
² Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Erzurum; TÜRKİYE
³ Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum; TÜRKİYE
⁴ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Ankara; TÜRKİYE

Özet: Çalışmamızda organik antibakteriyel bir ajanın subklinik mastitis tedavisindeki etkinliği araştırıldı. Subklinik mastitisli 90 adet meme lobu üç gruba ayrıldı. Grup I, II ve III'e sağım öncesi oksitosin uygulandı. Sağım sonrası Grup II'ye (n:30) meme içi laktasyon dönemi antibiyotik (amoksisilin, klavulanik asit ve prednizolon kombinasyonu), Grup III'e (n:30) ise sağım sonrası meme içi *Aloe vera* uygulandı. Somatik hücre sayımı (SHS) için 0. 4 ve 31. gün süt örneği alındı. Ayrıca 31. gün süt örneklerinden mikrobiyolojik ekim yapıldı. Sıfırinci gün SHS bakımından gruplar arasında fark yoktu. Otuzbirinci günde en yüksek SHS'nin Grup I'de, en düşük SHS'nin ise Grup III'te olduğu belirlendi. Grup I ile Grup III arasındaki bu farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı. Otuz birinci gün bakteriyolojik iyileşme oranı bakımından en iyi iyileşme Grup II'de idi ve bu iyileşme oranı istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Sonuç olarak, subklinik mastitisin tedavisinde *Aloe vera'nın* kullanılabilmesi tespit edildi ve daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: *Aloe vera*, inek, subklinik mastitis

The Effectiveness of the *Aloe vera* Therapy for the Treatment of Subclinical Mastitis in Dairy Cows

Summary: In this study, the activity of an organic antibacterial agent on subclinical mastitis treatment was investigated. Ninety mammary lobes with subclinical mastitis were divided into three groups. Oxytocin was applied five minutes before milking Groups I, II and III. After milking, intramammary antibiotic combination of amoxicillin, clavulanic acid and prednisolone Group II and *Aloe vera* were applied to Group III, respectively. Milk samples were taken for Somatic cell count at day 0, 4 and 31. In addition, microbiological examinations were performed for samples taken at day 31. There were no differences between groups for SCC at day 0. Somatic cell count was found the highest in Group I and the lowest in Group III in at day 31. The best improvement for bacteriological recovery rate was in the day 31 in Grup II and was found significant. The difference between Group I and Group III was statistically significant. As a result, we concluded that *Aloe vera* can be useful for the treatment of subclinical mastitis but, further research done on this issue is needed.

Key words: *Aloe vera*, cow, subclinical mastitis

Giriş

Memenin enfeksiyöz etkenlere veya irkiltici maddelere karşı verdiği tepkiye mastitis denir (3). Mastitis süt ineklerinde çok yaygın olarak görülür ve süt endüstrisinde önemli kayıplara yol açar (4, 8).

Son yıllarda mastitis tedavisinde antibiyotik kullanımını en aza indirmek amacıyla çeşitli projeler ön plana çıkarılmış ve alternatif tedavilere yönelim artmıştır. Sarı sabır olarak da bilinen *Aloe vera*;

zambakgiller ailesinin 360 türünden yalnızca birisidir ve mastitis tedavisinde kullanılmaktadır (7, 12). *Aloe vera* içerdiği antrakinon türevi bileşikler (aloin, emodin, aloe-emodin) sebebiyle özellikle Avrupa'da pek çok tedavide kullanılmıştır ve yara iyileşmesinde etkili olduğu bildirilmektedir. Bu etkinin *Aloe vera* bileşiminde bulunan proteinler, polisakaritler ve vitaminler (B₁, B₂, B₃ ve C vitamini) ve minerallerden kaynaklandığı düşünülmektedir (10). Yumuşatıcı etkisi sebebiyle meme başı daldırma solüsyonlarında da kullanıldığı bildirilmektedir (7). Bu çalışma, subklinik mastitislerde antibiyotik kalıntı problemleri sebebiyle oluşan süt kayıplarını önlemede, *Aloe vera'nın* alternatif bir tedavi seçeneği olabileceğini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Geliş Tarihi/Submission Date : 29.11.2013

Kabul Tarihi/Accepted Date : 16.04.2014

* Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu; 2008-VF-14)

Gereç ve Yöntem

Çalışma materyalini, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Uygulama ve Araştırma Çiftliğinde bulunan 3-6 yaşlı Montefon ve Holstein ırkı inekler oluşturdu. Yapılan inspeksiyon ve palpasyonlar sonucu memede klinik mastitise ait herhangi bir bulgu tespit edilemeyen ve sütün fizyolojik görünümü normal olan ineklere Kaliforniya Mastitis Testi (CMT) yapıldı. CMT sonucunda 90 adet subklinik mastitisli meme lobu tespit edildi ve rastgele 3 gruba ayrıldı.

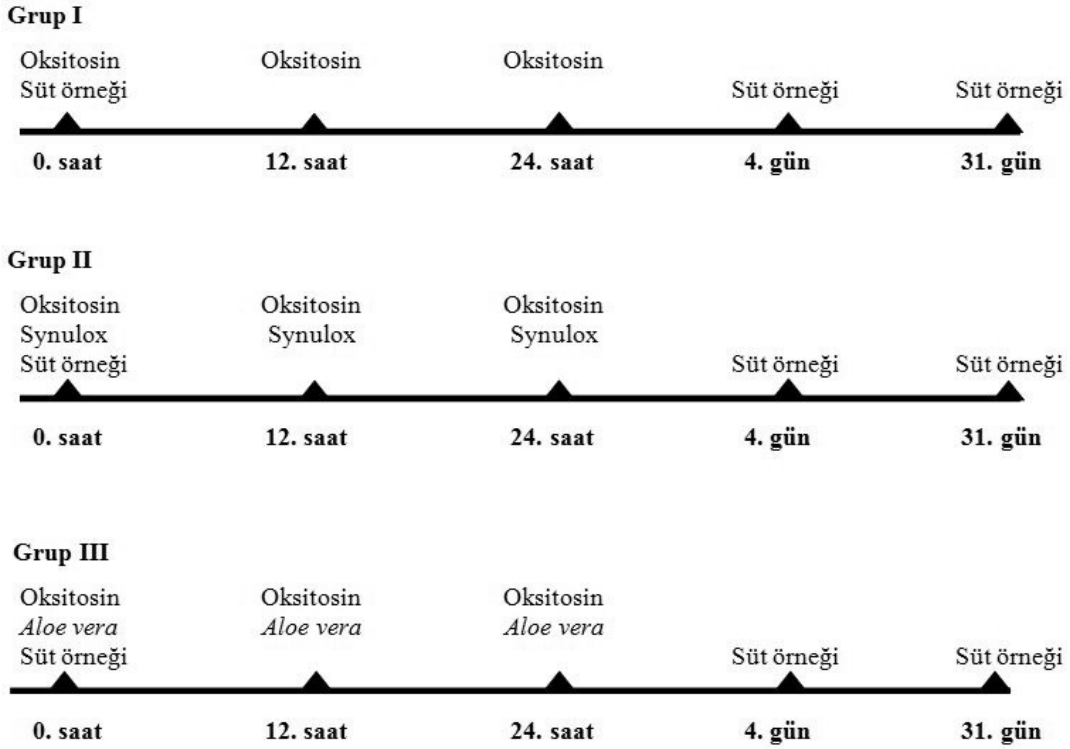
Grup I'e (n=30) her sağım öncesi 20 IU oksitosin (Vetaş Oksitosin®, Vetaş) damar içi olarak 12 saat aryla 3 defa uygulandı, meme lobları tamamen boşaltıldı ve ilave bir uygulama yapılmadı.

Grup II'ye (n=30) her sağım öncesi 20 IU oksitosin damar içi uygulanarak, memeler tamamen boşaltıl-

dı. Sağım sonrası 200 mg amoksisilin, 50 mg klavulanik asit ve 10 mg prednizolon kombinasyonu (Synulox LC®, Pfizer) meme içine 12 saat ara ile 3 defa uygulandı.

Grup III'e (n=30) her sağım öncesi 20 IU oksitosin damar içi uygulanarak, memeler tamamen boşaltıldı. Sağım sonrası %3'lük 10 ml Aloe vera meme içine 12 saat ara ile 3 defa uygulandı. Aloe vera (Sarısabır®, Karden, Ankara, TÜRKİYE) hazır müstahzar olarak kullanıldı (Şekil 1).

Tedaviye başlanıldığında ve protokollerden sonra subklinik mastitisli olan meme loblarındaki SHS'nı (Bentley Somacount® 150, Bentley, USA) belirlemek ve tedavi etkinliğini araştırmak amacıyla 0., 4. ve 31. günlerde steril tüplere süt örnekleri alınıp laboratuvara gönderildi. Ayrıca 31. günde alınan süt örneklerinden mikrobiyolojik ekim yapıldı.



Şekil 1. Gruplardaki uygulama şeması.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz, her grupta günler arasında SHS değerlerinin karşılaştırılmasında tekrarlı ölçümlerde varyans analizi, her ölçüm gününde gruplar arasında SHS değerlerinin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Farklılığın önemli çıktığı durumlarda ikili karşılaştırmalar için Duncan testi kullanılmıştır. Gruplara göre Mikrobiyolojik üreme oranlarının karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanılmıştır.

Bulgular

Tedavi protokollerine başlandığında (0. gün) ve tedavileri takip eden 4. ve 31. günlerde alınan süt örneklerinde ki ortalama SHS Tablo 1'de belirtildi. Örneklem günlerine göre her bir grup kendi içinde karşılaştırıldı. Grup I, Grup II ve Grup III'te SHS bakımından örneklem günleri arasındaki fark istatistiksel olarak çok önemli olduğu belirlendi ($P<0.001$). Gruplar sıfırıncı gün SHS'ları yönünden karşılaştırıldığında, aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenirken ($P>0.05$), 4. günde ($P<0.01$) ve 31. günde bu farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($P<0.001$). Otuz birinci gün alınan süt örneklerinin mikrobiyolojisine göre en iyi iyileşme Grup II' de tespit edildi. Bireysel olarak Grup I, II ve III' ün 31. gün SHS'na göre (<200.000) iyileşme oranları sırasıyla %30 (9/30), %40 (12/30) ve %50 (15/30) olarak bulundu.

Alınan süt numunelerinden yapılan bakteriyolojik ekimlerde Grup I'de %26.67, Grup II'de %3.34 ve Grup III'de ise %16.67 meme lobuna ait sütte mikrobiyolojik olarak üreme olduğu belirlendi (Tablo 2). Tedavi sonrası 31. günde gruplar arasında iyi-

leşme oranı bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu saptandı ($P<0.05$).

Çalışma sonunda alınan numunelerden (31. gün) yapılan mikrobiyolojik ekimlerde sırasıyla *Staphylococcus aureus* (%53.4), *koagulaz negatif stafilkok* (%26.7), *Esherichia coli* (%6.6), *Streptococcus spp.* (%6.6) ve *Bacillus spp.* (%6.6) izole edildi. Grup I, Grup II ve Grup III'teki ineklerde sırasıyla %30.00, %3.33 ve %16.66 oranında mikroorganizma ürettiği saptanmıştır. İzole edilen bu mikroorganizmaların gruplara göre dağılımı Tablo 3'te sunulmuştur.

Tartışma ve Sonuç

Meme bezinin hücresel ve humoral savunma sistemi patojenlere karşı önemli rol oynamaktadır. Yapılan in vitro çalışmada in vivo olarak karşılaşılan bir antijene karşı lökosit yıkım gücü üzerine *Aloe vera* etkisi araştırılmıştır. *Aloe vera* eklenmiş kültürlerde lökosit yıkım gücünün arttığı ve immunolojik savunma sistemine yardımcı olduğu tespit edilmiş ve iyileşmenin de daha hızlı olduğu bildirilmektedir (5).

Aloe vera'nın antimikrobiyel etkisi bilinmesine rağmen subklinik mastitis tedavisinde ki etkinliği hakkında pek fazla bilgi bulunmamaktadır fakat klinik mastitislerin tedavisi amacıyla *Aloe vera* kullanılan çalışmalar bildirilmiştir (12). Organik üretim yapılan çiftliklerde meme içi *Aloe vera* emülsiyonları ve soğuk su ile masaj gibi alternatif tedaviler tüm tedavilerin %8'ini oluşturmaktadır (6).

Öcal ve ark. (11) tarafından yapılan çalışmada daha önce mastitisli olduğu belirlenen hayvanlara

Tablo 1. Grup içinde ve gruplar arasında örneklem yapılan günlerdeki SHS'nın karşılaştırılması

	0. gün	4. gün	31. gün	P*
Grup I; (n=30)	908.30±362.20 ^{bA}	2977.9±375.28 ^{aA}	1546.00±468.55 ^{bA}	<0.001
Grup II; (n=30)	621.75±136.56 ^{aA}	1823.5±270.30 ^{bB}	748.05±235.17 ^{aAB}	<0.001
Grup III; (n=30)	887.60±219.59 ^{abA}	1364.9±297.22 ^{abB}	325.95±48.48 ^{bB}	<0.001
P**	>0.05	<0.01	<0.05	

a,b: aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak $p<0,05$ önemlidir.

A,B: aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

P*: İstatistik önem kontrolü (tekrarlı ölçümlerde varyans analizi),

P**: İstatistik önem kontrolü (tek yönlü varyans analizi)

Tablo 2. Tedavi sonrası 31. günde iyileşmenin kontrolü.

Gruplar	Üreme	
	+	-
Grup I	8 (%26.67) ^a	22 (%73.33)
Grup II	1 (%3.34) ^b	29 (%96.66)
Grup III	5 (%16.67) ^c	25 (%83.33)
P	a:b:c: P<0.05	

Tablo 3. Gruplardan 31. gün alınan süt örneklerinden izole edilen mikroorganizma, sayıları ve yüzdeleri.

Mikroorganizma türü	Grup I	Grup II	Grup III
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	-	3
<i>KNS</i>	2	-	2
<i>Esherichia coli</i>	1	-	-
<i>Streptococcus spp.</i>	-	1	-
<i>Bacillus spp.</i>	1	-	-
Toplam	9/30 (%30.00)	1 (%3.33)	5 (16.66)

meme içi antibiyotik tedavisinden 7 gün sonra süt örnekleri alınmış ve mikrobiyolojik ekim ile % 93.02'sinde iyileşme belirlemiştir. Yine Baştan ve ark. (2) tarafından yapılan çalışmada meme içi antibiyotik uygulaması ile bakteriyolojik olarak %84 oranında iyileşme belirlenmiştir. Grup I'de %73.33 (22/30), Grup II'de %96.66 (29/30) ve Grup III'de ise %83.33 (25/30) oranında mikrobiyolojik iyileşme belirlenen çalışmamızın sonuçları diğer çalışmalarla (2,11) uyumlu bulundu.

Abay ve Bekyürek (1) tarafında yapılan çalışmada subklinik mastitis olduğu belirlenen meme loblarında tedavi sonrası mikrobiyolojik olarak iyileşme oranını %67.9 olarak tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada da benzer şekilde Grup I'de 21, Grup II'de 18 ve Grup III'de 15 meme lobunda SHS >200.000 olmasına rağmen yapılan mikrobiyolojik ekimlerde Grup I'de 8, Grup II'de 1 ve Grup III'de 5 adet meme lobunda üreme olduğu tespit edildi.

Mastitise neden olan mikroorganizmalar yöresel ve bölgesel farklılıklar göstermektedir. Her bir bölgede kullanılan antibiyotik çeşidine karşı çeşitli oranlarda direnç geliştiği bildirilmektedir. Bu bağlamda *Staphylococcus aureus* suşunun çeşitli antibiyotiklere karşı %5-60 arasında direnç geliştirdiği bildirilmiştir (9). Bu sebeple alternatif tedavi yöntemlerine yönelmek önem arz etmektedir.

Sonuç olarak, *Aloe vera* kullanılan grup ile antibiyotik grubu arasında önemli bir fark tespit edilemedi. Bu sebeple özellikle organik üretim yapan ve kalıntı problemi yaşayan büyük işletmelerde *Aloe vera*'nın subklinik mastitis tedavisinde alternatif tedavi yöntemi olarak kullanılabilirliği sonucuna varıldı. Tedavi etkinliğinin daha iyi bir şekilde değerlendirilebilmesi için daha geniş ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu kanısındayız.

Kaynaklar

1. Abay M, Bekyürek T. Laktasyondaki sütçü ineklerde staphylococcus aureus'un neden olduğu subklinik mastitislerin tedavisinde sefkuinom ve amoksisilin+klavulanik asit'in etkinliklerinin karşılaştırılması. Sağlık Bilim Derg 2006; 15(3): 189-93.
2. Baştan A, Akan M, Öncel T. İneklerde klinik mastitis'in tedavisinde amoxycillin klavulanik asit kombinasyonunun etkinliğinin araştırılması. Vet Hek Mikrobiyoloji Derg Elektronik Versiyonu 2001; 1(1): 63-9.
3. Blowey R, Edmondson P. Mastitis Control in Dairy Herds. Second Edition. CABI, UK, 2010; p.1

4. Cao LT, Wu JQ, Xie F, Hu SH, Mo Y. Efficacy of nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows. J Dairy Sci 2007; 90(8): 3980-5.
5. Crişan L, Spinu M, Niculae M, Bordeanu A, Kiss T, Krupaci F, Popescu S. Microbiological and systemic immunological changes in cows with clinical mastitis. Annals of RSCB 2012; 17(1): 367-72.
6. Denmark R. Positive health: Preventive measures and alternatives strategies. Proceedings of the Fifth Network for Animal Health and Welfare in Organic Agriculture (NAHWOA) Workshop. November, 11-13, 2001; Rødding, Denmark.
7. Hemling TC. Teat condition-prevention and cure through teat dips. Proceeding of the British Mastitis Conference, 1-14, 2002; Brockworth, UK.
8. Hovinen M, Siivonen J, Taponen S, Hänninen L, Pastell M, Aisla AM, Pyörälä S. Detection of clinical mastitis with the help of a thermal camera. J Dairy Sci 2008; 91(12): 4592-98.
9. Kaynarca S, Türkyılmaz S. Sığır mastitislerinden izole edilen stafilokoklarda metisilin direnci ve slaym pozitifliği. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2010; 16(4): 567-72.
10. Kökdil G. *Aloe vera*; Doğanın mucizesi mi? *Doğa*, Türk Eczacılar Birliği, 17-18, <http://www.e-kutuphane.teb.org.tr/pdf/eczaci-dasiyayinlari/mersin2/9.pdf>; Erişim tarihi: 18.03.2013.
11. Öcal H, Yıldız H, Aydın M, Akar Y. İneklerde subklinik mastitisin danofloxacin ile tedavisi. FÜ Sağlık Bil Derg 1999; 13(3): 399-404.
12. Ruegg PL. Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. J Anim Sci 2009; 87(13 Suppl): 43-55.

İletişim Adresi:

Arş. Gör. Dr. Semra KAYA,
Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı,
Paşaçayırı Yerleşkesi, KARS
Tel: 0474 242 6807-(5221)
E-mail: semra-kafkas@hotmail.com



Slime Positivity and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Various Animal Clinical Samples

Esra ŞEKER¹, Nilgün ÜNAL²

¹ Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar-TURKEY

² Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Kırıkkale University, Kırıkkale-TURKEY

Summary: In this study, a total of 50 *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk, bovine uterus swabs, dog ear swab, dog skin swab and chicken synovial fluid samples were examined in terms of slime factor production and antibiotic resistance. The slime production of strains was determined by using Congo red agar and standard tube methods. Of 50 *S. aureus* strains, 21 (42%) and 18 (36%) were determined as slime positive in the Congo red agar and standard tube methods, respectively. A significant difference was not found between two different methods ($p>0.05$). Standard E-test method was used to detect the antibiotic resistance of isolates. Among the isolates, the highest resistance rate was against penicillin G (20%), followed by cephalothin (16%), oxacillin (16%) and tetracycline (14%). Only one (2%) of the tested strains was resistant to enrofloxacin. However, resistance to erythromycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, rifampin and gentamicin were not determined in any strains. When the antibiotic resistance of slime positive and negative strains was compared, resistance to penicillin G, cephalothin and oxacillin was significantly high in slime positive strains ($p<0.05$).

Key Words: Antibiotic resistance, slime factor, *Staphylococcus aureus*

Çeşitli Hayvansal Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Slaym Pozitifliği ve Antibiyotik Direnci

Özet: Bu çalışmada, inek sütü, inek uterus sıvabı, köpek kulak sıvabı, köpek deri sıvabı ve tavuk sinoviyal sıvı örneklerinden izole edilen toplam 50 *Staphylococcus aureus* suşu slaym faktör üretimi ve antibiyotik direnci yönünden incelendi. Suşların slaym üretimi Congo red agar ve standart tüp yöntemleri kullanılarak belirlendi. Elli *S. aureus* suşunun 21'i (%42) Congo red agarda, 18'i (%36) standart tüp yöntemi ile slaym pozitif olarak belirlendi. İki farklı yöntem arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). İzolatların antibiyotik dirençlerinin belirlenmesinde standart E-test yöntemi kullanıldı. İzolatlar arasında en yüksek direnç oranı penisilin G'ye (%20) karşı iken, bunu sefalotin (%16), oksasilin (%16) ve tetrasikline (%14) karşı direnç oranları izledi. Test edilen izolatlardan sadece biri (%2) enrofloksasine karşı dirençliydi. Eritromisin, trimetoprim/sulfametoksazol, rifampin ve gentamisine karşı ise direnç tespit edilemedi. Slaym pozitif ve negatif suşların antibiyotik dirençleri karşılaştırıldığında, slaym pozitif suşlarda penisilin G, sefalotin ve oksasiline karşı direnç önemli oranda yüksekti ($p<0.05$).

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik direnci, slaym faktör, *Staphylococcus aureus*

Introduction

Staphylococcus aureus is a common commensal on skin, the mucous membranes of upper respiratory tract, lower urogenital tract and digestive tract in humans and animals. However, this agent causes pneumonia, mastitis, arthritis, synovitis, endocarditis, urinary and genital tract infections, skin lesions, phlebitis, meningitis and food poisoning. Therefore, *S. aureus* is known as the most important pathogen found in

Staphylococcus genus for human and animals (26, 28).

S. aureus has several virulence factors such as microcapsule, surface proteins, exotoxins, hemolysins and enzymes playing an important role in the pathogenesis of diseases (26, 28). Besides these factors, *S. aureus* can produce a viscous extracellular exopolysaccharide referred as slime or biofilm. Staphylococcal biofilms are encased in an extracellular matrix composed of proteins, polysaccharides, extracellular DNA and presumably host factors (3, 8, 20). This extracellular polysaccharidic layer enhances the adhesion of agent to host tissues and plastic or

metallic surfaces; contributes to the evasion of bacteria from immunological defense mechanisms; and complicates the pathogen eradication (18). The matrix protects bacteria against high antimicrobial concentration because it impairs the access of antibiotics to bacterial cells and limits the antimicrobial agent diffusion through biofilm (18, 30). Also, extracellular slime production by bacteria provides the protection of cells from the phagocytic activity of macrophages and bactericidal activity of neutrophils (6). Therefore, it has been accepted that slime positive bacterial strains are more often related to significant infections than slime negative strains (3, 4, 7, 24).

A number of tests are available to detect slime production by staphylococci, including tissue culture plate (11), microplate test (27), standard tube method (11), Congo red agar (17), bioluminescent assay (23) and scanning electron microscopy (15) or fluorescence microscopic examination (33). But, most frequently the Standard tube test and Congo red agar methods are used. By applying these *in vitro* methods to establish the criteria for slime production, strains have been classified as slime producing and non-slime producing (31).

Recently, many studies have mainly focused on the biofilm formation of human clinical isolates (5, 9, 29) and bovine or ovine mastitis isolates (1, 12, 16, 22, 24). But, the investigations about the slime factor production of *S. aureus* isolates obtained from various animal samples are limited (14, 31, 32). Therefore, in the present study, the determination of slime positivity in *S. aureus* strains isolated from different animal clinical sources, including bovine milk, bovine uterus swab, dog ear swab, dog skin swab and chicken synovial fluid, was aimed. Also, the antibiotic resistance of slime positive and negative strains was statistically compared.

Materials and Methods

S. aureus strains

In this study, 50 *S. aureus* isolates were used for detection of their slime factor production and antibiotic resistance. The isolates were obtained from bovine milk with mastitis (n=10 isolates), bovine uterus swabs with fertility problems (n=10 isolates), dog ear swabs with otitis externa (n=10 isolates), dog skin swabs with skin lesions (n=10 isolates) and chicken synovial fluids with synovitis (n=10 isolates). The isolation and identification of *S. aureus* from samples was performed by using

standard cultural methods. For this purpose, clinical samples were directly inoculated onto blood agar media (Oxoid CM0271) containing 7% of sheep blood and plates were incubated aerobically at 37 °C for 24-48 hours. After the incubation, each different colony was examined macroscopically (colony morphology, haemolysis, pigment production) and microscopically (Gram staining). Then, each different colony was sub-cultured in blood agar containing 7% of sheep blood and tryptone soya broth (Oxoid CM0129) for further characterization. Oxidase, catalase, lam and tube coagulase, Voges Prouskauer, fermentation of glucose and mannitol, DNase activity and resistance to bacitracin tests were used for identification of isolates (19, 28).

Detection of slime production

Slime production of 50 *S. aureus* strains was determined by using Congo red agar and standard tube methods. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 and *S. epidermidis* ATCC 12228 were used as positive and negative control strains, respectively.

Congo red agar was prepared according to method described by Freeman et al. (17). The composition of medium was Brain Heart Infusion Broth (Oxoid CM0225) 37 g/l, sucrose 50 g/l, agar 10 g/l and Congo red 0.8 g/l. The Congo red stain was prepared as a concentrated aqueous solution and autoclaved (121 °C for 15 min) separately and was added when the agar had cooled to 55 °C. The strains were inoculated onto medium and incubated under aerobic conditions for 24 hours at 37 °C. After the incubation, black coloured colonies were regarded as slime positive and pink coloured colonies as slime negative. The experiment was performed in triplicate and repeated three times.

The standard tube method developed by Christensen et al. (11) was used as the second method in the detection of slime production. A loopful of organisms from a single colony in pure culture on blood agar plate containing 7% of sheep blood was inoculated into 10 ml of tryptone soya broth. The tubes were incubated at 37 °C for 18 hours. Then, the contents were decanted and tubes were stained with 1% safranin for 7 min. A positive result was indicated by the presence of an adherent film of stained material on the inner surface of the tube. Presence of stained material at the liquid-air interface alone was not regarded as indicative of slime production. The test was repeated three times for each isolate.

Antibiotic susceptibility test

Resistance to different antibiotics was detected by using standard E-test method. E-test strips were used according to manufacturer instructions (AB Biodisk, Sweden) to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs) in µg/ml. Bacterial suspensions were prepared by selecting colonies from overnight cultures on blood agar containing 7% of sheep blood. The pour colonies were suspended in sterile tubes containing 2 ml of saline solution (0.85% NaCl) of equal turbidity to 0.5 McFarland standard. The suspensions were inoculated onto Mueller Hinton agar (Oxoid CM0337) plates using sterile swabs. After the inoculation, penicillin G (PG), cephalothin (CE), tetracycline (TC), erythromycin (EM), trimethoprim/sulphamethoxazole (TS), rifampin (RI), enrofloxacin (EF), oxacillin (OX) and gentamicin (GM) E-test strips were applied to plates and plates were incubated aerobically at 35 °C for 24 hours. Following the incubation, the MIC values were recorded and results were evaluated according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (13). *S. aureus* ATCC 29213 was used as control strain.

Statistical analysis

Chi-square test was used between two different methods applied for detection of slime factor

production. Antibiotic resistance of slime positive and slime negative strains was compared by Chi-square and Fisher's exact chi-square tests. A probability of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Slime production

Of 50 *S. aureus* strains tested, 21 (42%) and 18 (36%) were determined as slime positive in the Congo red agar and standard tube methods, respectively. A significant difference was not found between the two different methods ($p > 0.05$).

Antibiotic susceptibility test

In 50 *S. aureus* strains, the highest resistance rate was against penicillin G (20%), followed by cephalothin (16%), oxacillin (16%) and tetracycline (14%). Only one (2%) of the tested strains was resistant to enrofloxacin, while resistance to erythromycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, rifampin and gentamicin was not determined in any strains (Table 1). Resistance to penicillin G, cephalothin and oxacillin in slime positive strains was significantly higher than in slime negative strains ($p < 0.05$) (Table 2).

Table 1. Antibiotic resistance of 50 *S. aureus* isolates obtained from various animal clinical samples.

Antibiotic	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)	Range (µg/ml)	Breakpoint (µg/ml)	Resistance	
					n	%
PG	0.064	32	0.002-32	≥0.25	10	20
CE	0.125	256	0.016-256	≥32	8	16
TC	0.5	256	0.016-256	≥16	7	14
EM	0.38	0.5	0.016-0.75	≥8	0	0
TS	0.047	0.25	0.002-0.035	≥4/76	0	0
RI	0.008	0.016	0.002-0.023	≥4	0	0
EF	0.125	0.25	0.002-32	≥4	1	2
OX	0.25	256	0.016-256	≥4	8	16
GM	0.75	1	0.016-2	≥16	0	0

MIC: Minimum inhibitory concentration, PG: Penicillin G, CE: Cephalothin, TC: Tetracycline, EM: Erythromycin, TS: Trimethoprim/sulfamethoxazole, RI: Rifampin, EF: Enrofloxacin, OX: Oxacillin, GM: Gentamicin

Table 2. Difference between resistance to antibiotics and slime production in *S. aureus* strains obtained from various animal clinical samples

Antibiotic	Slime Positive (n=21)		Slime Negative (n=29)		Statistically Significant*
	n	%	n	%	
PG	8	38.1	2	6.9	p<0.01
CE	6	28.6	2	6.9	p<0.05
TC	5	23.8	2	6.9	p>0.05
OX	7	33.3	1	3.4	p<0.01

Difference between antibiotic resistance of slime positive and slime negative strains.
PG: Penicillin G, CE: Cephalothin, TC: Tetracycline, OX: Oxacillin

Discussion

This study investigated the slime factor positivity and antibiotic resistance in 50 *S. aureus* strains isolated from different animal clinical samples.

Slime factor production has been considered as an important virulence factor in the pathogenesis of infections because biofilm-associated microorganisms show an innate resistance to antibiotics, disinfectants and clearance by host defense mechanisms (6, 18, 30). Researchers have used various methods to detect slime production by staphylococci (11, 17, 21, 31). We tested 50 *S. aureus* strains by two *in vitro* screening procedures for their slime production ability. Slime production was detected in 42% (21/50) and 36% (18/50) of the *S. aureus* strains by the Congo red agar and standard tube assays, respectively. Similar to other studies (11, 14, 17, 21, 31), statistical analysis did not show a significant difference between the two different methods ($p>0.05$).

Although limited research exists about biofilms in animals, biofilms are believed to be involved in many diseases such as pneumonia, liver abscesses, enteritis, arthritis, synovitis, wound infections and mastitis (24, 25). The relationship between slime production and virulence has been emphasized in several publications (3, 4, 7, 29), indicating that slime positive bacterial strains are more often related to significant infections than slime negative strains. Türkyılmaz and Eskiizmirliiler (31) found the slime factor positivity as 77.7% in 90 coagulase positive staphylococci (CPS) strains isolated from various animal clinical samples by Congo red agar method. Similarly, the

slime factor production of 108 *S. aureus* strains was determined as 33.3% by Çiftçi et al. (14). In another study, slime production in 90 CPS strains was reported as 77.8% (32). In our study, 50 test strains were obtained from different clinical materials, including bovine milk, bovine uterus swab, dog ear swab, dog skin swab and chicken synovial fluid, and slime positivity was determined as 42% in these strains. This result was consistent with the findings of similar studies related to slime factor production in *Staphylococcus* strains.

Antibiotics have been commonly used for the treatment of bacterial infections. But, the resistance developed against antimicrobials has complicated the fight to infectious agents in the whole world. Therefore, bacterial identification and susceptibility tests are important for selecting the appropriate antimicrobial agent for treatment. In a research similar to our study, Türkyılmaz and Eskiizmirliiler (31) reported that the highest resistance rate was found against penicillin in all CPS strains. Similarly, Çiftçi et al. (14) determined the high resistance rates to penicillin, oxytetracycline and danofloxacin in *S. aureus* strains. In our tested strains, maximum resistance was observed against penicillin G (20%), followed by cephalothin (16%), oxacillin (16%) and tetracycline (14%). Penicillin G is widely used as main antibiotic group in animals for the treatment and prevention of several diseases in Turkey; therefore, a high rate of resistance to this antibiotic was not unexpected. Similarly, the reasons of resistance to cephalothin and tetracycline may be intensive, prolonged and regular use of these antibiotics in large and small animal practices for treatment of various conditions in Turkey.

However, high oxacillin resistance in tested strains was noteworthy. Although penicillinase or β -lactamase resistant penicillins such as oxacillin and methicillin are not used in veterinary medicine in Turkey, the common use of cloxacillin belongs to this group antibiotics, especially in mastitis, may be related to this phenotypic resistance rate.

Several authors have shown in *in vitro* experiments that bacteria growing in a biofilm are 10-1000 times more resistant to antimicrobial agents when compared with planktonic growing bacteria of the same strain (2, 10, 25). In a study, higher resistance rate against tested antibiotics was relatively determined in slime producing CPS strains isolated from various animal clinical materials than non-slime producing strains (31). In the present study, we statistically compared the antibiotic resistance of slime positive and negative *S. aureus* strains. Resistance to penicillin G, cephalothin and oxacillin in slime positive strains was significantly higher than in slime negative strains ($p < 0.05$). Similarly, resistance to tetracycline was higher in slime positive strains, but no statistically significant difference was detected among slime positive and negative strains ($p > 0.05$). The minority of tetracycline resistant strains may be the cause of this result. These findings were consistent with other studies.

In conclusion, the slime factor producing was evaluated in *S. aureus* strains isolated from various animal clinical samples. According to our results, the resistance to some antibiotics commonly used in Turkey was determined in these slime positive strains. There is a need for awareness that slime positive bacteria can be more pathogen and cause persistent infections. Also, it should be considered that whatever the mechanisms of resistance are, when treating a bacterial infection in animals, it is important to select the correct antibiotics.

References

1. Aguilar B, Amorena B, Iturralde M. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Vet Microbiol* 2001; 78(2): 183-91.
2. Amorena B, Gracia E, Monzon M, Leiva J, Oteiza C, Perez M, Alabart JL, Hernandez-Yago J. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44(1): 43-55.
3. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms. Properties, regulation and roles in human disease. *Virulence* 2011; 2(5): 445-59.
4. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39(6): 2151-6.
5. Arslan S, Özkardeş F. Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(1): 29-33.
6. Barrio B, Vangroenweghe F, Dosogne H, Burvenich C. Decreased neutrophil bactericidal activity during phagocytosis of a slime-producing *Staphylococcus aureus* strain. *Vet Res* 2000; 31(6): 603-9.
7. Baselga R, Albizu I, de la Cruz M, Del Cacho E, Barberan M, Amorena B. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. *Infect Immun* 1993; 61(11): 4857-62.
8. Boles BR, Horswill AR. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends Microbiol* 2011; 19(9): 449-55.
9. Cassat JE, Lee CY, Smeltzer MS. Investigation of biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol* 2007; 391: 127-44.
10. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6): 1771-6.
11. Christensen G, Simpson WA, Jounger JJ, Baddour LM, Barret FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985; 22(6): 996-1006.
12. Ciftci A, Findik A, Onuk EE, Savasan S. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Brazilian J Microbiol* 2009; 40(2): 254-61.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth Informational Supplement 2006; M1000-S16. Wayne S. PA, US.

14. Çiftçi A, İça T, Onuk EE, Baş B, Tosun G. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında slime faktör üretimi ve antibiyotik dirençliliği. Vet Hek Mikrobiyol Derg 2003; 3(1-2): 51-5.
15. Donlan RM, Murga R, Bell M, Toscano CM, Carr JH, Novicki TJ, Zuckerman C, Corey LC, Miller JM. Protocol for detection of biofilms on needleless connectors attached to central venous catheters. J Clin Microbiol 2001; 39(2): 750-3.
16. Fox LK, Zadoks RN, Gaskins CT. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. Vet Microbiol 2005; 107(3-4): 295-9.
17. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol 1989; 42(8): 872-4.
18. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. Trends Microbiol 2005; 13(1): 34-40.
19. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 1994; p.787.
20. Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Appl Environ Microbiol 2008; 74(2): 470-6.
21. Johannes KM, Knobloch M, Matthias A, Rohde H, Mack D. Evaluation of different methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Med Microbiol Immunol 2002; 191(2): 101-6.
22. Krukowski H, Szymankiewicz M, Lisowski A. Slime production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cases bovine mastitis. Pol J Microbiol 2008; 57(3): 253-5.
23. Ludwicka A, Switalski LM, Lundin A, Pulverer G, Wadstrom T. Bioluminescent assays for measurement of bacterial attachment to polyethylene. J Microbiol Methods 1985; 4(3-4): 169-77.
24. Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2006; 53(7): 326-32.
25. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can J Vet Res 2002; 66(2): 86-92.
26. Peacock S. *Staphylococcus aureus*. Gillespie SH, Hawkey PM. Eds. In: Principles and Practice of Clinical Bacteriology. England: John Wiley&Sons Ltd., 2006; pp. 73-98.
27. Pfaller MA, Davenport D, Bale M, Barret M, Koontz F, Massanari R. Development of the quantitative micro-test for slime production by coagulase negative staphylococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1988; 7(1): 30-3.
28. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Iowa: Blackwell Publishing Professional, 2002; p. 536.
29. Sanchez CJ, Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, Murray CK. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. BMC Infect Dis 2013; 13: 47.
30. Stewart PS. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40(11): 2517-22.
31. Türkyılmaz S, Eskiizmirliler S. Detection of slime factor production and antibiotic resistance in *Staphylococcus* strains isolated from various animal clinical samples. Turk J Vet Anim Sci 2006; 30: 201-6.
32. Türkyılmaz S, Kaya O. Determination of some virulence factors in *Staphylococcus* spp. isolated from various clinical samples. Turk J Vet Anim Sci 2006; 30: 127-32.
33. Zufferey J, Rime B, Francioli P, Bille J. Simple method for rapid diagnosis of catheter-associated infection by direct Acridine orange staining of catheter tips. J Clin Microbiol 1988; 26(2): 175-7.

Correspondence author:

Assoc. Prof. Dr. Esra ŞEKER
 Department of Microbiology
 Faculty of Veterinary Medicine
 Afyon Kocatepe University
 Ahmet Necdet Sezer Campus
 03200, Afyonkarahisar, TURKEY
 Phone: +90 272 228 1312 / 16143
 Fax: +90 272 228 1349
 E-mail: esraseker@hotmail.com



Clinical Evaluation of Intramuscular and Intraosseous Xylazine-Ketamine Anesthesia in Quails (*Coturnix coturnix japonica*)

Alkan KAMILOGLU¹, Sadık YAYLA¹, Nadide KAMILOGLU², İsa OZAYDIN¹, Başak KURT¹.

¹ Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas, Kars-TURKEY.

² Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas, Kars-TURKEY.

Summary: Purpose of this study was to compare the use of intramuscular (IM) and intraosseous (IO) xylazine-ketamine combination by monitoring clinical parameters in quails. The experiment was carried out on twenty clinically healthy mature male quails randomly divided into two groups. The first group (n=10) received the combination of 8 mg/kg Xylazine HCl 50 mg/kg and Ketamine HCl IM and second group (n=10) received: the same combination via IO route. Each quail was monitored for heart rate (HR), respiratory rate (RR), cloacal temperature (CT) and electrocardiography (ECG). The induction and duration time of anesthesia in IO group was significantly shorter than that for IM Group (P<0.05). The HR of IO group was significantly decreased on 15th, 20th and 30th min as compared to the IM group (P<0.05). When statistical differences were compared among different groups, the RR of IO group reduced significantly (P<0.05) on the 3th, 5th, 10th and 15th min than that of the IM group. There were no significant differences observed in the CT values between IO and IM group during the anesthesia. Also, reflexes disappeared in both groups throughout the anesthesia. In conclusion, sufficient anesthesia can be obtained by the use of both the IM and the IO xylazine-ketamine administration. Furthermore, it was determined that IO route can be easily used in clinical practice such as IM anesthesia in quails.

Key Words: Intramuscular, intraosseous, ketamine, quail, xylazine

Bıldırcınlarda (*Coturnix coturnix japonica*) İntramusküler ve İntraosseöz Xylazine-Ketamine Anestezisinin Klinik Olarak Değerlendirilmesi

Özet: Bu çalışmanın amacı bıldırcınlarda xylazine-ketamine kombinasyonunun intramusküler (IM) ve intraosseal (IO) kullanımını klinik parametreleri izleyerek karşılaştırmaktır. Çalışma, klinik olarak sağlıklı ve yetişkin olan 20 adet erkek bıldırcında rastgele iki gruba ayrılarak yürütüldü. Birinci gruba (n=10) 8 mg/kg Xylazine HCl ve 50 mg/kg Ketamine HCl kombinasyonu IM olarak verildi. İkinci gruba (n=10) ise aynı kombinasyon IO yolla verildi. Her bir hayvan monitörize edilerek kalp atım sayısı (HR) solunum sayısı (RR), cloacal ısı (CT) ve EKG değerleri kayıt edildi. Anestezi induksiyonu ve anestezi süresi IO grupta IM gruptan önemli derecede daha kısa bulundu (P<0.05). IM grup ile karşılaştırıldığında IO grubun HR değerlerinin 15, 20 ve 30. dakikalarda önemli derecede azaldığı belirlenmiştir (P<0.05). Gruplar arasında RR bakımından istatistiksel değişiklikler karşılaştırıldığında IO grupta 3, 5, 10 ve 15. dakikalarda IM gruba göre bir düşüş ve önemli bir fark bulundu (P<0.05). Anestezi boyunca CT değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmedi. Ayrıca her iki grupta da anestezi boyunca refleksler değerlendirildi. Sonuç olarak bıldırcınlarda xylazine-ketamine kombinasyonunun hem IM hem de IO olarak uygulandığında yeterli bir anestezi elde edilebileceği ve IO yolun klinik pratikte IM yol gibi kolaylıkla kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Bıldırcın, intramusküler, intraosseus, ketamine, xylazine

Introduction

There are many studies (2,6,7,10,11,16,17) that demonstrated the effect of anesthetic agents on metabolic, hemodynamic and cardiovascular parameters in avian veterinary practice. Although several anesthetic agents are often used to induce anesthesia, safe and effective anesthesia methods and administration route of anaesthetic agents are of great importance for small pet birds (12).

Among the ways of routine injection, IM or subcutan (SC) routes are preferred routinely in avian species. The advantages of IO injections in order to anesthesia in birds have been reported by researchers in recent years (10,15).

A dissociative anesthetic, ketamine, has been widely applied as an inducer of anesthesia characterized by marked analgesia and amnesia (8,16,17). Ketamine has become a popular and powerful analgesic for short surgical procedures (16). However, it is rarely used alone because of poor muscle relaxation, muscle tremors, myotonic

contractions, and rough recoveries. For this reason, to neutralize its side effects, ketamine is frequently used together with an α -2-adrenoceptor agonist depending on the species involved (8). Xylazine HCl, an α -2-adrenoceptor agonist, is widely used in avian species for its potent sedative, analgesic and myorelaxant properties. Ketamine in combination with xylazine that is a commonly used anesthetic in veterinary practice is also safe and effective for induction of anesthesia in birds. If properly dosed, this combination can be used to induce anesthesia with minimal adverse cardiovascular and respiratory effects (6,9,11,12,14).

This study was conducted to research if the IO administration of the xylazine-ketamine combination enhances the quality of anesthesia as compared to IM administration for general anesthesia in quails.

Materials and Methods

This study was carried out on 20 adult clinically healthy mature (26 week old) male quails (*Coturnix coturnix japonica*) with 198.07 ± 11.28 g (as Mean \pm SD) body weight. Quails provided from animal farming department of Kafkas University.

The study was started after the birds were adapted to their environment for a week. They were housed at constant room temperature with a 12-12 h light-dark cycle and fed with a wheat-based diet in accordance with the previous feeding regimen. All experiments were performed in quails deprived of food for 60 min, but allowed free access to water.

Animal research ethics committee of Veterinary Medicine in Kafkas University approved all experiments before studies were conducted (2012/04).

Study Protocols

The birds were divided into two groups on the basis of their exposure route of anesthetics as IM and IO. Quails in the IM group ($n=10$, BW = 200.7 ± 11.04) was anesthetized with 8 mg/kg xylazine (Rompun[®] 2%, 50 ml, Bayer, Germany) and 50 mg/kg Ketamine (Ketalar[®] 10 ml injectable, Pfizer-Turkey) by insulin syringe. Deep pectoral muscle was used for IM injection. Quails in the IO group ($n=10$, BW = 196.7 ± 11.74) received 8 mg/kg xylazine and 50 mg/kg ketamine with insulin syringe. In the IO group, Xylazine-ketamine was diluted at 1:1 ratio with 0.9% NaCl solution. The distal end of the left tibia was chosen for IO

administration using 14 to 20 gauge spinal needles depending the bird's size. After aseptic conditions, the knee joint of quails laid on lateral recumbency was positioned at flexion. Needle positioned the tibia tuberosity parallel to the diaphysis was inserted to medulla of tibia. Whether needle was in medullary region was determined with loss of resistance against the needle.

Measurements

Experimental quails were monitored and recorded for HR, RR, CT and ECG at initial, and on the 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40 and 50th minutes after injection by a multi-parametric monitor (Veteriner Monitör[®] MMED6000DP S6-V).

Assessment of the clinical effect of anesthesia

Records of quails in all groups were kept in terms of the induction period, duration of anesthesia and recovery period. Recorded periods were determined by using standard painful stimuli. A superficial (needle used to prick the skin) and deep pin-prick (needle inserted into the muscle) were performed on different body parts. Also, other body reflexes (righting reflex, feather plucking reflex, palpebral reflex, pharyngeal reflex) were recorded.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the commercial Minitab-16 software program (with Man-Whitney U test and Wilcoxon test followed by Friedman's test). All results were expressed as the Mean \pm Standard error of mean (SEM). A P value <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Induction and duration time of anesthesia

The induction time in the IO group (1.03 ± 0.3 min, $n=10$) was significantly shorter ($P < 0.05$) than that for the IM group (5.62 ± 0.3 min, $n=10$). On the other hand, the duration time of anesthesia in the IM group (45.60 ± 2.54 min) was significantly longer ($P < 0.05$) than the IO group (39.90 ± 2.23 min).

Heart Rate

Changes in the HR of the experimental groups according to time were shown in the *Table 1*. The HR was not changed in the IM group in relation to baseline values throughout the anesthesia.

However, in the IO group the HR was significantly decreased from the 10th min on to the 40th min when compared to baseline values ($P < 0.05$). The HR returned to baseline values at 50th min. The HR of the IO group significantly decreased on 15th, 20th and 30th min as compared to IM group ($P < 0.05$).

Sinus rhythm was changed as a bradycardia that of arrhythmia obtained from ECG data in all of the quails.

Respiratory Rate

The RR according to time and to the experimental groups was shown in the *Table 1*. While significant decrease in the RR were observed in the IM group on the 20th min ($P < 0.05$), decrease in the IO group were on the 1th to 40th min ($P < 0.01$) as compared to baseline values. When statistical alliterations were compared among the groups, reduction in the RR of the IO group were found to be significant than the IM group on the 3th, 5th, 10th and 15th min ($P < 0.05$).

Cloacal Temperature

Table 1 shows the alteration in the CT according to time and to the experimental groups. There were no significant differences observed in the CT between IO and IM group during the anesthesia. The CT began to significant decrease ($P < 0.001$) on the 10th min both the IM and IO group, and these significant decrease continued during anesthesia.

Reflexes

Assessed reflexes disappeared in both groups throughout the anesthesia. Alteration in pin-prick reflex was shown in Figure 1. Also body reflexes such as righting reflex, feather plucking reflex, palpebral reflex and pharyngeal reflex were showed in Figure 2. Because similar responses were shown in body reflexes at the same time intervals, they were presented in same figure.

Discussion

Recently researches (1,5,6,10,11) have recommended different α -2-adrenoceptor agonists such as xylazine, detomidine and medetomidine combination with ketamine HCl a suitable injectable anaesthetic agent for avian species. Also, several investigators (6,11,14,17) have recommended that xylazine-ketamine combinations usually result in

rapid and smooth induction, associated with deep analgesia, good muscle relaxation and absence of all reflexes and smooth recovery. A research in Budgerigars by Gandomania et al. (8) reported that induction and recovery time was obtained longer with ketamine-xylazine combination than with sole ketamine or xylazine. Although there were many different studies (4,5,10,11) on the anesthetic drug combination and usable or effective dose, research on route of administration is limited. The preferred route of administration of this combination are commonly IM or intravenous (IV) for birds (2,6).

The choice of administration route is often as important as the anesthetic agent. However, IO administration of injectable anesthetics and sedatives for general anesthesia in birds is restricted. It is suggested that the IO route is superior to intramuscular and comparable to IV administration (3,10,13). Because of the medullary venous channels connect to the systemic circulation, absorption of anesthetic agent has takes less time. When intravenous access is not available or not feasible, IO route is used in urgently situations to provide fluids, medication and anesthetic drug (3,13). In avian species, usually ulna or tibia can be used for this purpose for which the needle is injected through in the bone's medulla or marrow that allows immediate access to the vascular system (10,15). A study by Kamiloglu et al. (10) was reported that the advantage of IO application as the quick induction of anesthesia, shorter recovery time. Also, in our study, the initiation of anesthesia was smooth and rapid; profound analgesia and smooth recovery were obtained; and all reflexes were disappeared within both IM and IO injection of xylazine-ketamine combination. On the other hand, the IO application is advantageous for onset and duration of anesthesia as it is quicker and shorter than the IM usage. However, research (3,10,13,15) reported that haemorrhage and bone fracture may occur during cannula placement. In this study, we did not observe any complication during the IO implementation.

The researches (6,8,11,14) used xylazine-ketamine anesthesia both in birds and other animals has shown that this combination may cause cardiac and respiratory depression by dose-dependent rather than the administration route. Xylazine-ketamine combination can be used to remove the side effects of xylazine on cardiovascular and respiratory system (6). However, the elimination of cardio-respiratory depressive effect of this combination cannot always be possible. Ketamine, a dissociative anesthetic, has a stimula

Table 1. Effect on the HR, RR and CT of IO and IM injection of Xylazine/ketamine combination at different time points

Values	Groups	0 min	1 min	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	40 min	50 min	Statistical significant (Wilcoxon Test)
HR	IM	357.7±3.8 ^a	330.8±20.1	334.3±30.1	323±49.6	323.4±41.0	324.7±38.7	342.3±37.3	318.3±52.7	329±37.2	332.5±31.8	P>0.05
	IO	357.7±3.8 ^a	342.8±22.2 ^{ab}	329.6±48.7 ^{abc}	311.9±42.4 ^{abc}	302.1±42.9 ^{bc}	293.6±32.9 ^{bc}	279.6±39.5 ^c	260.8±46.7 ^c	300±42.8 ^c	344.4±35.3 ^{ab}	P<0.01
Statistical significant (Mann Whitney U Test)		P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P>0.05	P>0.05	
RR	IM	17.1±3.2	15.9±2.9 ^b	15±2.5 ^b	14.6±2.0 ^b	14.6±1.1 ^b	13.8±1.1 ^b	13.4±1.4 ^b	13.9±1.4 ^b	15.6±3.9 ^b	17.1±4.3	P<0.05
	IO	17±3.0 ^a	14.3±2.7 ^b	12.4±1.9 ^{bc}	11.3±2.1 ^c	11.5±1.0 ^c	11.7±1.2 ^c	12.5±1.4 ^{bc}	13.4±1.4 ^{bc}	14.1±1.2 ^{bc}	17±2.6 ^a	P<0.001
Statistical significant (Mann Whitney U Test)		P>0.05	P>0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	
CT	IM	41.4±0.6 ^a	41.1±0.7 ^a	40.6±0.8 ^a	40.1±1.1 ^{ab}	39.1±1.2 ^b	38.9±1.0 ^b	38.4±0.9 ^{bc}	37.5±1.4 ^c	36.9±1.1 ^c	36.2±1.4 ^c	P<0.001
	IO	41.1±0.8 ^a	41.1±0.6 ^a	40±0.3 ^{ab}	40.1±1.2 ^{ab}	39.3±1.9 ^b	38.1±1.1 ^{bc}	37.9±0.8 ^c	37.6±0.8 ^{cd}	36.8±1 ^{cd}	36.1±1.3 ^d	P<0.001
Statistical significant (Mann Whitney U Test)		P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	

^{a, b, c, d}: The differences between the means of time carrying various letters in the same line are significant

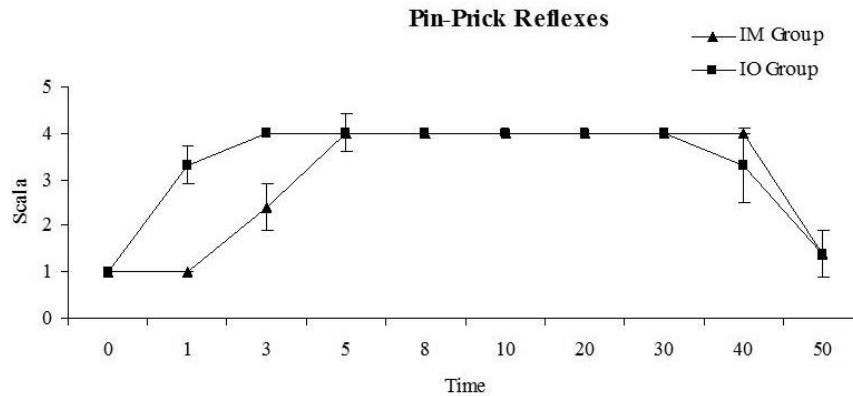


Figure 1. Alteration in pin-prick reflexes induced by IM and IO administration of xylazine/ketamine combination. Median analgesic scores in response to a standard noxious stimuli (pin-prick reflex). 1; no analgesia, 2; mild analgesia, 3; moderate analgesia and 4; complete analgesia.

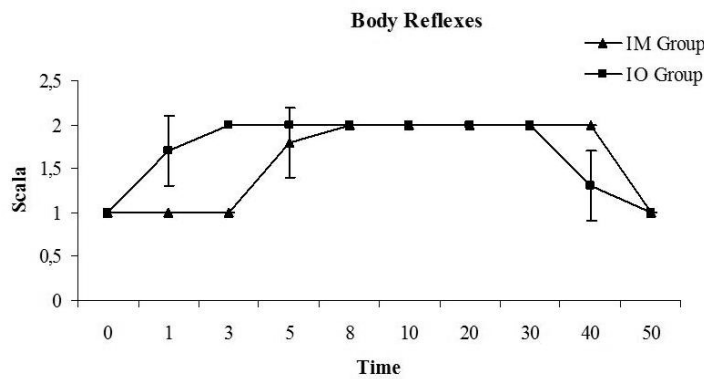


Figure 2. Analgesia scores based on body reflex such as righting reflex, feather plucking reflex, palpebral reflex, pharyngeal reflex. 1; no analgesia, 2; complete analgesia.

tory effect on cardiovascular activity and does not depress respiration (6). An α_2 -adrenoceptor agonist, xylazine, connect to the pre-and postsynaptic α_2 -adrenoceptor, leads to changes in the intrinsic membrane and inhibit the release of norepinephrine. Thus, increase in parasympathetic activity and a decrease in peripheral sympathetic activity can cause decline in heart rate as bradycardia, and blood pressure as hypotension. Also, it is known that xylazine has a depressive effect on the respiratory system (6,14). Research in domestic pigeon (5,6,12) and quails (4) also showed that an α_2 -adrenoceptor agonist and ketamine combination lead to decrease in heart and respiratory rate and body temperature.

Moreover, a study in pigeon by Duranni et al. (6) reported that xylazine-ketamine combination creates hypothermia, respiratory depression and bradycardia by IM usage of this combination. In our study, general anesthesia was achieved with sufficient muscle relaxation, without tremors and convulsion, smooth and fast recovery by the use of ketamine xylazine combination both in the IM group and the IO group in quails. But, it was found in the present study that the xylazine-ketamine anesthesia led to cardio-respiratory depression as bradycardia, decreased respiratory rate and hypothermia, quails in both groups. However, the researches related to anesthesia reported that decrease in body temperature was associated with

a slow down in the metabolism rather than the anesthetic agents used (6,14).

In conclusion, if a quick and convenient way of anesthesia for urgent operation is desired IO route can be used as an alternative way. Moreover, using the ketamine-xylazine combination considered as a viable choice that resulted in a sufficient and appropriate anesthesia in quails.

References

1. Aksoy O, Ozaydin I, Kirmizigül AH, Kilic E, Ozturk S, Kurt B, Yayla S, Sözmen M, Atakişi E. Evaluation of experimental subarachnoid analgesia with a combination of detomidine and ropivacaine for flank analgesia in cows. *Vet Arhiv* 2012; 82 (5): 463-72.
2. Azizpour A, Hassani, Y. Clinical evaluation of general anesthesia with a combination of ketamine HCl and diazepam in pigeons. *Agric J* 2012; 7 (2): 101-5.
3. Brickman KR, Krupp K, Rega P, Alexander J, Guinness M. Typing and screening of blood from intraosseous access. *Ann Emerg Med* 1992; 21 (4): 414-7.
4. Durrani UF, Ashraf M, Khalid A. Comparative efficacy of detomidine and detomidine-ketamine cocktail in quails. *Pakistan Vet J* 2005; 25 (4): 197-9.
5. Durrani UF, Khan MA, Ahmad SS. Comparative efficacy (sedative and anaesthetic) of detomidine, ketamine and detomidine-ketamine cocktail in pigeons (*Columba livia*). *Pakistan Vet J* 2008; 28 (3): 115-8.
6. Durrani UF, Ashraf M, Khan MA. A comparison of the clinical effects associated with xylazine, ketamine, and a xylazine-ketamine cocktail in pigeons (*Columba livia*). *Turk J Vet Anim Sci* 2009; 33 (5): 413-7.
7. Eyarefe OD, Oguntoye CO. A randomized trial of low-dose ketamine and lignocaine infiltration for laparo-caecectomy in layer chickens. *Int J Anim Veter Adv* 2012; 4 (4): 252-5.
8. Gandomania MJ, Tamadona A, Mehdizadehb A, Attarana HR. Comparison of different ketamine-xylazine combinations for prolonged anaesthesia in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet Scan* 2009; 4 (1): 21-3.
9. Hartsfield SM. Advantages and guidelines for using ketamine for induction of anesthesia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1992; 22 (2): 266-7.
10. Kamiloglu A, Atalan G, Kamiloglu NN. Comparison of intraosseous and intramuscular drug administration for induction of anesthesia in domestic pigeons. *Res Vet Sci* 2008; 85: 171-5.
11. Maiti SK, Tiwary R, Vasan P, Dutta A. Xylazine, diazepam and midazolam premedicated ketamine anaesthesia in White Leghorn cockerels for typhlectomy. *S Afr Vet Ver* 2006; 77 (1): 12-8.
12. Moghadam AZ, Sadegh AB, Sharifi S, Habibian S. Comparison of intranasal administration of diazepam, midazolam and xylazine in pigeons: Clinical evaluation. *IJVST* 2009; 1 (1): 19-26.
13. Sawyer RW, Bodai BI, Blaisdell FW, McCourt MM. The current status of intraosseous infusion. *J Am Coll Surg* 1994; 179 (3): 353-60.
14. Picollo C, Serra AJ, Levy RF, Antonio EL, dos Santos L, Tucci PCF. Hemodynamic and thermoregulatory effects of xylazine-ketamine mixture persist even after the anesthetic stage in rats. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2012; 64 (4): 860-4.
15. Valverde A, Bienzle D, Smith D, Dyson DH, Villiant AE. Intraosseous cannulation and drug administration for induction of anaesthesia in chickens. *Vet Surg* 1993; 22 (3): 240-4.
16. Yayla S, Kacar C, Kaya D, Merhan O, Aksoy O, Kilic E, Kaya S. Clinical, biochemical and hemodynamic effects of the intrathecal ketamine for ovariohysterectomy in bitches. *Bull Vet Inst Pulawy* 2012; 56 (3): 299-303.
17. Yayla S, Kilic E. The comparison of clinical, histopathological and some hemodynamic effects of spinal anesthesia applied in dogs through bupivacaine HCl and ropivacaine HCl in two different concentrations. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2010; 16 (5): 835-40.

Correspondence author:

Assist. Prof. Dr. Sadık YAYLA
Department of Surgery, Faculty of
Veterinary Medicine, University of Kafkas,
Kars, TURKEY,
+90 474 242 6807-5206
E-posta: sadikyayla@gmail.com



Sütçü İneklerde Klasik Ovulasyon Senkronizasyonu Protokolünde Progesteron ve Östrojen Uygulamalarının Gebelik Oranlarına Etkisi*

Seyit Sami KARYAĞDI¹, Ömer Orkun DEMİRAL², Murat ABAY³

¹ Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tokat İl Müdürlüğü, Tokat-TÜRKİYE

² Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme, Suni Tohumlama ve Androloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

³ Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Özet: Sunulan çalışmada, primipar ineklerde modifiye ovulasyon senkronizasyonu tekniği araştırıldı. Çalışmada hayvan materyali olarak 84 adet primipar holstein inek kullanıldı. İnekler rastgele olarak iki gruba ayrıldı. Birinci gruptaki (Grup 1-Kontrol, n=43) ineklerde klasik ovulasyon senkronizasyonu tekniği uygulandı. İkinci gruptaki bütün hayvanlara (Grup 2, n=41) 0. gün GnRH enjeksiyonu yapıldı. İkinci gün östrojen tableti çıkarılmış progesteron releasing intravaginal device (PRID) vaginaya takıldı. Yedinci gün çıkarıldı ve hayvanlara PGF2α enjeksiyonu intramuskuler (IM) olarak uygulandı. PRID'lerden çıkarılan östrojen tabletleri çalışma grubundaki hayvanların serviks'in ön bölümüne bırakıldı. Dokuzuncu gün hayvanlara GnRH enjeksiyonu yapıldı ve bu uygulamadan 16 saat sonra ineklere sabit zamanlı olarak tohumlama yapıldı. Suni tohumlamadan iki gün sonra dokuz gün süresince hayvanların kendilerine ait PRID'ler intravaginal takıldı. Gebelik teşhisleri, tohumlamadan 35 gün sonra transrektal ultrason muayenesi ile yapıldı. Birinci ve ikinci gruplarda gebelik oranları sırasıyla % 44.2 ve % 58.5 (p>0.05) olarak tespit edildi. Sonuç olarak; konu ile ilgili yeni çalışmalar yapılmasının sığırlarda dölveriminin artırılmasına katkıda bulunacağı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: İnek, Ovsynch, PRID

The Effect of Progesterone and Estrogen Applications in Classical Ovulation Synchronization Protocol on Pregnancy Rates in Dairy Cows

Summary: In the present study, the effectiveness of a modified ovulation synchronization technique was investigated in primiparous cows. In the study 84 primiparous Holstein cows were used as the animal material. Cows were randomly divided into two groups. In the first group (Group 1-control, n=43) animals received the classic ovulation synchronization procedure. In the second group (Group 2, n=41) a modified ovulation synchronization technique was applied. All animals in second group were injected GnRH at day 0, fitted a modified (without the estradiol capsule) PRID at day 2, removal of PRID and IM injection of PGF2α at day 7, second GnRH administration at day 9 and timed artificial inseminations (TAI) were applied 16 hours after the second GnRH injection. The removed PRIDs were fitted the same animals again 2 days after the TAI for 9 days. Pregnancy diagnosis was conducted by transrectal ultrasonography 35 days after the TAI. The pregnancy rates in first and second groups were detected as 44.2 % and 58.5 % respectively (p>0.05). Further studies are suggested to improve the reproductive traits in dairy cows.

Key Words: Cow, Ovsynch, PRID

Giriş

Hayvancılık işletmelerinde verimlilik, süt ve yavru verimi ile doğru orantılıdır. Verimin artırılması ancak üremenin düzenlenmesi ve denetlenmesi ile mümkündür. Sığırlar işletmelerinde yılda bir yavru alınması temel hedeflerden biridir (11).

İneklerde laktasyon, doğumla birlikte başlar. Yeniden gebe kalıp doğum olmadıkça süt verimlerinde azalma olur. Sığırlar yetiştiriciliğinde üremenin verimliliği ve denetlenmesi bu sebeple büyük önem taşır. Normal şartlarda, ineklerin doğumdan sonra tekrar östrus gösterip 80 - 85. güne kadar gebe kalmaları istenir (9). İşletmelerde artan süt verimi ile beraber fertilitede önemli düşüşler gözlenmektedir. Yüksek süt verimli ineklerde; doğum sonrası östrus davranışlarının belirlenememesi veya anöstrus şekillenmesi gibi nedenlerden dolayı ekonomik zaman aralığında tohumlama güçleşmektedir. Sütçü ineklerin % 80'inde doğum sonrası ilk ovulasyon 50 gün içerisinde gerçekleşmekte, ancak bunların % 54-68'i normal sıklık faaliyetine

Geliş Tarihi/Submission Date : 09.04.2014

Kabul Tarihi/Accepted Date : 28.05.2014

* Bu çalışma aynı isimli Yüksek Lisans tezinden özetlenmiş ve IV. Veteriner Jinekoloji Kongresinde (Uluslararası Katılımlı 4-7 Kasım 2010 Belek Antalya) poster bildiri olarak sunulmuştur.

devam edebilmektedir. Östrus tespiti ve uygun zaman aralığında tohumlama reproduktif performans üzerine doğrudan etki gösterir (6).

İşletmelerde reproduktif performansı etkileyen bir diğer neden de embriyonik kayıplardır. Son yıllarda embriyonik ölümlerin hormon uygulamaları ile engellenmesi üzerine çok sayıda çalışma yapılmaktadır (11).

Sığır yetiştiriciliğinde doğru östrus veya ovulasyon senkronizasyonu işletme karlılığında önemli bir yer tutmaktadır. İneklerde reproduktif verimliliği artırmak, östrus tespiti ve uygun zaman aralığında tohumlama yapılabilmesi, doğum sonrası gözlenen anöstrus sorunlarının giderilmesi için, östrus veya ovulasyon senkronizasyonları teknikleri kullanılmaktadır. Senkronizasyon çalışmalarının diğer faydaları arasında uygulama kolaylığını sağlamak, insan kaynaklı hataları azaltmak ve işçilik maliyetlerini düşürmek gibi faktörler bulunmaktadır. Östrus senkronizasyonu uygulamalarında östrusların ve/veya ovulasyonun tam sağlanamaması, ovulasyonun bir haftalık süreye yayılması gibi nedenlerinden dolayı istenilen gebelik oranları elde edilememektedir (12, 15). Ovulasyon senkronizasyonu yöntemleri ile folliküler gelişim ve korpus luteumun regresyonu senkronize edilerek östrus belirtilerine bakılmaksızın sabit zamanlı tohumlamaya imkan sağlamak mümkün olabilmektedir. Ovulasyon zamanı bilinen inek istenilen zaman diliminde tohumlanarak reproduktif verim için gerekli gebelik oranı sağlanabilecektir. Doğal siklusun taklit edilmeye çalışıldığı bu protokollerde; progestagenler, prostaglandin (PG) F2 α , gonodotropin salgılatıcı hormon (GnRH), luteinleştirici hormon, follikül uyarıcı hormon, östrojen gibi hormonlar kullanılmaktadır (4, 23).

Sunulan bu çalışmada; klasik ovulasyon senkronizasyonu yöntemlerine progesteron (P4) ve östrojen hormonu uygulamalarının ovulasyon senkronizasyonu yönteminin geliştirilmesi ve döl verimine etkisinin araştırılması hedeflendi.

Gereç ve Yöntem

Çalışmanın yürütüldüğü yer, kullanılan hayvan materyali ve beslenmesi

Bu çalışma Tokat ilinde Kuzey 40° 22' 58" Doğu 36° 04' 43" koordinatlarındaki Kazova Vasfi Diren Tarım İşletmesinde yapıldı. Araştırmada genel muayene sonunda sağlıklı olduğu belirlenen, doğum kayıtlarına göre bir önceki doğumunu normal gerçekleştirmiş, süt verimleri açısından birbirine yakın grupta ve postpartum en az 60 gün geçmiş

84 baş holstein ırkı primipar inek kullanıldı. İnekler çalışma süresi boyunca temiz ve havadar barınaklarda barındırıldı ve sürekli gezebilecekleri; hayvan başına 16m² alana sahip olmaları sağlandı. İneklere çalışma boyunca, % 18 ham protein ve 2700 m/cal metabolik enerji içeren bir örnek yemleme programı uygulandı. Hayvanların devamlı temiz su kaynağına ad libitum sahip olması sağlandı.

Çalışma düzeni

İşletmedeki sığırların "Westfalia surge dairyplan C21, Germany" sığır takip sistemi ve pedometre ile günde üç defa kızgınlık, sağlık ve verim durumları takip edildi.

Çalışmaya alınan primipar sütçü ineklerden birinci gruptaki hayvanlara (n=43) klasik ovulasyon senkronizasyonu protokolü uygulandı. Bu amaçla 0. gün 100 µg GnRH (Gonadrenalin diasetat-Overalin®, Ceva-Dif, Türkiye) im olarak enjekte edildi. Yedi gün sonra 500 µg PGF2 α (Kloprostenol-Reprodin®, Bayer, Türkiye) im olarak yapıldı. İki gün sonra (9. gün) tekrar 100 µg GnRH uygulandı. Hayvanlar son GnRH uygulamasından 16 saat sonra işletme genetik programı dahilinde bulunan dondurulmuş boğa spermaları ile sabit zamanlı olarak tohumlandı.

Çalışmaya alınan ikinci gruptaki hayvanlara (n=41) 0. gün 100 µg GnRH enjeksiyonu im olarak uygulandı. İki gün sonra östrojen tableti çıkarılmış östrojen tabletleri alınmış P4 salgılayan vaginal alet (PRID®, Ceva-Dif, Türkiye) uygulaması yapıldı. Yedinci gün PRID çıkarıldı ve aynı gün hayvanlara 500 µg PGF2 α enjeksiyonu yapılarak östrojen tabletleri hayvanlarda serviksin önüne bırakıldı. Hayvanlardan çıkarılan PRID'ler klorheksidin solüsyonuyla yıkandıktan sonra kurulandı ve her bir hayvandan çıkarılan PRID hayvan küpe numaralarına göre ayrı ayrı numaralandırılarak muhafaza edildi. İki gün sonra (dokuzuncu gün) hayvanlara 100 µg GnRH enjeksiyonu yapıldı ve son GnRH uygulamasından 16 saat sonra hayvanlar işletme genetik programı dahilinde bulunan dondurulmuş boğa spermaları ile tohumlandı. Tohumlamadan iki gün sonra çalışma grubundaki hayvanlara östrojen tableti olmayan ve kendisinden çıkarılan PRID'ler dokuz gün boyunca uygulandı. Suni tohumlamadan 11 gün sonra PRID'ler çıkarıldı.

Suni tohumlamadan 35 gün sonra çalışmaya alınan tüm gruptaki hayvanlara ultrason ile gebelik muayeneleri yapıldı. Gebelik muayenelerinde Agrosan marka ultrason (Agrosan A14, Fransa) ve 7.5 MHz rektal prob kullanıldı.

İstatistiksel analiz

Çalışmada yapılan istatistiki analizlerde SPSS 14.1 (Serial Number: 9869264) paket programı kullanıldı (SPSS Inc. Chicago, IL). Gruplar arasında gebelik ve östrus oranlarının karşılaştırılması Pearson Ki-Kare testi ile yapıldı.

Bulgular

Sunulan çalışmada; suni tohumlamadan 35 gün sonra elde edilen gebelik bulguları, Tablo 1'de verilmiştir.

Klasik ovulasyon senkronizasyonu yapılan kontrol grubunda (Grup 1) 43 baş sığırdan 19'unda gebelik elde edilmiştir. Gebelik oranı % 44.2 olarak belirlendi. Modifiye ovulasyon senkronizasyonu uygulaması yapılan çalışma grubunda (Grup 2) tohumlanan 41 baş primipar ineğin 24'ünde gebelik tespit edildi. Gebelik oranları % 58.5 olarak belirlendi ($p>0.05$).

Sunulan bu çalışmada tohumlama öncesinde ve esnasında kızgınlık belirtileri gösteren (vaginal akıntı, vaginal hiperemi, serviks açıklığı, sütü azaltma, durma, atlama, bağırma, hareketlilik) sığırların oranı Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2'de görüldüğü gibi tohumlama öncesinde ve esnasında hayvanlarda gözlemlenen kızgınlık belirtilerinden her biri ayrı ayrı (+) veya (-) ile işaretlendi ve gözlemlenen belirtilerin hayvanlardaki çokluğuna göre kızgınlık teşhisi konuldu. Çalışmada kullanılan hayvanlardan kontrol grubunda (Grup 1) bulunan 43 inekten 25 tanesinde kızgınlık belirtileri saptandı. Grup 1'de kızgınlık gösterenlerin oranı % 58.1 olarak tespit edildi. Çalışma grubunda (Grup 2) 41 inekten 31 tanesinde kızgınlık belirtileri saptandı ve kızgınlık belirtisi gösterenlerin oranı % 75.6 olarak tespit edildi ($p>0.05$).

Tablo 1. Suni tohumlamadan sonra 35. gün gebelik bulguları

Gruplar	Gebe (+) n (%)	Gebe (-) n (%)
Grup 1	19(%44,2)	24 (%55.8)
Grup 2	24% (54.5)	17 (41.4)

Ki-kare değeri : 0.188 $p>0.05$

Tablo 2. Tohumlama esnasında ve öncesi kızgınlık bulguları

Gruplar	Östrus (+) n (%)	Östrus (-) n (%)
Grup 1	25 (%58.1)	18 (%41.9)
Grup 2	31 (%75.6)	10 (%24.4)

Ki-kare değeri : 0.09 $p>0.05$

Tartışma ve Sonuç

Sığır yetiştiriciliğinden istenen düzeyde verimin alınabilmesi ve karlılığın sürdürülebilmesi, yılda bir buzağı elde edilebilmesine bağlıdır (9). Bunun için postpartum 80-85 gün içerisinde ineklerin gebe bırakılmaları gerekmektedir (24). Buradaki başarı ise belirli bir bekleme süresinden sonra ineklerin doğal östrus, östrus senkronizasyon ve ovulasyon senkronizasyonu ile suni tohumlamaya elverişli hale gelmesine bağlıdır. İneklerin doğum sonrası sağlıklı bir dönem geçirmeleri ekonomik buzağılama aralığı hedefinin yakalanmasında önemli yer tutmaktadır. Büyük oranda, beslenme yetersizliği ve yüksek süt verimi sebebiyle oluşan hormonal dengesizlikler nedeniyle östrusların görülebilmesi (suböstrus) veya kısa süreli ve aralıklı olması (parasiklik östrus), östrusların belirlenmesi konusunda yetiştiricileri sıkıntıya sokmaktadır. Bununla birlikte dişilerin seksüel aktiviteleri ve ovaryum fonksiyonları normal olsa dahi, sütçü sürülerde postpartum östrusların yaklaşık % 50'sinin östrus takibi hatalarından dolayı belirlenemediği bildirilmiştir (13, 14). Buzağılama aralığının bir gün bile aksaması işletme gelirlerinde inek başına günlük beş dolara yakın bir zarara neden olabilmektedir. Bu nedenle doğru östrus veya ovulasyon senkronizasyonu inek yetiştiriciliğinde önemli bir ekonomik kazanç parametresidir (11, 14, 19).

Reproduktif performansın düşük olmasında en büyük etmenlerden birisi de embriyonik kayıplardır. Laktasyondaki sütçü ineklerde tohumlamayı takip eden 27-45. günlerde embriyo kaybı %21'e kadar ulaşabilmektedir (3, 8). Fekondasyonu takip eden 24 gün içerisindeki kayıplar; erken embriyonik kayıp, 24. günden sonraki kayıplar ise geç embriyonik kayıp olarak adlandırılmaktadır. Embriyo kaybının önlenmesi için tohumlamadan sonra P4 uygulaması preimplantasyon dönemde embriyonun hayatta kalmasına yardımcı olduğu ve luteolisisi engelleyerek gebeliğin devamını sağladığı bildirilmiştir (3, 8).

Aksoy ve ark. (1) inek ve düvelerde östrus belirleme hataları ve suni tohumlama uygulamasındaki öneminin araştırılması amacıyla karışık ırk 107 sığır üzerinde çalışma yapmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında, östrusta olduğu iddiası ile kliniğe getirilen ve suni tohumlama yapılmak istenen hayvanlardan sadece % 52.3'ünün gerçekten östrusta olduğunu % 47.7'sinin ise suni tohumlama yapılabilecek durumda olmadıklarını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada senkronizasyon uygulanan ineklerden kontrol grubunda (Grup 1 n=43) %58.1 çalışma grubunda ise (Grup 2 n=41) %75.6 kızgınlık oranları ve gruplar arasında %44.2 ve %58.5 ge-

belik oranları tespit edildi. Çalışmada elde edilen bulgular sonucunda; ovulasyon senkronizasyonu protokollerinin işletmelerde uygulanması ile işletmelerdeki östrus tespiti hatalarından kaynaklanan sorunların azalacağı, işçilik maliyetlerin azaltılmasına yardımcı olacağı, böylece zamansız tohumlama uygulamalarının engellenmesi ile gebelik oranlarının yükseltilerek işletme verimliliğinin artırılacağı düşünüldü.

Topaloğlu ve ark. (21)'nin İngiltere'deki siyah-alaca sığırların döl verim özellikleri üzerine yapmış oldukları çalışmada işletmelerde bulunan hayvanlarda kızgınlık takibi yapılarak elde edilen gebelik oranlarını 1. tohumlamada % 58.5 olarak bildirmişlerdir. Aynı çalışmada işletmelerdeki doğum-gebe kalma arasındaki servis periyodu 112 gün olarak belirtilmiştir. Sönmez ve ark. (17), ineklerde normal kızgınlık belirtileri sonucu yapılan suni tohumlamalar neticesinde elde edilen gebelik oranlarının tespitine yönelik yaptıkları çalışmalarında % 65.4 gebelik oranı bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada klasik ovulasyon senkronizasyonu uygulanan grupta (Grup 1 n=43) gebelik oranı % 44.2 çalışma grubunda (Grup 2 n=41) % 58.5 olarak tespit edildi. Grup 1'de tespit edilen gebelik oranlarının (% 44.2) diğer çalışmalarda bildirilen (17, 21) doğal kızgınlık sonucu elde edilen gebelik oranlarına göre düşük olduğu belirlendi. Kızgınlık takibi yapılarak tohumlanan ineklerin gebelik oranlarının, modifiye ovulasyon senkronizasyonu yapılan Grup 2'de bulunan hayvanlardaki gebelik oranlarıyla ise bazı çalışmalar (21) ile birbirine yakın, bazı çalışmalardan ise düşük (17) olduğu görüldü. Sunulan çalışmada kullanılan modifiye ovulasyon senkronizasyon tekniğinin maliyetinin yüksek olmasına karşın, doğal kızgınlık sonucu tohumlanan hayvanlar ile yakın gebelik oranlarının yakalanması, işletmelerdeki doğum-gebe kalma aralığının kısaltılabilmesi, işçilik maliyetlerinin azaltılması, kızgınlık tespitindeki hatalardan kaynaklı yanlış tohumlamaların engellenmesindeki katkılarından dolayı protokolün işletmelerde kullanılmasının reproduktif verim ve işletme karlılığı açısından faydalı olabileceği düşünüldü.

Sığırcılık işletmelerinde döl verimi sorunların azaltılması ve reproduktif verimin artırılması amacıyla yapılan östrus senkronizasyon protokollerinde farklı araştırmacılar tarafından birçok çalışma yapılmıştır. Östrus senkronizasyonu amacıyla yapılan çalışmalarda Semacan ve ark (16) gebelik oranlarını %50 olarak, Alaçam ve ark. (2) tek doz PGF2α uygulanan ineklerde % 57.1 ve 11 gün ara ile iki doz PGF2α uygulanan ineklerde % 61.5 olarak, Tek ve ark. (19) % 46.2 olarak bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada klasik ovulasyon senkronizasyo-

nu uygulanan kontrol grubunda % 44.2 gebelik oranı elde edildi. Ovulasyon senkronizasyonu ile elde edilen sonuçların östrus senkronizasyonu sonucunda elde edilen gebelik oranlarından düşük olmasının; sabit zamanlı tohumlamadan kaynaklanabileceği düşünüldü. Çalışma grubunda elde edilen % 58.5 gebelik oranı östrus senkronizasyonu uygulaması yapılan çalışmaların bazılarında yüksek (16, 19) bazı çalışmalardan ise düşük (2) olduğu görüldü. Modifiye ovulasyon senkronizasyonu ile ovulasyon protokollerine östrojen ve progesteron takviyelerinin gebelik oranlarını artırdığı, östrus senkronizasyonları sonucunda elde edilen gebelik oranlarına yakın oranlar yakalanabileceği görüldü. Modifiye ovulasyon senkronizasyonu ile ovulasyon senkronizasyon protokollerindeki sabit zamanlı tohumlamadan kaynaklanabilen düşük gebelik oranlarının engellenebileceği düşünüldü.

Vasconcelos ve ark. (22) siklusun 5-9. ve 17-21. arasındaki günleri arasındaki dönemde başlatılan ovulasyon senkronizasyon çalışmaları sonucunda sırası ile % 96 ve % 77'lik bir ovulasyon gerçekleşerek iki gün sonra yeni bir folliküler dalganın başladığını bildirmişlerdir. Çalışmada kullanılan sığırların ultrasonografik muayenesi yapılarak ilk GnRH uygulamasının siklusun 5-9. veya 17-21. günleri arasında durumunda PGF2 α enjeksiyonuna cevap verebilecek bir korpus luteum'a ve ikinci GnRH enjeksiyonuna cevap verebilecek dominant follikülün varlığına sahip olunması ile elde edilecek gebelik oranları daha da artırılabilir. Senkronizasyon uygulamalarına ultrasonografik muayeneler ile ovaryumlardaki folliküllerin gelişimlerine göre başlanması durumunda senkronizasyon çalışmaları için yapılan hormon uygulamalarına cevap verebilecek folliküler ve luteal yapıların oranı artırılarak yüksek gebelik oranları elde edilebileceği ve doğum gebe kalma aralığının kısaltılarak işletme karlılığının artırılacağı düşünüldü.

Bülbül ve ark. (5) siklusun farklı dönemlerinde başlatılan Ovsynch protokolünün etkisini araştırdıkları çalışmalarında östrus, metöstrus, diöstrus ve proöstrus dönemlerinde sırasıyla % 58.3, % 44.4, % 40, % 50 gebelik oranları bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada klasik ovulasyon senkronizasyonu (Ovsynch) uygulanan kontrol grubunda % 44.2 gebelik oranı tespit edildi. Çalışmamızda tespit edilen sonuçlar Bülbül ve ark. (5) bildirmiş olduğu klasik ovulasyon senkronizasyonu uygulanan gruplardaki sonuçlar arasında metöstrus döneminde başlanılan grup ile uyumlu, diöstrus döneminde başlanılan gruba göre yüksek, östrus ve proöstrus döneminde başlanılan gruplara göre ise düşük olduğu görüldü. Çalışmamızda kullanılan ineklerin gebelik sonuçlarına bakıldığı zaman senkronizasyon

uygulamasına başlama dönemlerinin metöstrus ve diöstrus dönemlerine denk geldiği düşünüldü. Çalışma grubunda tespit edilen % 58.5 gebelik oranları Bülbül ve ark. (5) bildirdiği sonuçlara göre yüksek bulundu. Çalışma grubunda tespit edilen gebelik oranlarının, bildirilen (5) sonuçlardan yüksek olmasında P4 uygulamasının erken embriyonik ölümleri engellemesinden kaynaklanabileceği düşünüldü. Senkronizasyon uygulanacak ineklerin siklus dönemleri belirlenerek hormon uygulamalarının başlatılması durumunda elde edilecek gebelik oranlarının artırılacağı düşünüldü.

Kasimanickam ve ark. (10) progesteron tabanlı Ovsynch ve Cosynch protokollerinin gebeliğe etkisini araştırdıkları çalışmalarında; Ovsynch ve Cosynch protokollerinde ilk GnRH enjeksiyonu ve PGF2 α arasındaki dönemde hayvanlara CIDR uygulamış ve Ovsynch-CIDR grubunda %54.4 Cosynch-CIDR grubunda ise % 52.2 gebelik oranı bildirmişlerdir. Sunulan çalışmadaki progesteron hormonu uygulaması yapılan Grup 2'de % 58.5 gebelik Kasimanickam ve ark. (10) bildirdiği sonuçlardan yüksek, Grup 1'de elde edilen % 44.2 gebelik oranı ise düşük tespit edildi. Sunulan çalışma ile elde edilen sonuçlar ve Kasimanickam ve ark. (9) bildirdiği sonuçlar karşılaştırıldığı zaman çalışma grubun da elde edilen gebelik oranının yüksek olmasında; suni tohumlama sonrası P4 uygulamasının erken embriyonik ölümleri engellemesinden kaynaklanabileceği düşünüldü. Suni tohumlama öncesinde uygulanan östrojen uygulamasının ise; kızgınlık belirtilerinin artmasına ve tohumlama esnasında uygulanan manipülasyonları kolaylaştırmasına sağladığı olumlu katkılardan kaynaklanabileceği düşünüldü. Klasik ovulasyon senkronizasyonu yapılan Grup 1'de gebelik oranlarının düşük olmasında ise Kasimanicman ve ark. (10) yapmış oldukları çalışmada GnRH ve PGF2 α uygulamaları arasındaki dönemde P4 uygulamasının, follikül oluşumunu homojenize ederek ikinci GnRH enjeksiyonuna cevap verebilecek graaf follikül oluşumunda ve ovulasyonların artmasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Demiral ve ark. (7) düve ve multipar ineklerde Cosynch prosedürünün etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında düveler de % 51 multipar ineklerde ise % 41 gebelik oranı tespit etmişler, aynı çalışmada düveler de Cosynch prosedürünün daha etkin olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada klasik Ovsynch protokolü uygulanan inekler de (Grup 1) % 44.2 modifiye ovulasyon senkronizasyonu yapılan ineklerde ise (Grup 2) % 58.5 gebelik oranı tespit edildi. Ovsynch protokolü uygulanan kontrol grubun da (Grup 1) tespit edilen gebelik oranları Demiral ve ark. (7) bildirdiği çalışmadaki

gebelik oranlarına göre yüksek bulundu. İneklerde Ovsynch protokolünün Cosynch protokolüne göre gebelik oranlarında daha etkin olabileceği düşünüldü. Modifiye ovulasyon senkronizasyon protokolünde elde edilen % 58.5 gebelik oranı, Demiral ve ark. (7) tarafından bildirilen çalışmada elde edilen sonuçlardan yüksek bulundu. Sunulan çalışmada senkronizasyon protokolünde kullanılan P4 ve östrojen uygulamasının; erken embriyonik kayıpların engellenmesinde, östrus belirleme ve tohumlama esnasındaki uygulama rahatlığına sağladığı katkılardan dolayı ovulasyon senkronizasyonu yöntemlerinde elde edilen gebelik oranlarını sayısal olarak artırdığı, doğum gebe kalma aralığının kısaltılmasına ve hayvan takibi hatalarından kaynaklanan sorunları azaltarak işletme karlılığı artıracağı için faydalı olacağı düşünüldü.

Mialot ve ark. (12) Ovsynch ve progesteron tabanlı ovulasyon senkronizasyonu çalışmalarında birinci gruba klasik ovulasyon senkronizasyonu uygulamışlar ve bu gruptaki hayvanlarda % 46.3 gebelik oranı bildirmişlerdir. İkinci grup'a PRID+PGF2α+eCG enjeksiyonları ile ovulasyon senkronizasyonu uygulanmış ve %53.8 gebelik oranı tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada tespit edilen % 44.2 ve % 58.5 gebelik oranları ile karşılaştırılmasında; P4 uygulanan çalışma grubundaki ineklerde elde edilen gebelik oranının yüksek olması, tohumlama sonrası PRID uygulamasının erken embriyonik ölümleri engellemesinden kaynaklanabileceği düşünüldü. Sunulan çalışmada kontrol grubu olan klasik ovulasyon senkronizasyonu yapılan ineklerden elde edilen gebelik oranlarının ise (% 44.2) Mialot ve ark. (12) yapmış olduğu çalışma ile uyumlu olduğu görüldü.

Bridges ve ark. (4) ilk GnRH enjeksiyonu PGF2α enjeksiyonu arasındaki beş günlük ve yedi günlük P4 uygulaması yapılan ovulasyon senkronizasyonları arasında karşılaştırma amacıyla yapılan çalışmasında % 46.8 gebelik oranı bildirilmişlerdir. Aynı çalışmada P4 uygulamasının PGF2α enjeksiyonu öncesinde beş veya yedi gün kalması arasında fark olmadığı belirtilmiştir. Sunulan çalışmada GnRH enjeksiyonundan iki gün sonra PRID uygulaması yapılmış ve beş gün kaldıktan sonra çıkarılmıştır. Elde edilen % 58.5 gebelik oranının Bridges ve ark. (4) bildirdikleri gebelik oranından (% 46.8) yüksek olmasında tohumlama sonrası P4 uygulamasının erken embriyonik ölümü azaltmasından ve kullanılan intravaginal östrojen tabletinin hayvanlarda gözlemlenen kızgınlık belirtilerini kuvvetlendirmesinden kaynaklanabileceği düşünüldü.

Sunulan çalışmada PGF2α enjeksiyonu esnasında hayvanlara intraservikal uygulanan östrojen tableti;

senkronizasyon sonrası ineklerde görülecek olan östrus belirtilerinin daha belirgin hale getirilmesi için kullanıldı. Mialot ve ark. (12) yapmış olduğu çalışmada; tohumlama öncesinde uygulanan eCG sonucunda düvelerin % 76'sında kızgınlık belirtileri tespit edilmiştir. Sunulan bu çalışmada İntraservikal östrojen tableti uygulanan gruptaki ineklerde (n=41) östrus belirtisi kuvvetli olan hayvanların oranı (41/31) % 75.6 olarak belirlendi. Sunulan çalışmada elde edilen sonuçlar Mialot ve ark (12) yapmış olduğu çalışma ile uyumluluk gösterdiği görüldü. Ovulasyon senkronizasyonu çalışmalarında östrojen hormonu uygulanmasının kızgınlık tespitine yardımcı olduğu ve suni tohumlama esnasındaki manipülasyonlara kolaylık sağladığı görüldü. Çalışma grubunda (Grup 2) elde edilen % 58.5 gebelik oranının kontrol grubundaki (Grup 1) gebelik oranına göre yüksek olması senkronizasyon çalışmasında kullanılan eksojen östrojen uygulamasının suni tohumlama esnasındaki manipülasyonlara sağladığı kolaylıktan da kaynaklanabileceği düşünüldü.

Stevenson ve ark. (18) yapmış olduğu çalışmada klasik ovulasyon senkronizasyonu ve östrojen hormon takviyeli ovulasyon senkronizasyonu uygulanan gruplarda östrus belirtisi gösteren hayvanların oranlarını sırasıyla % 54 ve % 87 bulmuşlardır. Sunulan bu çalışmada klasik ovulasyon senkronizasyon uygulaması yapılan grupta % 58.1 çalışma grubunda ise % 75.6 bulundu. Sonuçlar karşılaştırıldığı zaman klasik ovulasyon senkronizasyonu yapılan gruplarda birbirine yakın kızgınlık tespiti yapıldığı ve sonuçların uyumlu olduğu görüldü. Östrojen uygulanan grupta ise sayısal olarak daha düşük kızgınlık tespiti yapıldığı görüldü. Elde edilen sonuçlar; ovulasyon senkronizasyonunda eksojen östrojenin uygulamasının enjeksiyon tarzında yapılmasının kızgınlık tespitlerinde daha iyi sonuç verebileceği düşünüldü.

Alnimer ve ark. (3) yaptıkları çalışmada ovulasyon senkronizasyonu uyguladıkları hayvanlarda erken embriyonik ölümleri engellemek için tohumlamadan sonra 14. gün PRID takmışlar ve yedi gün bekleddikten sonra 21. gün çıkartılmışlardır. Tohumlamadan 28 gün sonra yapılan ultrasonografi muayenesinde % 53.9 gebelik oranı bulmuşlardır. Sunulan çalışmada 35. gün elde edilen % 58.5 gebelik oranı Alnimer ve ark. (3) yapmış olduğu çalışmada yüksek bulundu, Sunulan çalışmada elde edilen sonuçların Alnimer ve ark. (3) yapmış olduğu çalışmadan yüksek bulunmasında; suni tohumlamadan iki gün sonra yapılan dokuz günlük PRID uygulamasının preimplantasyon dönemde meydana gelen erken embriyonik ölümleri engellemesinden kaynaklanabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak; modifiye ovulasyon senkronizasyonu protokolünün etkinliğinin araştırıldığı çalışmada elde edilen gebelik oranlarını ışığında; ovulasyon senkronizasyonu protokollerine P4 ve östrojen takviyesinin gebelik oranlarını klasik ovulasyon senkronizasyonlarına göre sayısal olarak artırdığı tespit edildi. Modifiye ovulasyon senkronizasyonu protokolünün doğum gebe kalma aralığını kısaltabileceğinden dolayı işletmelerde ekonomik kazanç sağlayabileceği düşünüldü. Çalışmada uygulanan yöntemin geliştirilmesi için yeni çalışmaların yapılmasının faydalı olacağı kanaatine varıldı. Sunulan çalışmada denek sayısının düşük olmasından dolayı konu ile ilgili yeni çalışmalarda sonuçların anlamlı olabilmesi için sayının artırılmasının uygun olacağı düşünüldü.

Kaynaklar

- Aksoy M, Alan M, Tekeli T, Semacan A, Çoyan K. İnek ve düvelerde östrus belirleme hataları ve suni tohumlama uygulamasındaki önemi. Hay Araş Derg 1993; 3(1): 28-30.
- Alaçam E, Kılıçoğlu Ç, Özgür H. İneklerde prostaglandinlerle çalışmalar 1. Östrus senkronizasyonu. UÜ Vet Fak Derg 1983; 2 (3): 65-72.
- Alnimer MA., Lubbadah WF. Effect of progesterone intravaginal device to reduce embryonic loss and to synchronize return to oestrus of previously timed inseminated lactating dairy cows. Anim Reprod Sci 2007;107(1-2): 36-47.
- Bridges GA, Helser LA, Grum DE, Mussard ML, Gasser CL, Day ML. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 α from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. Theriogenology 2007; 69(7): 843-51.
- Bülbül B, Kırbaş M, Köse M, Dursun S, Çolak M. İneklerde östrus siklusunun farklı dönemlerinde başlatılan ovsynch protokolünün östrus senkronizasyonuna etkileri. İst Üniv Vet Fak Derg 2007; 33(3): 1-16.
- Daşkın A. Sığırcılık İşletmelerinde Reprodüksiyon Yönetimi ve Suni Tohumlama. Ankara: Aydan Web Ofset, 2005.
- Demiral O, Ün M, Abay M, Bekyürek T, Öztürk A. The effectiveness of Cosynch protocol in dairy heifers and multiparous cows. Turk J Vet Anim Sci 2006; 30(2): 213-7.
- Golf AK. Embryonic signals and survival. Reprod Domest Anim 2002; 37(3):133-9.
- İleri K, Ak K, Pabuçcuoğlu S. Evcil hayvanlarda reproduksiyon ve suni tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Ders Notu. İstanbul, 1998.
- Kasimanickam R, Hall JB, Currin JF, Whittier WD. Sire effect on the pregnancy outcome in beef cow synchronized with progesterone based ovsynch and Co-synch protocols. Anim Reprod Sci 2008; 104(1): 1-8.
- Kaygısız F, Elmaz Ö, Ak M. Süt sığırcılığında döl verimi kayıplarının işletme gelirine etkisi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2008; 5(1): 5-10.
- Mialot JP, Constant F, Dezaux P, Grimard B, Deletang F, Ponter AA. Estrus synchronization in beef cows: Comparison between GnRH+PGF2 α +GnRH and PRID+PGF2 α +eCG. Theriogenology 2003; 60 (2): 319-30.
- Momcilovic D, Archbald LF, Walters A, Tran T, Kelbert D, Risco C. Reproductive performance of lactating dairy cows treated with gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and/or PGF2 α for synchronization of estrus and ovulation. Theriogenology 1998; 50 (7): 1131-9.
- Öztürk A. Postpartum Dönemdeki Siyah Alaca İneklerde Ovsynch Protokolünden İki Gün Önce Prostaglandin F2 α İlavesinin Östrus Siklusunu ve Fertiliteye Etkisi. Doktora Tezi. İstanbul Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Jinekoloji Programı. İstanbul-Türkiye, 2007.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. Theriogenology 1995; 44(7): 915-23.
- Semacan A. Postpartum sorunlu ve normal ineklerde PGF2 α kontrollü tohumlamaların fertilité üzerindeki etkisi. Vet Bil Derg 1994; 10 (1-2): 105-10.
- Sönmez M, Türk G, Demirci E. İneklerde gebelik oranı üzerine gözlem yöntemi ve progesteron test kitleriyle yapılan östrus tespitinin etkisi. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2007; 54(2): 81-6.
- Stevenson JS, Tiffany SM, Lucy MC. Use of estradiol cypionate as a substitute for GnRH in protocols for synchronizing ovulation in dairy cattle. J Dairy Sci 2004; 87(10): 3298-305.

19. Tek Ç, Sabuncu A, Baran A, Evecen M. Postpartum sütçü ineklerde GnRH +PGF2 α ve hCG+PGF2 α uygulamalarının östrus senkronizasyonu ve fertilité üzerine etkisi. Turk J Vet Anim Sci 2003; 27(1): 125-31.
20. Tek HB. Postpartum Nonsiklik Sütçü İneklerde Progesteron-Östrodial, Progesteron-GnRH Prostaglandin F2 α veya Östrodial ile Tedaviden Sonra Folliküler Değişiklikler ve Reprodüktif Performans. Doktora Tezi. Uludağ Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Jinekoloji Programı. Bursa-Türkiye, 2005.
21. Topaloglu N, Günes H. İngiltere'de yetiştirilen Siyah-Alaca sığırların döl verimi özellikleri üzerine araştırmalar İst Üniv Vet Fak Derg 2005; 31(1): 99-118.
22. Vasconcelos JLM, Silcox RW, Rosa GJM, Pursley JR. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactation dairy cows. Theriogenology 1999; 52(6): 1067- 78.
23. Wiltbank, MC, Pursley JR. The cow as an induced ovulator: Time AI after synchronization of ovulation Theriogenology 2014; 81: 170-85.
24. Yavas Y, Walton JS. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review. Theriogenology 2000; 54(1): 25-55.

Yazışma Adresi :

Doç. Dr. Ömer Orkun DEMİRAL
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dölerme Suni Tohumlama ve Androloji Anabilim Dalı
38039 Melikgazi Kayseri, TÜRKİYE
Tel: 0 352 207 66 66 / 29655
E-posta: odemiral@erciyes.edu.tr



Sütçü İneklerde Select-synch Protokolünde Uzun ve Kısa Etkili GnRH Analoglarının Dölvürümü Üzerine Etkisi*

Filiz İPEK¹, Ömer Orkun DEMİRAL², Murat ABAY³

¹ Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri-TÜRKİYE

² Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölvürme, Suni Tohumlama ve Androloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

³ Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Özet: Sunulan çalışmada; Holştayn ırkı ineklerde uzun ve kısa etkili GnRH analoglarının kullanılması ile uygulanan Select-synch protokolünün gebelik oranlarına etkisi araştırıldı. Çalışmada hayvan materyali olarak 40 baş inek kullanıldı ve inekler rastgele iki gruba ayrıldı. Birinci ve ikinci gruptaki hayvanlara 0. gün sırasıyla leirelin asetat ve gonadorelin diasetat uygulandı. Çalışmaya alınan tüm hayvanlara 7. gün prostaglandin (PG) F2α enjeksiyonu yapıldı. Prostaglandin F2α enjeksiyonundan 24 saat sonra, östrus belirtileri deneyimli veteriner teknikerleri tarafından gözlemlenerek yapılarak belirlendi. Östrus gösteren inekler belirtilerin görülmesinden 12 saat sonra tohumlandı. Çalışmadaki hayvanlara ovaryel yapıların belirlenmesi amacıyla 0. ve 7. günlerde ve tohumlama zamanında transrektal ultrasonografi (5 MHz) uygulandı. Grup 1 ve 2'de sırasıyla toplam 12 ve 10 hayvan östrus gözlemi yapılarak rekto-vajinal yöntemle tohumlandı. Uygulamanın 9. gününde tohumlanan hayvanlarda Grup 1 ve 2'deki gebelik oranları sırasıyla % 50 (4/8) ve % 25 (2/8) olarak tespit edildi (p>0.05). Sonuç olarak, bu çalışmada ineklerde Select-synch protokolünde uzun etkili GnRH analoglarının kullanımının, kısa etkili GnRH analoglarından daha etkili olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: İnek, gebelik oranı, kısa ve uzun etkili GnRH, Select-synch

The Effect of Long and Short Acting GnRH Analogues Applications on Fertility in Select-synch Protocol Applied Dairy Cows

Summary: In the present study, the effects of long and short acting GnRH analogues in Select-synch protocol on pregnancy rates in Holstein cows were investigated. Forty cows were used and divided into two groups randomly (n=20). In the first and second groups, animals received leirelin acetate and gonadorelin diacetate, respectively at day 0 and 7, all animals were injected Prostaglandin (PG) F2α. Estrus behaviors were detected by experienced veterinarian technicians conducting visual inspections 24 hours after PGF2α injections. Cows detected in estrus were inseminated 12 hours after the detection. Ultrasonography was performed by transrectal route (5 MHz) at day 0, 7 and insemination time to determine the ovarian structure of the animals. In Group 1 and 2, in total, 12 and 10 animals respectively were inseminated using recto-vaginal technique after the detection of estrus. The pregnancy rates in the animals inseminated at day 9 in Group 1 and 2 were detected as 50% (4/8) and 25% (2/8), respectively (p>0.05). As a result, in this study, long acting GnRH analogues were found more effective than short acting GnRH analogues in Select-synch protocol in dairy cows.

Key Words: Cow, pregnancy rate, Select-synch, short and long action GnRH

Giriş

Ülkemizde hayvancılık sektörü, ekonomik olarak önemli bir konuma sahiptir. İnsanın fizyolojik bakımdan ihtiyaç duyduğu proteinin büyük bir kısmı hayvansal ürünler ile karşılanmaktadır. Dünya nüfusunun artmasına paralel olarak, hayvansal ürünlere olan ihtiyaç da artmaktadır. Günümüzde gıda

teknolojisi sayesinde insanların arz ve talebine uygun et ve süt ürünlerinin çeşitlenmesi, hayvancılığın gelişmesini zorlamaktadır.

Ülkemizde süt üretiminin % 80'i ve kırmızı et üretiminin % 70'i sığırlardan sağlanmaktadır. Sığırın kolay yönetilmesi, çok farklı iklim koşullarına ve yetiştirme sistemlerine uymadaki üstünlüğü ile entansif üretime yatkın olması; günümüzde sığır yetiştiriciliğine olan talebi artırmaktadır.

Sütçü işletmelerde verimlilik süt ve yavru verimi ile doğru orantılıdır. Ancak süt veriminin artması, beraberinde birçok üreme ve sağlık problemini getirmektedir. Üreme faaliyetlerinde meydana gelen

Geliş Tarihi/Submission Date : 09.04.2014

Kabul Tarihi/Accepted Date : 28.05.2014

* Bu çalışma aynı isimli Yüksek Lisans tezinden özetlenmiş ve IV. Veteriner Jinekoloji Kongresinde (Uluslararası Katılımlı 4-7 Kasım 2010 Belek Antalya) poster bildirisi olarak sunulmuştur.

aksaklıklar, işletmelerde karlılığı olumsuz yönde etkilemektedir.

Süt ve yavru veriminin düzenlenmesi ve artırılması ancak kontrollü üreme ile mümkündür. Son yıllarda sütçü ineklerde üremenin düzenlenmesi ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. Östrus siklusunun düzenlenmesi ineklerde üremenin denetlenmesinde çok önemli yer tutmaktadır. Bu amaçla yapılan östrus senkronizasyonu, östrusun ve suni tohumlanmanın istenilen zamana göre planlanması işlemidir. Östrus senkronizasyonunda prostaglandin (PG)'ler ve progesteron (P4) içeren spiral ve implantlar kullanılmaktadır (14). Senkronizasyon yöntemlerinde kullanılan PGF2 α ovaryumlarda aktif korpus luteum (CL)'un bulunması halinde etkili olabilmekte fakat folliküler gelişimi senkronize edememektedir. Bununla birlikte progestagenler sütçü ineklerde diöstrus süresi kadar uygulanmaktadır. Östruslar, genellikle PG ve prostagenlerin uygulama bitiminden iki-üç gün sonra şekillenmektedir. Yapılan tüm östrus senkronizasyonu uygulamaları neticesinde kızgınlıkların geniş bir sürece dağılması, gerek dölverimi idaresi, gerekse suni tohumlama uygulamaları yönünden daha çok iş ve zaman gerektirmektedir. Bu olumsuzlukların giderilebilmesi için yapılan bazı çalışmalarla, sığırlarda ovulasyonların istenilen zamana göre planlanması işlemine dayanan ovulasyon senkronizasyonu yöntemleri geliştirilmiştir (5, 13). Bu yöntemler Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) ve PGF2 α hormon uygulamalarını içeren; Ovsynch, Cosynch, Presynch ve Select-synch ile GnRH yerine östradiol esterlerinin uygulanmasından ibaret Heatsynch protokolünü içermektedir (2, 5).

Ovsynch ve Cosynch protokollerinin laktasyondaki ineklere uygulanması halinde olumlu sonuçların alındığı fakat anılan protokollerin düve ve anöstruslu ineklerde etkin yöntemler olmadığı bildirilmektedir (5, 10). Düve ve anöstruslu ineklerde folliküler dalganın tutarsız olması ve CL'nin PGF2 α 'ya duyarsızlığı bu durumun nedeni olarak gösterilmektedir. Bununla birlikte Ovsynch, Cosynch, Heatsynch ve Presynch protokollerinde uygulanan hormon sayısının fazlalığı işletme giderlerinin artmasına neden olmaktadır. Ayrıca bu dört protokolde sabit zamanlı tohumla yapılması, dölveriminin düşmesine neden olabilmektedir. Anılan olumsuzlukların aksine Select-synch protokolünde daha az hormonun kullanılmasına bağlı olarak maliyetlerin düşük olması ile östrus takibi nedeniyle daha yüksek dölveriminin elde edilecek olması, bu yöntemin diğerlerine göre daha avantajlı olduğunu düşündürmektedir.

Sunulan bu çalışma ile sütçü ineklerde Select-synch yönteminin etkinliğinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Daha çok etçi sığırlarda denenmiş olan bu yöntemin sütçü ırklarda denenmesi, bu çalışmanın orijinalliği açısından önem arz etmektedir.

Gereç ve Yöntem

Hayvanların Seçimi, Bakım ve Beslenmesi

Çalışma Kayseri ilinde bulunan bir süt işletmesinde yapıldı. Hayvan materyali olarak Holstein ırkı, en az bir doğum yapmış, herhangi bir reproduktif sorunu olmayan 40 baş inek kullanıldı. Tüm hayvanlar uygun konsantrasyonlarda mısır silajı, yonca ve konsantre yemle beslendi. Su ad libitum sağlandı.

Hayvanların Gruplara Ayrılması ve Uygulanan İşlemler

Çalışmada kullanılan hayvanlar her bir grupta 20 hayvan olacak şekilde, rastgele Grup1 ve Grup 2 olmak üzere iki gruba ayrıldı.

Birinci grup hayvanlara 0. gün, uzun etkili bir GnRH analogu olan Lesirelin asetat (Dalmarelin, Vetaş, Türkiye) etken maddesi içeren preparat 50 μ g dozda, kas içi (IM) olarak enjekte edildi. Yedinci gün aynı hayvanlara PGF2 α (Cloprostenol, Juramate, Egevet, Türkiye) im uygulandı. Prostaglandin F2 α uygulamasından sonra 24, 48 ve 72. saatlerde hayvanlar ultrasonografi, rektal palpasyon ve klinik gözlem (günde 3 kez) ile östrus takibi yapıldı. Bu süreç içerisinde östrusta olduğu belirlenen ve sağlıklı olan hayvanlar tohumlandı.

İkinci grup hayvanlara 0. gün Gonadorelin diasetat (Ovarelin, Cevadif, Türkiye) etken maddesi içeren preparat 100 μ g dozda, IM olarak enjekte edildi. Yedinci gün aynı hayvanlara PGF2 α (Cloprostenol, Juramate, Egevet, Türkiye) IM uygulandı. Prostaglandin F2 α uygulamasından sonra 24, 48 ve 72. saatlerde hayvanlar ultrasonografi, rektal palpasyon ve klinik gözlem ile östrus takibi yapıldı. Bu süreç içerisinde östrusta olduğu belirlenen ve sağlıklı olan hayvanlar tohumlandı.

Hayvanların Tohumlanması

Hayvanların tohumlanması amacıyla çiftlik genetik stratejisine uygun olarak belirlenen tek bir boğaya ait dondurulmuş çözdürülmüş sperma ile rekto-vajinal yöntem kullanılarak yapıldı.

Gebelik Muayenesi

Tohumlamalardan 30 gün sonra hayvanların gebelikleri transrektal ultrasonografi (Honda Hs-1500, 5 MHz, Japan) ile belirlendi ve kayıt altına alındı.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada yapılan istatistiki analizlerde SPSS 14.1 (Serial Number: 9869264) paket programı kullanıldı (SPSS Inc. Chicago, IL). Gruplar arasında elde edilen dölverimi özelliklerinin karşılaştırılması Fischer Exact testi ile yapıldı.

Bulgular

Çalışmada; birinci GnRH uygulamaları esnasında yapılan ultrasonografik muayenelerde (0. Gün), Grup 1'de sekiz hayvan CL pozitif iken; Grup 2'de dört hayvan CL pozitif olarak belirlendi. Grup 1 ve 2'de, PGF2α uygulamaları esnasında (yedinci

gün) CL pozitif olan hayvan sayıları sırasıyla 18 ve 16 olarak belirlendi. Prostaglandin F2α uygulamasından sonra yapılan östrus takibi ile dokuzuncu gün östrusta olan hayvan sayıları her iki grupta da sekiz olarak belirlendi. Onuncu gün de, Grup 1 ve 2'de östrus gösteren hayvan sayıları dört ve iki olarak belirlendi.

Yapılan gebelik muayenelerinde ise, dokuzuncu günde östrus gösteren ve tohumlanan hayvanlarda birinci ve ikinci grupta elde edilen gebelik oranları sırasıyla % 50 ve % 25 olarak belirlendi. Onuncu gün östrus gösteren ve tohumlanan hayvanlarda ise gebelik tespit edilemedi.

Çalışma sonunda elde edilen bulgular Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Uygulama gruplarında elde edilen veriler

		Grup 1 n (%)	Grup 2 n (%)	İstatistik Önem Kontrolü (Fisher Exact Test)
Birinci GnRH uygulaması (0. gün)	CL(+)	8 (40)	4 (20)	p>0.05
	CL(-)	12 (60)	16 (80)	
PGF2α Uygulaması (7. gün)	CL(+)	18 (90)	16 (80)	p>0.05
	CL(-)	2 (10)	4 (20)	
Dokuzuncu gün Östrus durumu	Var	8 (40)	8 (40)	p>0.05
	Yok	12 (60)	12 (60)	
Onuncu gün Östrus durumu	Var	4 (20)	2 (10)	p>0.05
	Yok	16 (80)	18 (90)	
Dokuzuncu günde tohumlanan hayvanlarda gebelik	+	4 (50)	2 (25)	p>0.05
	-	4 (50)	6 (75)	
Onuncu günde tohumlanan hayvanlarda gebelik	+	0 (0)	0 (0)	p>0.05
	-	4 (100)	2 (100)	
Toplam gebelik	+	4 (20)	2 (10)	p>0.05
	-	16 (80)	18 (90)	

Tartışma ve Sonuç

Ovulasyon senkronizasyon yöntemlerinin temeli Ovsynch protokolüdür. Postpartum 60-100. günler arasında bu dönemi uzatmamak ve tüm hayvanların aynı anda tohumlanabilmesi amacıyla uygulanan bir yöntemdir (9). Cosynch, Heatsynch ve Select-synch, Presynch protokolleri Ovsynch prosedürünün modifiye edilmesiyle ortaya çıkmıştır. Cosynch ve Ovsynch protokolleri östrus gözlemlemeyi gerektirmeyen programlardır (6, 7, 8, 10, 14, 16, 19).

Çalışmada uygulanan Select-synch protokolü ise Ovsynch protokolünün modifiye bir çeşidi olup, basit ve kısa süre içerisinde östrus oluşumunu sağlayan bir yöntemdir (1, 5). Bu protokolde ikinci GnRH enjeksiyonu yapılmamakta, östrus tespiti ve suni tohumlama birleştirilerek sadece östrus gösteren inekler tohumlanmaktadır (5, 14). Protokolde ikinci GnRH enjeksiyonu yapılmadığından, ilaç maliyeti düşmekte ancak östrusların gözlenmesi için zaman harcamayı gerektirmektedir (20).

Le Blanch ve ark. (11), Holstein ve Jersey ırkı, 348 baş sütçü inekte yaptıkları bir çalışmada; Grup 1 ve kontrol gurubunda östrus tespit oranlarını sırasıyla % 78 ve % 77.1; gebelik oranlarını ise sırasıyla % 28.9 ve % 27.4 olarak bildirmişler. Bununla birlikte, sonuç olarak, 14 gün aralıklarla uygulanan PG enjeksiyonları arasına GnRH enjeksiyonun ilave edilmesiyle, östrus tespit oranlarında ve gebelik oranlarında kayda değer bir artışın olmadığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise östrus gösterme oranları birinci ve ikinci grup hayvanlarda sırasıyla % 60 ve % 50 olarak belirlendi. Östrus gösteren hayvanların tohumlanması sonucunda ise tohumlanan hayvanlarda gebelik oranları % 33.3 ve % 20 olarak belirlendi. İki çalışma arasında elde edilen gebelik oranlarının uyum içerisinde olduğu düşünüldü. Östrus gösterme oranları karşılaştırıldığında ise Le Blanch ve ark. (11)'nin elde ettikleri sonuçların sunulan çalışmadan daha yüksek olduğu görüldü. Bu fark incelendiğinde Le Blanch ve ark. (11)'nin yaptıkları çalışmada östrus gösteren ve tohumlanan hayvanlarda elde ettikleri gebelik oranlarının sunulan çalışmaya oranla daha düşük olduğu kanaatine varıldı. Çalışmalar arasındaki bu farkın kullanılan GnRH analoglarının farklı olmasından, hayvanların bakım ve beslenme programlarının farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Tek ve ark. (17) ise sütçü ineklerde postpartum 35-45. günlerde GnRH+ PGF2 α ve hCG+ PGF2 α uygulamalarının östrus gösterme ve fertilité üzerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmalarında; üç-yedi yaş arasında bulunan 117 adet Holstein ırkı

inekten üç Grup oluşturmuş. Grup 1'e 0. gün 2000 IU hCG im, yedinci gün 500 μ g Cloprostenol Na im ve 9. gün 12.6 μ g Buserelin asetat im; Grup II'ye 0. gün 12.6 μ g Buserelin asetat im, yedinci gün 500 μ g Cloprostenol Na im ve dokuzuncu gün 2000 IU hCG im enjekte edilmiş ve enjeksiyon sonrası 12 ve 24. saatlerde ineklere suni tohumlama uygulanmış. Grup III'e 11 gün arayla 500 μ g Cloprostenol Na im enjekte edilmiş ve enjeksiyonu müteakip 60 ve 84. saatlerde ineklere suni tohumlama uygulanmış. Grup I ile II'ye 9. gün ve Grup III'e ikinci Cloprostenol Na enjeksiyonundan 48 saat sonra, transrektal ultrasonografik muayene yapılarak ovaryumlarda bulunan folliküllerin çapları ölçülmüştür. Gebelik kontrolleri, ultrasonografi tekniği kullanılarak suni tohumlamadan sonraki 28. ve 55. günlerde yapılmıştır. Neticede, Grup I, II ve III'de dominant follikülün >10mm olma oranlarının sırasıyla % 82.1, 87.2, 79.5; 28; 55 günler arası embriyonik ölüm oranlarının sırasıyla % 11.5, 9.5, 11.1; 28. günde gebelik oranlarının sırasıyla % 66.6, 53.8, 46.2; 55. günde ise gebelik oranlarının sırasıyla % 58.9, 48.7, 41.1; 28. günde dominant folliküllü ineklerin gebelik oranlarının sırasıyla % 81.2, 61.8, 58.1; 55. günde dominant folliküllü ineklerin gebelik oranlarının sırasıyla % 71.8, 55.9, 51.6 olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak; tohumlama öncesi ovulasyonu ve gebeliği garanti altına almak amacıyla uygulanan GnRH'nin hCG hormonuna benzer sonuçlar verdiği ancak, tohumlama öncesi hormon uygulanmayan üçüncü gruba kıyasla birinci Grup lehine istatistiksel olarak daha yüksek gebelik oranlarının elde edildiği, ineklerde tohumlama öncesi GnRH hormonunun kullanılmasının gebelik oranlarını artırdığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise östrus gösteren hayvanların tohumlanması sonucunda ise tohumlanan hayvanlarda gebelik oranları % 33.3 ve % 20 olarak belirlendi. Çalışmaya alınan hayvanların tamamı değerlendirildiğinde ise gebelik oranları birinci ve ikinci grup hayvanlarda sırasıyla % 20 ve % 10 olarak belirlenmiştir. Tek ve ark. (17)'nin elde ettikleri gebelik oranlarının sunulan çalışmaya oranla yüksek olduğu düşünüldü. Tek ve ark. (17) ovulasyon senkronizasyonu amacıyla farklı ovulatör ajanları kullandıkları bu çalışmalarında elde ettikleri gebelik oranlarının östrus senkronizasyonu yaptıkları gruba oranla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Östrus senkronizasyonu ile elde edilen gebelik oranlarının düşük olmasının nedeninin sabit zamanlı tohumlama yapılmasından kaynaklandığı düşünüldü. Buna rağmen sunulan çalışmaya oranla elde edilen gebelik oranlarının daha yüksek olmasının nedeni olarak uygulanan ovulasyon senkronizasyonu ve sabit zamanlı tohumlama uygulamalarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünüldü.

Pursley ve ark. (12), 13-23 aylık 155 baş sütçü düve ve postpartum 60-289. günlerde laktasyon döneminde bulunan 310 baş primipar ve multipar sütçü inekten eşit sayıda iki grup oluşturmuş. Birinci guruba Ovsynch protokolü tatbik edilmiş ve bu doğrultuda ilk gün 100 µg im GnRH, yedi gün sonra 25 mg im PGF2α, 30-36 saat sonra ikinci kez aynı dozda GnRH enjeksiyonu ve 16-20 saat sonra suni tohumlama uygulanmış. Kontrol gurubunda ise 14 gün arayla üç kez 25 mg im PGF2α enjeksiyonu uygulanmış ve uygulamanın başlatılmasından itibaren PGF2α enjeksiyondan sonraki üçüncü güne kadar, günde iki kez östrus takibi yapılan inek ve düvelerden östrus belirtisi gösterenlere, östrus başlangıcından 12 saat sonra; östrus belirtisi göstermeyenlere de PGF2α enjeksiyonu müteakip 72-80. saatler arasında sabit zamanlı suni tohumlama uygulanmıştır. İnek ve düvelerde ultrasonografi tekniği ve rektal palpasyon ile sırasıyla suni tohumlama uygulandıktan 25-30. ve 35-49. günler arasında yaptıkları gebelik muayeneleri sonucunda gebelik oranlarını; kontrol ve Ovsynch protokolü uygulanan gruplarda ortalama gebelik oranlarının ineklerde sırasıyla % 38.9, 37.8, düvelerde sırasıyla % 74.4 ve 35.1 olarak bildirmişlerdir. Ovulasyon senkronizasyonu ve östrus senkronizasyonu ile elde edilen gebelik oranlarında fark olduğunu bu farkın östrus senkronizasyonu yönünde pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışma ile elde edilen gebelik oranlarının Pursley ve ark. (12)'nin çalışmalarında düvelerde elde edilen oranlarla uyum içerisinde olduğu ancak ineklerde elde edilen oranlardan düşük olduğu kanaatine varıldı. Çalışmalar arasındaki gebelik oranlarının farklı olmasının uygulanan teknik, hayvanların verim yönü ve üreme potansiyellerinden kaynaklanabileceği düşünüldü.

Buna benzer şekilde; Pursley ve ark. (13), postpartum 40-48. günlerde bulunan Holstein ırkı primipar ve multipar 321 baş laktasyondaki, sütçü inekten iki grup oluşturmuş; birinci guruba Ovsynch protokolü tatbik edilmiş ve bu doğrultuda 100 µg GnRH, 35 mg PGF2α, 100 µg GnRH sırasıyla yedi ve iki gün aralıklarla IM olarak enjekte edilmiş, ikinci GnRH enjeksiyonundan 20-24 saat suni tohumlama uygulanmıştır. Kontrol gurubuna ise tipik PGF2α enjeksiyon uygulamaları tatbik edilmiş, enjeksiyonlardan sonra östrus takibi yapılmış ve östrus gösteren ineklere östrus başlangıcından 12 saat sonra suni tohumlama uygulanmıştır. Her iki grupta gebelik kontrolü, suni tohumlamadan sonraki 32-38. günlerde ultrasonografi tekniği kullanılarak yapılmıştır. Uygulama ve Kontrol Gruplarında gebelik teşhisi konulmayan ineklere uygulamalar tekrar edilmiş ve bu şekil tekrarlı uygulamalar, gebelik teşhisi konulana kadar devam

ettirilmiştir. Neticede; uygulama ve kontrol gruplarında postpartum 60. günde gebelik oranlarının sırasıyla, % 37 ve 5; 100. günde ise sırasıyla, % 53 ve 35 olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada elde edilen gebelik oranlarının postpartum 60. gün elde edilen gebelik oranlarından yüksek, postpartum 100. günde elde edilen gebelik oranlarından daha düşük olduğu düşünüldü.

Demiral ve ark. (3), Holstein ırkı sütçü düve ve multipar ineklerde Cosynch protokolünün bazı reproduktif parametreler üzerine etkilerini araştırmış. Çalışmada postpartum 45-120. günlerde laktasyon döneminde bulunan, normal vücut kondisyon skoruna sahip 54 baş inek ve en az 350 kg ağırlığında, 13 aylık 53 baş düve kullanılmış. Düve ve ineklere sıfırinci gün 20 µg GnRH ve yedinci gün 0.150 mg PGF2α enjekte edilmiş, dokuzuncu gün aynı dozda ikinci GnRH enjeksiyonu ile birlikte suni tohumlama uygulanmış. Gebelik kontrolleri, suni tohumlama sonrası 27-33. günler arasında ultrasonografi tekniği kullanılarak yapılmış. Cosynch protokolünün sırasıyla 0 ve 7. günlerinde, yedi-dokuz günlerde 12 saat aralıklarla ve 9. günü müteakip 42 saat boyunca altı saat aralıklarla ultrasonografi tekniği kullanılarak folliküler gelişim, CL varlığı ve ovulasyon zamanları takip edilmiş. Neticede düve ve multipar ineklerde gebelik oranları % 51 ve 41 olarak bulunmuş. Birinci GnRH, PG ve ikinci GnRH enjeksiyonları sırasında ovaryumlarında CL bulunan düve ve multipar ineklerde gebelik oranlarının sırasıyla % 47.4, 48.7; % 60.5, 48.7 ve % 62.1, 36.4 olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak; Cosynch protokolünün düvelerde, ineklere nazaran daha etkin ve kullanışlı olduğu kanaatini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada elde edilen gebelik oranlarının Demiral ve ark. (3)'nin çalışmalarında elde edilen gebelik oranlarına nazaran daha düşük olduğu görüldü. Düşük gebelik oranlarının elde edilmesinin nedenlerinin farklı ovulasyon senkronizasyon tekniklerinin uygulanmasından ve deneysel aşamada farklı reproduktif performanstaki hayvanların kullanıldığından ileri geldiği düşünüldü.

Stevenson ve ark. (15), yaptıkları bir çalışmada Deney I'de 308 baş Holstein ırkı sütçü inekten dört grup oluşturmuş; Grup I, II, III ve IV'e sırasıyla Ovsynch, Select-synch, 2x PGF2α + GnRH ve 2x PGF2α programları uygulanmıştır. Programlarda GnRH 100 µg, PGF2α 25 mg im uygulanmıştır. Grup I ve III'de ikinci GnRH enjeksiyonu, PGF2α enjeksiyonundan 33 saat sonra; suni tohumlama, ikinci GnRH enjeksiyonundan 16-18 saat sonra uygulanmıştır. Grup III ve IV'de PG enjeksiyonları 14 gün arayla; Grup II ve IV'de suni tohumlama, PGF2α enjeksiyonu müteakip dört gün içerisinde

östrus gözlenen ineklere östrus başlangıcından 10 -14 saat sonra ya da uygulanmıştır. Deney II' de 227 baş Holstein ırkı sütçü inekten iki grup oluşturulmuş; Grup I ve II'ye sırasıyla Ovsynch ve Select-synch programları uygulanmıştır. Grup I'e PGF2 α enjeksiyonundan 48 saat sonra ikinci GnRH enjeksiyonu ve ikinci GnRH enjeksiyonundan 16 saat sonra suni tohumlama uygulanmıştır. Grup II'ye Deney I'deki Grup II programı uygulanmıştır. Her iki deneyde gebelik kontrolleri, suni tohumlamadan sonraki 38-52. günler arasında yapılmıştır. Neticede; Deney I'de Grup I, II, III ve IV'de gebelik oranlarının sırasıyla % 22.1, 25.6, 24.6 ve 31.7 olarak; Deney II' de ise Grup I ve II'de gebelik oranlarının % 35.6 ve 26,8 olarak bildirmişlerdir. Stevenson ve ark. (15)'nin Select-synch uygulaması ile elde ettikleri gebelik oranları ile sunulan çalışmada elde edilen gebelik oranları arasında bir uyum olduğu düşünüldü.

Tenhagen ve ark. (18), dört farklı deneyde GnRH-PGF2 α ve GnRH-PGF2 α -GnRH programlarının, reproduktif performans ve folliküler dalga gelişimi üzerine etkisini araştırmış. Deney I, II, III' de >13 aylık ve >350 kg ağırlığında sırasıyla 282, 98, 71 baş Holstein-Friesian ırkı düveden östrus tespitinde tohumlanan (IDO) ve sabit zamanlı (TAI) olmak üzere ikişer grup oluşturulmuş. IDO I, II, III ve TAI I, II, III. gruplara ilk gün GnRH, yedi gün sonra PGF2 α enjekte edilmiş; suni tohumlamalar, IDO gruplarında PGF2 α enjeksiyonu müteakip beş gün içerisinde östrus tespitiyle, TAI I ve II. gruplarda PGF2 α enjeksiyondan sonra sırasıyla 48 ve 72. ve 48 ve 78. saatlerde, TAI III. grupta PG enjeksiyonundan 48 saat uygulanan ikinci GnRH enjeksiyonu ile birlikte ya da ikinci GnRH enjeksiyonundan 24 saat sonra uygulanmış. Deneylerde GnRH, 0,25 mg ve PGF2 α , 15 mg im uygulanmış. Gebelik kontrolleri, bütün gruplarda suni tohumlamadan sonraki 35-41. günlerde rektal palpasyon ile yapılmış. Deney IV ve Deney I'deki gruplardan ve Deney III'deki TAI gurubundan bir alt grup oluşturulmuş; PGF2 α enjeksiyonundan sonraki 48, 56, 72, 80, 96 ve 104. saatlerde ultrasonografi tekniği kullanılarak ovaryumlarda follikül çapları ve ovulasyon zamanları tespit edilmiş. Neticede; IDO I, II ve III. gruplarda östrus şekillenme oranlarının sırasıyla % 84.8, 83.7, 70.4; IDO I, II, III ve TAI I, II, III. gruplarda gebelik oranlarının sırasıyla % 45.4, 42.9, 46.5 ve % 52.8, 49.0, 54.8 olduğu tespit edilmiş. Deney IV neticesinde GnRH-PGF2 α ve GnRH-PGF2 α -GnRH gruplarında ovulasyon oranlarının sırasıyla %74.7, 96.5; ovulasyona uğrayan follikülerin ortalama çaplarının sırasıyla 14.3 \pm 1.9 ve 13.1 \pm 1,9 mm olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada elde edilen gebelik oranlarının Tenhagen ve ark. (18)'nin bildirdikleri oranlardan daha

düşük olduğu görüldü bunun nedeninin kullanılan hayvan materyalinden, iklim ve beslenme faktarından olabileceği düşünüldü.

Deutscher ve ark. (4), kırmızı Angus melez ırkı sütçü ineklerde PGF2 α 'nın tek enjeksiyonu, Select-synch ve Cosynch yöntemlerini karşılaştırmış ve iki deney oluşturmuştur. Deney I ve II'de sırasıyla üç ve dört yaşında, postpartum 25-77 ve 34-91 günler arasında laktasyon döneminde bulunan 83 ve 75 baş inekten A ve B olmak üzere ikişer grup oluşturulmuş; Grup A-I/ A-II, Grup B-I ve Grup B-II'ye sırasıyla Select-synch, PGF2 α 'nın tek enjeksiyonu ve Cosynch programları uygulanmıştır. Grup A-I/ A-II' de PGF2 α enjeksiyonu sonrası yedi gün boyunca östruslar takip edilmiş ve östrus tespiti ile ineklere suni tohumlama uygulanmıştır. Grup B-I'de önce beş gün süreyle östruslar takip edilmiş ve östrus tespiti ile ineklere suni tohumlama uygulanmış; östrus göstermeyen ineklere altıncı gün PGF2 α enjekte edilmiş, enjeksiyon sonrası beş gün boyunca östruslar takip edilmiş ve östrus tespiti ile ineklere suni tohumlama uygulanmıştır. Neticede; Grup A-I, B-I, A-II, B-II'de östrus gözlenme oranlarının sırasıyla % 93, 73, 73, 58; gebelik oranlarının sırasıyla % 81, 49, 62, 61 ve Grup A-I ve B-I'de nonsiklik ineklerde östrus gözlenme oranlarının % 92, 56; gebelik oranlarının % 75, 39; siklik ineklerde ise bu oranların sırasıyla % 93, 87 ve 83, 57 olduğu tespit edilmiş. Sonuç olarak; her iki deneyde Select-synch protokolün senkronizasyon başarısının yüksek olduğu ve non-siklik bazı ineklerde östrusu indüklediği görüldüğünü bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise elde edilen gebelik oranlarının Deutscher ve ark. (4)'nin bildirdiklerine oranla yüksek derecede düşük olduğu görüldü. Bunun nedeninin deney materyali olarak kullanılan hayvan ırklarının farklı olması ve laktasyon nedeni olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak; araştırma sonunda elde edilen veriler doğrultusunda ovulasyon senkronizasyonu yöntemlerinin uygulanmasında en önemli dezavantajlar olarak sıralanan; uygulama maliyetlerinin yüksek olması, sabit zamanlı tohumlama yapılması ve ovulasyonların yüksek oranlarda belli aralıklara sıkıştırılmaması nedeniyle elde edilen dölvöriminin düşük olması gibi engellerin Select-synch yöntemi ile aşılabileceği kanaatine varıldı.

Özellikle postpartum süreçte meydana gelen zaman kayıplarının engellenmesi amacıyla Select-synch yönteminin, sütçü ineklerde ovulasyon senkronizasyonu yöntemiyle karşılaştırıldığında ekonomik açıdan daha uygun olduğu düşünüldü.

Çalışmada elde edilen gebelik oranları total olarak değerlendirildiğinde düşük olmakla birlikte; östrus

gözlemlenen hayvanlarda yapılan tohumlamalarda elde edilen gebelik oranları düşünüldüğünde, elde edilen gebelik oranlarının ekonomik sınırlar içerisinde olduğu hatta ovulasyon senkronizasyonu ile elde edilen gebelik oranları ortalamalarından daha iyi olduğu kanaatine varıldı.

Kaynaklar

1. Dejarnette M. Estrus synchronization: a reproductive management tool. <http://www.selectries.com/reproductive/estrus-syn-reproman.pdf>; Erişim tarihi: 28.12.2009.
2. Dejarnette M. What is new in estrus synchronization? <http://www.selectsires.com/selections/selections.html>; Erişim tarihi 28.10.2009.
3. Demiral O, Ün M, Abay M, Bekyürek T, Öztürk A. The effectiveness of Cosynch protocol in dairy heifers and multiparous cows. *Turk J Vet Anim Sci* 2006; 30(2): 213-7.
4. Deutscher GH, Plugge B, Davis R. Estrous synchronization programs for lactating cows, http://www.iowabeefcenter.org/Beef%20Cattle%20Handbook/Estrus_Synch-Beef.pdf; Erişim tarihi: 28.10.2009.
5. Dinç DA. İneklerde reproduktif verimliliği artırma programları. *Vet Hekim Der Derg* 2006; 77(2): 50-64.
6. Fricke PM. Ovsynch, Pre-Synch and the Kitchen-Synch: What's up with synchronization protocols? <http://www.wisc.edu/dysci/uwex/brochures/brochures/fricke.pdf>; Erişim tarihi: 25.12.2009.
7. Fricke PM. The implementation and evolution of timed artificial insemination protocols for reproductive management of lactating dairy cows. <http://www.uwex.edu/ces/dairyrepro/documents/ConflmplementationEvolution-TAIProtocols.pdf>; Erişim tarihi: 24.12.2009.
8. Grant E. Estrous synchronization programs that help rebreed anestrous cows. <http://www.naab-css.org/education/timing.html>; Erişim tarihi: 28.12.2009.
9. Hassan SG. Delayed age of puberty in buffalo heifer. http://www.isah-soc.org/documents/2005/sections/25_vol_1.pdf; Erişim tarihi: 28.12.2009.
10. Ingwerson JA. Induction of ovulation and LH response in cyclic mares treated with gonadorelin diacetate tetrahydrate. Iowa State University, Animal Physiology, Iowa-USA,2007.
11. Le Blanch SJ, Leslie KE, Ceelen HJ, Kelton DF, Keefe GP. Measures of estrus detection and pregnancy in dairy cows after administration of Gonadotropin- Releasing hormone within an estrus synchronization program based on Prostaglandin F2 α . *J Dairy Sci* 1998; 81(2): 375-81.
12. Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS, Ottobre JS, Garverick HA, Anderson LL. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J Dairy Sci* 1997; 80(2): 295-300.
13. Pursley JR, Kosorok MR, Wiltbank MC. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J Dairy Sci* 1997; 80(2): 301-6.
14. Sabo YG, Sandabe UK, Maina VA, Balla HG. Schemes for oestrus synchronization protocols and controlled breeding programs in cattle. *Journal of Applied Sciences* 2008; 8 (2): 241-51.
15. Stevenson JS, Kobayashi Y, Thompson KE. Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including Ovsynch and combinations of gonadotropin- releasing hormone and prostaglandin F2 α . *J Dairy Sci* 1999; 82(3): 506-15.
16. Stewart S, Rapnicki P, Fricke P. Dairy reproductive synchronization notes. Minnesota Dairy Herd Health Conference, May, 2, 2004; Minnesota-USA.
17. Tek Ç, Sabuncu A, Baran A, Evecen M. Postpartum sütçü ineklerde GnRH+PGF2 α ve HCG+ PGF2 α uygulamalarının, östrus senkronizasyonu ve fertilité üzerine etkileri. *Turk J Vet Anim Sci* 2003; 27(1): 125-31.
18. Tenhagen BA, Kuchenbuch S, Heuwieser W. Timing of ovulation and fertility of heifers after synchronization of oestrus with GnRH and Prostaglandin F2 α . *Reprod Dom Anim* 2005; 40(1): 62-7.

19. Vasconcelos JLM, Silcox RW, Rosa GJM, Pusrley JR, Wiltbank MC. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. Theriogenology 1999; 52(6): 1067-78.
20. Whittier JC, Geary TW, Frequently asked questions about synchronizing estrus and ovulation in beef cattle with GnRH. Prepared for Iowa Cooperative Extension CHIPS Beef Breeding Management Seminar, January, 29, 2000; Iowa-USA.

Yazışma Adresi:

Doç. Dr. Ömer Orkun DEMİRAL
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dölerme Suni Tohumlama ve Androloji Anabilim Dalı
38039 Melikgazi KAYSERİ
Tel: 0 352 207 66 66 / 29655
E-posta: odemiral@erciyes.edu.tr



Caterpillar-Borne Abortions in Pregnant Mares and Camels

Abdullah INCI¹, Alparslan YILDIRIM¹, Onder DUZLU¹

¹ Vectors and Vector-Borne Disease Implementation and Research Center, Erciyes University, Kayseri-TURKEY

Summary: The caterpillars are the larval forms of butterflies and moths in the order Lepidoptera. While some species are insectivorous, most of them are herbivorous. As known voracious feeders, caterpillars are pests in agriculture, and damage to fruits and other agricultural products. In addition, moths and their larval stages have medical and veterinary importance because of their behaviors and noxious secretions. Some groups of moths in Lepidoptera adapted for feeding directly on secretions and body fluids of animals and humans. These butterflies known as zoophilic moths feed on animal fluids such as lachrymal secretions, blood and skin exudates on wounds, nasal secretions, saliva, perspiration, urine and droplets of blood dripped from mosquitoes feeding on host animals. Further, some skin-piercing moths preferentially attract to open wounds on animal hosts and suck blood. During the feeding, the moths play a role as mechanic vectors for some infections in endemic regions. On the other hand, some urticating caterpillars in the order Lepidoptera such as Limacodidae, Megalopygidae and Saturniidae cause urticaria and moth dermatitis in human, the majority of caterpillars within the families Lasiocampidae, Notodontidae, Thaumetopoidae, and Lymantriidae induce equine abortions in pregnant mares and also in dromedary camels due to ingestion of the larval forms during grazing in the infested area. The caterpillar-borne abortions in pregnant mares and camels were reviewed in this article.

Key Words: Abortion, camel, caterpillar-borne, mare, pregnancy

Gebe Kısarak ve Develerde Tırtıl-Kaynaklı Abortlar

Özet: Tırtıllar Lepidoptera dizisinde yer alan kelebeklerin larval formlarıdır. Bazı türlerin tırtılları insektlerle beslenirken çoğunluğu herbivordur. Doymak nedir bilmeyen tırtıllar, esasen tarım haşereleri olup meyvelere ve diğer tarımsal ürünlere zarar verirler. Buna ilaveten bazı gece kelebekleri (güveler) ve onların larval dönemleri, davranış özellikleri dolayısıyla medikal ve veteriner öneme sahiptirler. Lepidoptera dizisindeki gece kelebeklerinin bir bölümü direkt olarak hayvan ve insanların vücut sıvıları ve sekresyonlarıyla beslenmeye adapte olmuşlardır. Zoophilic güveler olarak da adlandırılan bu kelebek türleri hayvanların gözyaşı sekresyonları, yaralar üzerindeki kan ve deri eksudatları, burun sekresyonu, tükürük, ter ve idrar gibi vücut sıvılarıyla ve konak hayvanlardan kan emen sivrisineklerden dökülen kan damlacıklarıyla beslenirler. Ayrıca deriyi delebilmek için ağız yapısına sahip bazı güveler tercihen açık yaralara saldırırlar ve konak hayvanların kanlarıyla beslenirler. Beslenme süresince güveler endemik bölgelerde bazı enfeksiyonların mekanik vektörlüğünde rol oynarlar. Diğer yandan, Lepidoptera dizisinde bulunan Limacodidae, Megalopygidae ve Saturniidae ailelerindeki bazı türler insanlarda ürtiker ve güve dermatitisine sebep olurken, Lasiocampidae, Notodontidae, Thaumetopoidae ve Lymantriidae ailelerindeki kelebek tırtılları, enfeste alanlarda otlama esnasında yemlerle alınmaları sonucu gebe kısarak ve develerde yavru atmalara yol açarlar. Bu derlemede gebe kısarak ve develerde tırtıl kaynaklı abortlar hakkında bilgi verilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Abort, deve, gebelik, kısarak, tırtıl-kaynaklı

Introduction

In phylum of arthropoda, eight orders of insects [Blattaria (cockroaches), Phthiraptera (lice), Hemiptera (true bugs, bed bugs, kissing bugs, assian bugs), Coleoptera (beetles), Siphonoptera (fleas), Diptera (Flies: mosquitoes, black flies, biting midges, horse flies, deer flies, sand flies, tsetse flies, house flies, stable flies, horn flies, bot flies, blow flies, flesh flies, louse flies, keds, etc.), Hymenoptera (wasps, hornets, velvet ants, ants

and bees) and Lepidoptera (butterflies, skipper butterflies and moth-butterflies)] and four orders of arachnids [(Scorpionida (scorpions), Solpugida (solpugids, sun spiders, camel spiders and barrel spiders), Acari (mites and ticks) and Araneae (spiders)] have medical and veterinary importance as mechanical and biological vectors of pathogens such as virus, bacteria, fungus and parasites. However these vectors cause very serious problems like annoyance, toxication, allergic reactions, invasion of host tissues in humans and also in animals (8, 13-15).

Of these arthropod groups, the order Lepidoptera includes the butterflies and moths, and has a holometabolous (complete metamorphosis) life cycle. The adults feed primarily on nectar from flowers and exhibit excellent natural beauties with their wonderful colors depending on their lifestyles. Butterflies and moths play an important role in the natural ecosystem as pollinators and as nutrients in the food chain. Conversely, their larval stages are considered very problematic to vegetation in agriculture as their main source of food is often live plant matter. On the other hand, some lepidopteran species are recognized as economic pests of row crops, fruit and shade trees, ornamental shrubs, and other plantings on which their larvae feed. In addition, a number of lepidopteran species, notably moths can cause significant health problems for humans and animals. A few groups of moths have adaptation for feeding directly on secretions and body fluids of animals and humans. Zoophilic moths feed on animal fluids such as lachrymal secretions, blood and skin exudates on wounds, nasal secretions, saliva, perspiration, urine, and droplets of blood extracted from mosquitoes feeding on host animals. Furthermore, some skin-piercing moths preferentially attract to open wounds on animal hosts and suck blood (8, 13-15).

Lachrymal feeding: Some adult moths frequently ingest liquids (lachrymal secretions, or tears) from the mucous membrane margins of the eyes of domestic or wild animals, and sometimes eye exudates, and even sweat from humans. This activity is most common during dry periods of the year. Lachrymal feeding has been observed mainly in Southeast Asia (Cambodia, Indonesia, Laos, Malaysia, and Thailand), but a number of cases have also been reported from Africa, China, and the United States (at least one case in Arkansas). The moths mainly limit this feeding activity to evening or early night hours, or very rarely during the day in deeply shaded forest or jungle sites. So far, this behavior has been reported for >100 moth species, representing at least 25 genera, in at least 6 families (Geometridae, Noctuidae, Notodontidae, Pyralidae, Sphingidae, and Thyatiridae). This activity can be a serious nuisance to animals and might spread ocular pathogens (2).

Blood feeding: Adults moths in some of the above groups will occasionally feed on blood or other fluids seeping from open sores, scratches or wounds. Unique to Southeast Asia (Indonesia, Laos, Malaysia, and Thailand), a number of species of the noctuid genus *Calyptra* can, and

often do, directly pierce the unbroken skin of animals or humans and ingest fresh blood. Animals from which they have been observed to take blood include elephants, Malayan tapir, deer, water buffalo, rhinoceros, antelopes, mules, and pigs. At least five species in this genus (*C. bicolor*, *C. fasciata*, *C. ophideroides*, *C. parva*, and *C. pseudobicolor*) have been reported to feed on humans (2).

Beside a group of lepidopteran species cause some serious disorders in humans such as caterpillar sittings (*Premolis semirufa*) in field workers in tropical countries, moth dermatitis (*Hylesia* spp.), inhalation allergies (*Hylesia* spp.) and silk-induced allergies (*Bombyx mori* and *B. mandarina*), some other groups notably skin-piercing moths have the potential to transmission of some contaminants and pathogens as mechanic vectors. For instance, during the feeding, the moths play a role as mechanic vectors for some infections such as Infectious Bovine Keratitis (IBK), or "Pinkeye" in cattle in the endemic regions of Uganda and some moths also serve as intermediate hosts for the rat tapeworm *Hymenolepis diminuta* (20).

In addition, larval stages of moths have medical and veterinary importance due to their natural behaviors in the habitats. For example while some urticating larval stages of Limacodidae, Megalopygidae and Saturniidae in the order Lepidoptera cause urticaria and moth dermatitis in humans and domestic animals due to their noxious fluids e.g. formic acid (16), the majority within the families Lasiocampidae, Notodontidae, Thaumetopoidae, and Lymantriidae induce equine abortions in pregnant mares and also in dromedary camels due to ingestion of the larval forms during grazing in the infested area in the world (20). Currently some lepidopteran species have already been identified in the families Limacodidae (4 species), Saturniidae (6 species), Lasiocampidae (30 species), Notodontidae (34 species), Thaumetopoidae (5 species), and Lymantriidae (21 species) in Turkey (1).

The larval forms of butterflies and moths in the order Lepidoptera are called "caterpillar". While some species are insectivorous, most of the caterpillars are herbivorous. As known voracious feeders, caterpillars are pests in agriculture, and damage to fruits and other agricultural products. However, caterpillars are very important pests notably for horse and camel breeding in some parts of the world (20). The caterpillars inducing abortions in pregnant mares (12, 22, 26, 27), and

camels (4, 32) have been reported from some parts of the world. The caterpillar-borne abortions were first described as mare reproductive loss syndrome (MRLS) in the United States (23), and equine amnionitis early fetal loss (EAEFL or EFL) and late fetal loss (LFL) in Australia (21, 22, 31).

Caterpillar-Borne Abortion in Pregnant Mares and Economical Losses: Pregnancy loss is a major cause of wastage in equine breeding industry. Other possible causes such as infectious (viral and bacterial), noninfectious (twin pregnancy, progesterone deficiency, umbilical cord torsion, congenital defects) and unusual causes have already been reported in pregnant mares (17). In the last decade, many unusual abortions have been detected in pregnant mares in several parts of the world (21, 26). Tobin and Brewer (28) reported that the first observations about the unusual abortions in pregnant mares have been identified on April the 26th 2001 by Thomas Little. Little observed an unexpected number of in utero deaths in 60 day-old fetuses in clinically normal mares when he was ultra sounding for sex determination in Central Kentucky in 2001, United States, and the cases were described as MRLS depend on the clinic pathological features of the abortions. The definition of the MRLS cases were mainly described in two different forms and also associated with some pathological characteristics as identified below:

i. Early fetal loss (EFL): The observations about the EFL were recorded within 35 and 100 days after mares were bred. During the ultrasound examination of mares in this period, fetal death was detected after expulsion of the fetus was associated with the presence of abnormal echogenic fluid (cloudy and flocculent) around the fetus (24).

ii. Late fetal loss (LFL): The LFL cases were observed as abortions during the last trimester of the pregnancy in mares. Late fetal loss was not associated with cases, it was associated with a swollen and engorged placenta (premature placental separation or "red bag" syndrome). Foals born alive were sometimes weak and required intensive veterinary care (5).

iii. The observation: The increased echogenicity of fetal fluid after day 85 in ultrasonographic exams of mares was one of the clinical parameters for identification of EFL (26, 30).

iv. In addition to reproductive losses, a number of cases of pericarditis (inflammation within the sac surrounding the heart) and severe unilateral uveitis

(inflammation of one eye) were associated with the occurrence of MRLS (6).

Epidemiologically significant factors associated with EFL were reported as the presence of moderate to high concentrations of eastern tent caterpillars (ETC) in grazing areas, farm population of greater than 50 mares, the presence of barren or maiden mares in the effected fields, mares bred in February 2001, the presence of wild cherry trees around mare pastures, and the frequent presence of waterfowl on the farm (9, 10). It has also been reported that a concurrent relation was observed between the high incidence of MRLS cases and a population explosion of the ETC (*Malacosoma* spp and *Datana* spp) localized areas in a year (11, 33, 34). Currently, twenty-six species of tent caterpillars (*Malacosoma*: Lasiocampidae) have been identified in the northern latitudes of both the New and Old World (20). On the other hand, it was reported that the syndrome was associated with certain caterpillars within the families Thaumetopoeidae (*Ochrogaster*) and Lymantriidae (*Euprctis*, *Leptocneria*) in Australia (21).

It was stated that the abortigenic factor that initiates the syndrome may be a toxin in integument and setae of caterpillars (7, 18). The ETC follows (i) the ingestion of caterpillars (in fodder or forage) by pregnant mares, (ii) the penetration the intestinal wall, and (iii) entering the blood stream. From the bloodstream they can be carried to various tissues and organs, including the developing fetuses of pregnant mares. Evidence indicates that normally nonpathogenic bacteria in the gastrointestinal tract (e.g. alpha *Streptococcus* spp. and *Actinobacillus* spp.) are transported by the setal fragments of caterpillars and can infect reproductive tissues, and umbilical cord. At the end of the caterpillar-induced poisoning process, the fetal deaths and abortions may occur (11, 26). In addition, the caterpillar-induced poisoning process was demonstrated by experimental studies in the United States (3, 18, 19, 25) and Australia (7) where intubating mares in mid-pregnancy with preparations of either whole processionary caterpillars or shed caterpillar exoskeletons induced abortion with few impending clinical signs. The gross pathological and bacteriological findings of the aborted fetuses were similar to those observed in field cases of EFL (7).

The Economic Impacts of MRLS: The largest epidemic of equine abortion in North America was observed in 2001 and 2002 when more than 1500 cases were reported on horse farms in Kentucky.

Thoroughbreds were affected the most, with estimated economic losses of \$330 to \$500 million during the two-year period (27). The cause was attributed to the ingestion of eastern tent caterpillar (*Malacosoma americanum*) crawling on the ground after feeding on nearby heavily infested trees. Mullen (20) reported that a similar syndrome occurred in Florida in 2005, where an equine abortion occurred in mares following the ingestion of a walnut caterpillar (*Datana integerrima*), due to severe defoliation of hickory trees. Similar economic losses have also been reported in thoroughbred and quarter horse broodmares in Australia, involving caterpillars of three species *Ochrogaster lunifer*, *Euproctis edwardsi* and *Leptocneria reducta* (21).

Caterpillar-Borne Abortions in Camels: In camelid veterinary practice, the uterine infections and abortions are the major complain. Some factors such as infertility, pregnancy loss, udder diseases and neonatal mortality cause reproductive losses in camelids (29). According to camel breeders, the etiological reasons of abortions vary. They claim the ingested caterpillars and cobwebs in fodder on pastures may cause abortions in camels in some areas of Africa (4). Recently, it has been reported that ingestion of caterpillars (*Lasiocampa* spp.) with forage is recognized as the cause of abortions in camels in the Western Sahara in Africa (32).

In Turkey, caterpillar-borne abortions or caterpillar-induced poisoning cases in animals have not been reported yet. However, some lepidopteran species in the moth fauna may have risky potentials for caterpillar-borne abortions or caterpillar-induced poisoning in livestock animals such as horse, sheep, goats, cattle and camel in some infested areas of Turkey, depending on climatic conditions, planting and the management of animals by pastoralists. Thus, the epidemiological investigations and monitoring studies are required for caterpillar-borne abortions in pregnant mares and camels in Turkey.

References

1. Anonymous 1. http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_moths_of_Turkey. Accession Date: 18.09.2013.
2. Anonymous 2. Regional disease vector ecology profile southeast Asia. Information services division armed forces pest management board fort detrick / forest glen annex walter reed army medical center washington, DC 20307-5001. Accession Date: 06.07.2009.
3. Bernard WV, LeBlanc MM, Webb BA, Stromberg AJ. Evaluation of early fetal loss induced by gavage with eastern tent caterpillars in pregnant mares. J Am Vet Med Assoc 2004; 225, 717-21.
4. Bizimana N. Traditional Veterinary Practice in Africa. GIZ, 1994; 348-9.
5. Brown S. Field and clinical observations related to late fetal loss in mares affected with mare reproductive loss syndrome. In: Proceedings of the first workshop on mare reproductive loss syndrome. Edit, Powell DG, Troppman A, Tobin T, Kentucky Agricultural Experiment Station University of Kentucky College of Agriculture Maxwell H, Gluck Equine Research Center Lexington, Kentucky 40546, 2002; 14-15.
6. Byars TD, Seahorn TL. Clinical observations of mare reproductive loss syndrome in critical care mares and foals. In: Proceedings of the first workshop on mare reproductive loss syndrome. Edit, Powell DG, Troppman A, Tobin T, Kentucky Agricultural Experiment Station University of Kentucky College of Agriculture Maxwell H, Gluck Equine Research Center Lexington, Kentucky 40546, 2002; 15-16.
7. Cawdell-Smith AJ, Todhunter KH, Anderson ST, Perkins NR, Bryden WL. Equine amnionitis and fetal loss: Mare abortion following experimental exposure to Processionary caterpillars (*Ochrogaster lunifer*). Equine Vet J 2012; 44, 282-8.
8. Durden LA, Mullen GR. Introduction. In: Medical and Veterinary Entomology. Second Edition, Eds, Mullen GR, Durden LA. AP, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 2009; 1-12.
9. Dwyer RM, Garber LP, Traub-Dargatz JL, Meade BJ, Powell D, Pavlick MP, Kane AJ. Case-control study of factors associated with excessive proportions of early fetal losses associated with Mare Reproductive Loss Syndrome in central Kentucky during 2001. J Am Vet Med Assoc 2003; 222, 613-9.
10. Dwyer RM. Epidemiological correlates of the 2001 and 2002 episodes of mare reproductive loss syndrome. In: Proceedings of the first

- workshop on mare reproductive loss syndrome. Edit, Powell DG, Troppman A, Tobin T, Kentucky Agricultural Experiment Station University of Kentucky College of Agriculture Maxwell H, Gluck Equine Research Center Lexington, Kentucky 40546, 2002; 34-6.
11. Fitzgerald TD. The biology of tent caterpillars as it relates to mare reproductive loss syndrome. Proc 1st Workshop on Mare Reproductive Loss Syndrome 2002; 84-7.
 12. Harrison LR. Kentucky abortion storm and related conditions. Proceedings US Anim Hlth Assoc 2001;105: 227-9.
 13. İnci A, Yazar S, Tuncbilek AS, Canhilal R, Doganay M, Aydin L, Aktas M, Vatansever Z, Ozdarendeli A, Ozbel Y, Yildirim A, Duzlu O. Vectors and vector-borne diseases in Turkey. Ankara Univ Vet Fak Derg 2013; 60, 281-96.
 14. İnci A, Düzlü Ö. Vektörler ve vektörlerle bulaşan hastalıklar. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2009; 6(1): 53-64.
 15. İnci A. Genel bilgi. 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 28 Eylül - 4 Ekim Karahayit Hotel, Denizli, 2013, YM4.p. 41-44.
 16. Kearby WH. Variable oakleaf caterpillar larvae secretaformic acid that causes skin lesions (Lepidoptera: Notodontidae). J Kans Entomol Soc 1975; 48, 280-2.
 17. Keenan DP, McAlister R, Makkreel LD. Abortion. <http://www.keenanmcalister.com/sites/site-3575/documents/Abortion.pdf>. Accession Date: 25.09.2013.
 18. McDowell KJ, Williams NM, Donahue JM, Poole L, Barney WE, Coe B, Deborde S, Ennis L, Newman KE, Lindemann M, Lynn B, Webb BA. Deductive investigations of the role of eastern tent caterpillars in mare reproductive loss syndrome. Proc Workshop on the Equine Placenta 2003, 99-102.
 19. McDowell KJ, Webb BA, Williams NM, Donahue JM, Newman KE, Lindemann MD, Horohov DW. The role of caterpillars in mare reproductive loss syndrome: a model for environmental causes of abortion. J Anim Sci 2010; 88, 1379-87.
 20. Mullen GR. Moths and Butterflies (Lepidoptera). In: Medical and Veterinary Entomology. Second Edition, Eds, Mullen GR, Durden LA. AP, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 2009; 353-70.
 21. Perkins NR. Equine amnionitis and foetal loss (eaf). Hunter valley equine research centre, Scone, New SouthWales. 2005, pp 19-48.
 22. Perkins NR, Sebastian MM, Todhunter KH, Wylie RM, Begg AP, Gilkerson JR, Muscatello G, Racklyeft DJ, Chicken C, Wilson MC, Cawdell-Smith AJ, Bryden WL. Pregnancy loss in mares associated with exposure to caterpillars in Kentucky and Australia. In: Poisonous Plants: Global Research and Solutions. Eds, Panter KE, Wierenga TL, Pfister JA, CABI Publishing, Wallingford, UK, 2007; 165-9.
 23. Powell DG. Mare reproductive loss syndrome (MRLS). Equine Dis Q 2001; 9 (4): 5-7.
 24. Riddle WT. Clinical Observations Associated with Early Fetal Loss in Mare Reproductive Loss Syndrome during the 2001 and 2002 Breeding Seasons. In: Proceedings of the first workshop on mare reproductive loss syndrome. Edit, Powell DG, Troppman A, Tobin T, Kentucky Agricultural Experiment Station University of Kentucky College of Agriculture Maxwell H, Gluck Equine Research Center Lexington, Kentucky 40546, 2002; 11-4.
 25. Sebastian M, Williams D, Harrison L, Donahue J, Seahorn T, Slovis N, Richter D, Fuller T, Trail C, Douglas R, Tobin T. Experimentally Induced Mare Reproductive Loss Syndrome Late Fetal Losses with Eastern Tent Caterpillars. In: Proceedings of the first workshop on mare reproductive loss syndrome. Edit, Powell DG, Troppman A, Tobin T, Kentucky Agricultural Experiment Station University of Kentucky College of Agriculture Maxwell H, Gluck Equine Research Center Lexington, Kentucky 40546, 2002; 80-1.
 26. Sebastian MM, Bernard WV, Riddle TW, Latimer CR, Fitzgerald TD, Harrison LR. Mare reproductive loss syndrome. Vet Pathol 2008; 45: 710-22.
 27. Sebastian MM, Bernard W, Fitzgerald T. Mare reproductive loss syndrome. Compend Contin Ed Pract Vet 2006; 1: 20-35.
 28. Tobin T, Brewer K (2013): The Mare Reproductive Loss Syndrome (MRLS), the Septic Penetrating Setal Emboli Pathogenesis thereof and Recently Reported Caterpillar

Related Abortions in Camels.
www.thomastobin.com. Accession date:
19.09.2013.

29. Tibary A, Fite C, Anouassi A, Sghiri A. Infectious causes of reproductive loss in camelids. *Theriogenology* 2006; 66, 633-47.
30. Todhunter KH, Perkins NR, Wylie RM, Chicken C, Blishen AJ, Racklyeft DJ, Muscatello G, Wilson MC, Adams PL, Gilkerson JR, Bryden WL, Begg AP. Equine amnionitis and fetal loss: the case definition for an unrecognised cause of abortion in mares. *Aust Vet J* 2009; 87(1): 35-8.
31. Todhunter KJ, Riddle WT, LeBlanc MM, Estes R, Stromberg AJ. Ultrasonographic appearance of fetal fluids between 55 and 176 days of gestation in the mare: effect of mare reproductive loss syndrome. *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners* 2002; (48): 350-2.
32. Volpato G, Nardo AD, Rossi D, Saleh SML, Broglia A. 'Everybody knows', but the rest of the world: the case of a caterpillar-borne reproductive loss syndrome in dromedary camels observed by Sahrawi pastoralists of Western Sahara. *J Ethnobiol Ethnomed* 2013; 9 (5): 1-11.
33. Webb BA, Barney WE, Dahlman DL, Collins C, Williams NM, McDowell KJ. Induction of Mare Reproductive Loss Syndrome by Directed Exposure of Susceptible Mares to Eastern Tent Caterpillar Larvae and Frass. In: *Proceedings of the first workshop on mare reproductive loss syndrome*. Edit, Powell DG, Troppman A, Tobin T, Kentucky Agricultural Experiment Station University of Kentucky College of Agriculture Maxwell H, Gluck Equine Research Center Lexington, Kentucky 40546, 2002; 78-9.
34. Webb BA, Barney WE, Dahlman DL, DeBorde SN, Weer C, Williams NM, Donahue JM, McDowell KJ. Eastern tent caterpillars (*Malacosoma americanum*) cause mare reproductive loss syndrome. *J Insect Physiol* 2004; 50, 185-93.

Correspondence Author:

Prof. Dr. Abdullah INCI
Vectors and Vector-Borne Disease Implementation
and Research Center, Erciyes University, Kayseri/
TURKEY
e-mail: ainci@erciyes.edu.tr
Tel: 05336635972



Türkiye'deki Progeny Test Çalışmalarına Genel Bir Bakış

Mehmet Borga TIRPAN¹, Necmettin TEKİN¹

¹ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Ankara- TÜRKİYE

Özet: Gelişmekte olan hayvancılık sektörü için hayvansal üretimin artırılması çok önemlidir. Hayvan başına düşen verimi artırmak ve yüksek verimli ırkların devamlılığını sağlamak ülke hayvancılığı için gerekli unsurların başında yer almaktadır. Yüksek verimli damızlık hayvanların seçimi, damızlık sürülerin yüksek genetik özelliklerini yavruya aktarması, sürünün daha verimli hale gelmesine, böylelikle de ülke hayvancılığının ve işletmelerin gelişmesine yardımcı olmaktadır. Dünyada, hayvancılık sektörü gelişmiş hemen her ülkenin kendine ait bir yavru (döl) kontrolü (*progeny test*) programı olduğu görülmektedir. Gelişmiş ülkeler, kendi koşullarında ıslah etmek istediği özellikler bakımından en yüksek verimi sağlayabilecek boğaları seçerek sürülerinin verimini artırmaktadır. Bu süreçte Türkiye'de de Progeny Test çalışmaları 1989 yılında İtalya ile ortak bir çalışma kapsamında başlatılmış ve ilk adım atılmıştır. İlerleyen yıllarda ise bu çalışmanın devamı kapsamında yeni bir proje başlatılmış ve bu projede de yedinci döngü tamamlanmıştır. Gelişmekte olan hayvancılık sektöründe, Türkiye'nin ihtiyacı olan yüksek verimli sürülerin elde edilmesinin, bu tür projelerin hayata geçirilmesiyle mümkün olduğu belirlenmiştir. Amaçlanan yüksek verimli sürülerin, ülke şartlarına uygun bir ıslah programı çerçevesinde üretilen hayvanlardan oluştuğu takdirde istenilen hedefe ulaşılabileceği unutulmamalıdır. Özet olarak, her ülke ıslah stratejisini kendi ekonomik koşulları doğrultusunda planlamalıdır.

Anahtar Kelimeler: Damızlık, damızlık boğa, yavru kontrolü

An Overview of Progeny Test Studies in Turkey

Summary: Increasing the livestock production is critical for the developing livestock industry. It is necessary to enhance the efficiency per animal and to ensure the progression of highly efficient breeds for national breeding. Selection of highly efficient animals for breeding and transferring the high genetic traits to their offsprings make herds become more efficient both at enterprises and national livestock levels. Across the globe, all the countries with developed husbandry sector have their own progeny testing programmes. Developed countries increase the productivity of their herds by choosing sires that can provide the highest productivity for the traits they want to improve at their local conditions. In this process, progeny testing studies in Turkey has been initiated under a joint study with Italy in 1989, and the first step has been taken. In the following years, subsequent project as part of this study was initiated and seventh cycle has been completed in this project. In developing livestock industry, it would be possible to achieve these objectives by increasing these kinds of projects towards obtaining highly efficient herds required by Turkey. One should bear in mind that highly efficient herds aimed would only be achievable in an appropriate breeding program that could best fit with the conditions of the country. In summary, the breeding strategies of each country have to be planned in accordance with their own economic conditions.

Key Words: Progeny test bulls, progeny test, sire

Giriş

Geçmişten günümüze tercih edilen ve istenen özelliklere sahip olan boğalar damızlık olarak ayrılmaktadır. Böylelikle, sürü içindeki özel bireylere diğerlerine göre daha fazla yavru verme olanağı sağlanır (5). İstenilen özellikteki hayvan türlerinin üremelerine olanak vererek, verim arttırıcı genlerin oranı yükseltilmiş olur. Arzu edilmeyen özelliklere sahip hayvanlar ise sürüden uzaklaştırılarak yavrularına aktarmaları istenmeyen genlerin oranı düşürülür. Sonuçta, yüksek verimli hayvanların sayısı

artar ve amaca uygun yani ıslah edilmiş bir sürü oluşturulmuş olur (1,3). Hayvancılığı gelişmiş ülkelerde, sağlıklı ve yüksek verimli nesiller bu tür çalışmalarla oluşturulmaktadır (13). Avrupa Birliği uyum sürecindeki ülkemizde, mevcut yetiştiricilik koşulları en ekonomik üretim sistemlerinin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Son yıllarda, bu ekonomik nedenlerden dolayı ülkemizdeki entansif süt işletmeciliği ve beraberinde suni tohumlama uygulamalarının önemi bu ekonomik nedenlerden dolayı giderek artmaktadır (8,19). T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na bağlı Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü (TÜGEM) ile İtalya Holstein-Friesian Süt Sığırı Yetiştiricileri Merkez Birliği (ANAFI) tarafından or-

taklaşa gerçekleştirilen ve 1989-1994 yılları arasında uygulamaya konulan TURK-ANAFI projesi kapsamında, sahada sağılan süt miktarının belirlenmesi için, ineklerin kayıt altına alınması uygulaması Türkiye için de başlamış oldu (9). Bu çalışmanın bir devamı niteliğinde, TÜGEM ile Türkiye Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği'nin (TDSYMB) birlikte yürüttükleri yeni bir "Yavru (Döl) Kontrolü Projesi" hayata geçirilmiştir. Bu kapsamda İzmir / Menemen Suni Tohumlama laboratuvarı boğaların barındırılması ve sperma üretimi için tahsis edilmiştir. Ayrıca Manisa/Beydere Tohum ve Sertifikasyon Müdürlüğü karantina ve sperma üretimi öncesi yetiştirme yeri olarak kullanılmıştır (8). Proje işleyişi kapsamında Menemen Suni Tohumlama Laboratuvarı'nda yedinci döngü tamamlanmış, test örnekleri işletmelere gönderilmiş ve birçoğunun kızlarının verim özellikleri elde edilmiştir (18). Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği 2013 boğa kataloğuna göre, toplam 57 adet progeny teste tabi tutulmuş boğanın sperması bulunmaktadır (17). Avrupa Birliği uyum sürecinde Türkiye'de hayvancılığın geliştirilmesi yönündeki çalışmaların daha da fazlaşması gerekliliği kaçınılmazdır.

Progeny Test (Yavru (Döl) Kontrolü)

Bir boğanın kızlarının verim ortalamalarının belirlenmesi ve ortaya çıkan bu değerlerin test dönemindeki tüm boğaların kızlarının genel ortalamasından farkının ortaya konulması, yavru ya da nesil kontrolü 'progeny test' olarak adlandırılır (4). Birçok araştırmacı progeny test boğalarının başarısını kayıtlı boğa sayısına, seleksiyondaki hassasiyete, progeny grup boyutuna, inek seçimine ve en az 5 nesil verim özelliklerinin incelenmesine dayandırmışlardır (2, 11, 20). Pratikte ise progeny test programının etkinliği; sürü sahibine, tohumlama yapan personele, doğan yavrunun kimliklenmesine ve kızların ilk laktasyona kadar elde tutulmasına bağlıdır (10). Progeny testin başlıca hedefi, en sağlıklı, en üstün verim kapasitesine sahip ve bu özelliklerini en uzun süre sürdürebilen hayvanları seçmek ve seçilen bu hayvanların genetik özelliklerinin sürdürülmesini sağlamaktır (4).

Bu uygulamanın iki dezavantajı vardır: Bunlardan birisi, kontrole tabi tutulacak aday boğalara tahsis edilen ineklerden bir yıl için damızlık değerlerine pek güvenilmeyen yavrular alınması, diğeri ise aday boğaların dişi yavrularının ilk laktasyon verimi belli oluncaya kadar elde tutulma zorunluluğudur. İlk sakınca, yetiştirici derneğine kayıtlı bütün işletmelere dişi yavrular üçer-beşer dağıldığı için önemsenmez. Aday boğalara tahsis edilecek dişilerin düve olmaları halinde söz konusu zararın

önemi de azalır. Çünkü dişi hayvanların ilk yavruları zaten, analarının gerçek verim kabiliyetleri belli olmadığından, çok nadir durumlarda damızlığa ayrılırlar; ancak, bu sakınca spermanın derin dondurularak saklama tekniği ile önemli ölçüde giderilmiş olmaktadır. Uygulamanın diğer dezavantajının giderilmesi için ise yavruların tam laktasyon verimleri yerine kısmi (60-120 günlük) verimleri ile yapma olanakları araştırılmaktadır. Bu yöndeki araştırmalardan çoğu, bunun boğa başına dişi yavru sayısını arttırmak suretiyle mümkün olabileceğini gösterir (6).

Damızlıkların bazı verim ve fiziksel özellikler yönünden genetik değerinin en doğru şekilde tespit edilmesinde ve sürülerde genetik ilerlemenin sağlanmasında kullanılan en etkili ve isabetli yöntemin yavru (döl) kontrolü (progeny test) olduğu belirtilmektedir (13).

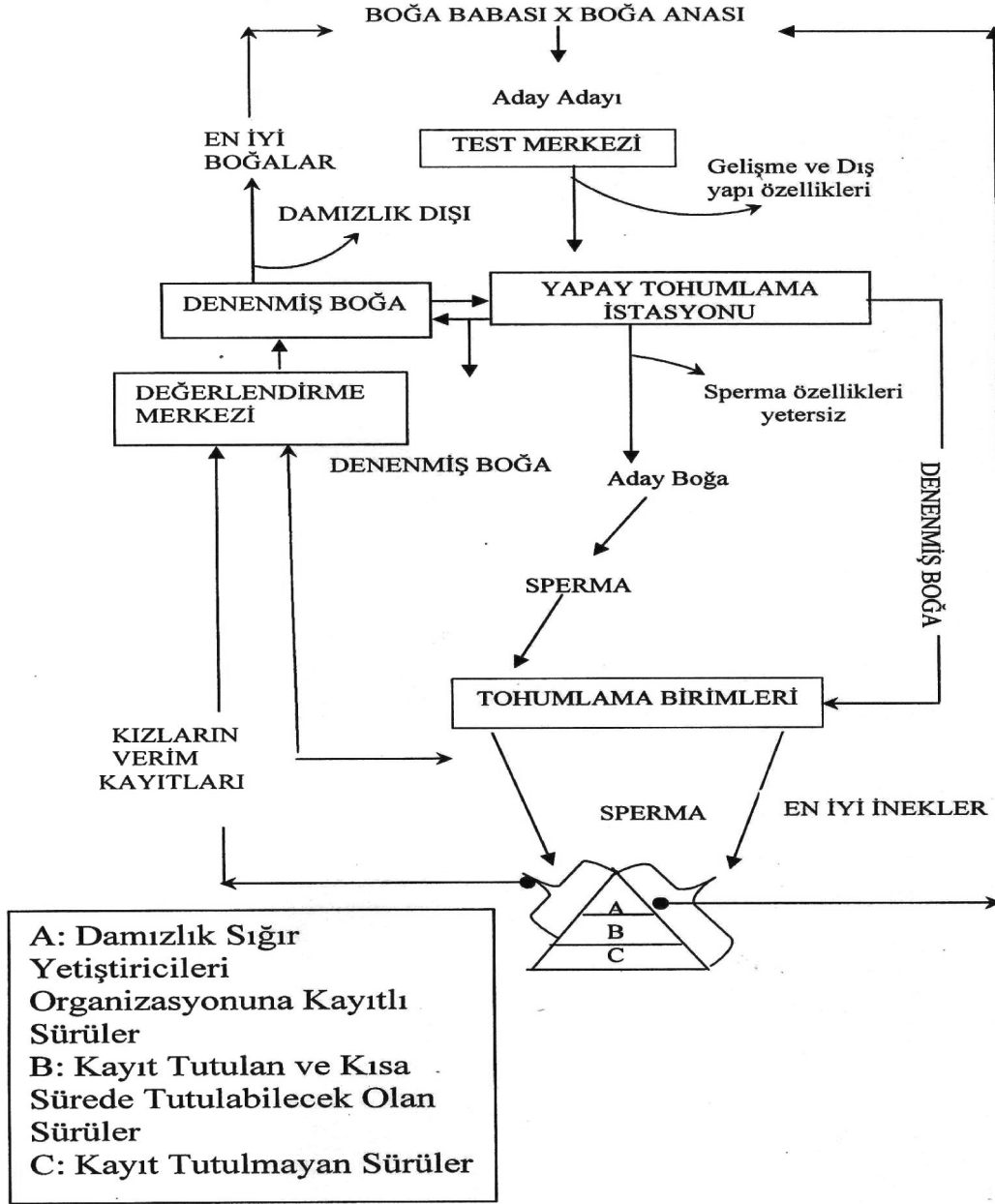
Yavru (Döl) kontrol programının işleyişi: Yüksek verimli inek ve boğaların, belli amaçla çiftleştirilmeleri sonucu elde edilen ve sağlık yönünden bir sorun taşımayan genç erkek hayvanlara "aday adayı boğa" denir. Bu boğalardan, yaşayabilen ve dış yapı ve sperma kalitesi gibi özellikler bakımından herhangi bir sorun taşımayan boğalar da "aday boğa" olarak tanımlanır (2).

Sperma verecek çağa geldiklerinde aday boğalardan sperma toplanır ve her adayın rastgele seçilmiş ineklerden öngörülen sayıda kızının olmasını sağlayacak tohumlamalar yapılır. Bu tohumlamadan doğan dişi yavruların damızlık çağa ulaşması ve doğurması sağlanır (2).

Boğalar dişi yavrularına göre değerlendirilirken, 305 günlük süt veriminin yanı sıra sütteki yağ ve protein oranı, dış yapı özellikleri, süt kalite ölçütleri vb. özelliklerin birlikte ele alınması gerekebilir. Bu amaçla, her bir hayvan için, üzerinde durulan özellikler ve bunların ekonomik önemleri dikkate alınarak, toplam değer tahminleri ya da birkaç indeks değeri hesaplanır. Kullanılan ölçüt bakımından yüksek değerli olan boğalardan ihtiyaç duyulan kadarı seçilir. İndeks değerine göre, seçilecek boğaları tanımlamada alt ya da üst değer sınırı yoktur. Bireylerin seçimi, indeks değerinin sıralanışına göre yapılır (2).

Değerlendirme sonucu boğalar 'denenmiş boğa' olarak tanımlanır. Bunlar arasından yüksek değeri nedeniyle yeni kuşak aday adayı olacak boğalara baba olarak seçilenlere "boğa babası", bunlarla birlikte sürüde kullanılmasına karar verilenlere de "esas boğa" denir (2).

Süt sığırlarında uygulanabilecek ve çeşitli aşamalarına yukarıda değinilen bir yavru (döl) kontrolü programı Şekil 1'de şematize edilmiştir (2).



Şekil 1. Süt sığırlarında yavru (döl) kontrolü programının işleyişi (2).

Sürünün zayıf ve güçlü taraflarının tespit edilmesi çok önemlidir. Buna göre, boğanın belirli özelliklerine dikkat edilerek damızlık erkek danalardan ya da genç boğalardan seçim yapılmalıdır (7). Damızlık boğa adayı seçiminde, elde edilecek başarının artırılması için bazı kriterlere dikkat etmek gerekir: Boğa anaları ve babaları iyi bir ön seçimle belirlenmelidir.

Test kapasitesi oranında boğa adayı seçilmelidir.

Fazla sayıda boğa test edilerek, erkekler arasında çok yoğun bir seleksiyon yapılmalıdır.

Babanın her çeşit genlerinin yavrularına geçmesini sağlamak ve güvenilir sonuçlar elde etmek için boğa adaylarına düşen yavru sayısı fazla olmalıdır.

Her boğaya ait yavru grubu benzer çevre şartlarında tutulmalıdır.

Çevresel etkiler uygun tekniklerle yok edilmelidir (13).

İşletmelerin, kendi koşulları için bir tercih yapmaları ve boğa seçim amaçlarının ekip çalışması yapılarak seçilecek boğanın işletmeye ne yönde katkı sağlayacağı belirlenmelidir.

Boğanın düvelerde, ergin ineklerde ya da her ikisinde de kullanılıp kullanılmayacağına bilinmesi gerekmektedir.

Sürüden elde edilen dişilerin hangi amaçla kullanılacağı bilinmelidir (yeni sürü oluşturmak gibi).

İşgücü olanakları, yem kaynakları ve çevre şartlarının durumu dikkate alınmalıdır (15).

Seçimde dikkat edilecek diğer hususlar; seçilen boğanın yavru sayısının fazla olması, suni tohumlama uygulanacak grupların farklı çevre şartlarına maruz kalmamaları ve boğaların değer tahminleri tespitinden önce seçilmemesidir (3).

Ayrıca, aday adayı damızlıkların erkek üreme organları androlojik muayene sistematiğine göre yapılmalıdır. Elde edilen spermalar, spermayla bulaşan hastalıklar yönünden incelenmelidir. Sperma toplama istasyonları bir hijyen programı dahilinde çalışmalı ve teste tabî tutulan hayvanların rutin aşıları ve sağlık kontrolleri Veteriner Hekimler tarafından yapılmalıdır (4,16).

Türkiye'de Progeny Test Uygulamaları

Avrupa Birliği uyum sürecindeki ülkemizde, özellikle bu entegrasyondan en fazla etkilenecek olan hayvancılık işletmelerinde, mevcut yetiştiricilik koşulları en ekonomik olan üretim sistemlerinin geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Halka ucuz ve sağlıklı ürünler sunmanın yolu; maliyetlerin düşük tutulması, etkin işletme yönetimi, hayvan bakım ve idaresinin kalitesi, işletmedeki optimal sağmal inek sayısı, genetik olarak yüksek verimli hayvanların yetiştirilmesi ve bu verimin uzun yıllar devamına bağlıdır. Bu kriterler içinde, hayvan başına düşen verimin artırılması ve yüksek yavru verimi başarı için ön koşullardır. Damızlık değerinin üstün olduğu kanıtlanmış boğalarda, kazanılmış genetik özellikler suni tohumlama ile dişi hayvanlara kolayca aktarılabilir. Son yıllarda, ülkemizdeki entansif süt işletmeciliği ve beraberinde suni tohumlama uygulamalarının önemi bu ekonomik nedenlerden dolayı giderek artmaktadır (8,19).

TÜGEM ile ANAFİ tarafından ortaklaşa gerçekleştirilen ve 1989-1994 yılları arasında farklı illerimizde (İzmir, Aydın, Balıkesir, Uşak, Isparta, Muğla, Denizli, Ankara, Antalya, Kütahya, Kastamonu, Çanakkale ve Tekirdağ) uygulanan TURK-ANAFİ projesi, Türkiye hayvancılığı için gerçekten bir dönüm noktasıdır. Bu proje kapsamında, sahada sağılan süt miktarının belirlenmesi için, ineklerin kayıt altına alınması uygulaması Türkiye için de başlamış oldu. Bulunan sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. TÜRK-ANAFİ Proesi değerlendirilmesi (9)

Değerlendirilen kriter	Türkiye'de doğan	İthal edilen	İstatistiksel önem
İlk Buzağılama Yaşı	28.8 ay	27.6 ay	P<0.01
305 günlük Süt Verimleri	6.182 kg	6.281 kg	P<0.05
Toplam Süt Verimleri	6.761 kg	6.897 kg	P<0.01
Laktasyon Süresi	333.9 gün	338.1 gün	P<0.05
Servis Periyodu	132.7 gün	143.4 gün	P<0.01
Kurudaki Süre	79.2 gün	77.3 gün	P>0.05
Verimli Yaşam Süresi	21.6 ay	36.1 ay	P<0.01

Çalışmada, İtalyan Holsteinlerinin ülkemiz hava ve barınak koşullarına çok iyi adapte olduğu, Türkiye'de doğanlara nazaran ilk buzağılama yaşlarının düştüğü, süt verimlerinin önemli oranda arttığı ve verimli yaşam sürelerinin çok daha fazla olduğu görülmektedir (9).

Bu çalışmanın bir devamı niteliğinde, TÜGEM ile TDSYMB'nin birlikte yürüttükleri yeni bir "Yavru (Döl) Kontrolü Projesi" hayata geçirilmiştir. Bu proje kapsamında, soy kütüğü kaydı tutulan işletmelerin bulunduğu farklı iller (Antalya, Aydın, Balıkesir, Burdur, Bursa, Denizli, Edirne, Eskişehir, Isparta, İzmir, Kırklareli, Konya, Manisa, Muğla, Sakarya, Samsun, Tekirdağ, Aksaray, Kastamonu, Amasya, Çorum, Çanakkale ve Uşak) projeye dahil edilmiştir (8).

Bu kapsamda, İzmir / Menemen Suni Tohumlama laboratuvarı boğaların barındırılması ve sperma üretimi için tahsis edilmiştir. Ayrıca Manisa / Beydere Tohum ve Sertifikasyon Müdürlüğü karantina ve sperma üretimi öncesi yetiştirme yeri olarak kullanılmıştır. Proje kapsamında, seçilerek tohumlanmış ineklerden doğan erkek buzağular ilk 6-8 hafta içerisinde bir komisyon tarafından görülerek gelişme durumu bakımından değerlendirilmektedir. Değerlendirme sonucu olumlu olan erkek buzağular satın alınmakta ve Menemen Suni Tohumlama laboratuvarlarında barındırılmaktadır (8).

Boğa adayı erkek buzağular, 15 gün karantinada tutulmakta, bir yaşını tamamladıktan sonra Merkez Birliği tarafından yetkilendirilen bir komisyon tarafından sınıflandırılmaktadırlar. Sınıflandırmada başarılı olan boğalara sperma kalite testi yapılmakta ve en başarılı boğalar sperma alımı için kullanılmaya aday olarak belirlenmektedir. Sperma alımından önce Merkez Birliği'nin belirlediği bir komisyon tarafından aday adayı boğaların büyüme ve dış görünüş özellikleri tekrar değerlendirilmektedir. Sperma muayenelerinde, sperma özellikleri yeterli görülen boğalardan sperma alımı yapılmakta ve elde edilen spermalar depolanmaktadır. Depolanan spermalar illerin soy kütüğüne kayıtlı inek sayısı dikkate alınarak ücretsiz olarak ilgili illere tahsis edilmektedir. Bu spermalar, ilk buzağısını doğurmuş (1. laktasyondaki) ineklerin tohumlanmasında kullanılmaktadır. Boğaların sağlık testleri Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü tarafından yürütülmektedir. Testlerde herhangi bir olumsuzlukla karşılaşıldığında boğalar kesime gönderilerek, önceki testten itibaren üretilen spermalar imha edilmektedir (8).

Her bir aday boğadan alınan ilk 500-750 doz sperma, diğer boğalardan alınan spermalarla birlikte kanisterlere karışık bir şekilde konularak illere gön-

derilmektedir. Aday boğaların spermaları üye işletmelerde ikinci buzağısına gebe kalacak ineklere rastgele, planlama yapılmadan kullanılmaktadır. Sonuçta, her aday boğa sperması ile en az 120 inek (ortalama 150 inek) gebe bırakılmaya çalışılmaktadır. Hedef, her boğanın en az 20 (ortalama 30) kızının 1. laktasyon kaydının alınmasıdır. Her bir aday boğadan alınan spermalarından 15000 doz İstasyon ve İl Birlikleri aracılığı ile piyasaya sürülmektedir. Geri kalan aday boğa başına 5000 doz sperma ise damızlık değer tahmini sonuçları kesinleşinceye kadar, laboratuvarlarda saklanmaktadır (8).

Aday boğaların spermaları ile tohumlanan 1. laktasyonundaki ineklerden elde edilen kızlar, yaklaşık 15-16 aylık iken tohumlanmaktadır. Bu kızların doğum yapmalarının ardından, laktasyonda buldukları süre içerisinde verim kayıtları alınan ve laktasyon sonunda yapılacak değerlendirmeyle aday boğalar sıralanmaktadır. Sıralamada ilk 10'a giren boğaların spermaları soy kütüğü kaydı tutulan işletmeler öncelikli olmak kaydıyla kullanıma sunulmaktadır. Ayrıca, Yavru Kontrolü programı süresince hayvanların sağlık ve hastalıklarla ilgili testleri bir program dahilinde yapılmaktadır (8).

Yukarıda belirtilen proje işleyişi kapsamında üretilen spermaların satılması için 2002 yılında pazarlama ağı oluşturulmuş olup, bu amaçla TDSYMB'nin iki tonluk azot tankı monteli bir kamyonu çalışmaktadır. Tablo 2 'de gösterildiği üzere; Menemen Suni Tohumlama Laboratuvarı'na yavru kontrolü projesi kapsamında yedi döngü tamamlanmış, bu döngülerde toplam 136 boğa adayı gelmiş, bunlardan 93 tanesi teste dahil edilerek spermaları alınmış, test örnekleri işletmelere gönderilmiş ve birçoğunun kızlarının verim özellikleri elde edilmiştir (18). Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği 2013 Boğa Kataloğu'na göre, toplam 57 adet progeny teste tabi tutulmuş boğanın sperması bulunmaktadır. Boğalardan iki tanesi Simental, üç tanesi Esmer, geriye kalan 52 tanesi ise Siyah Alaca ırkıdır. Katalogta, boğalardan 47 tanesinin kızının verim özelliklerinin belirlendiği, geriye kalan 10 adet boğadan beşinin Siyah Alaca, üçünün Esmer ve ikisinin Simental olduğu ve henüz kızlarının verilerinin bulunmadığı gözlenmiştir (17).

Dünyada ise progeny test çalışmaları farklı değerlendirme skorları ve farklı kriterlere göre gerçekleştirilmektedir. Her ülkenin toplam değer indeksinde (Total Merit İndeks-TMI) üretim ve tip özellikleri değerlendirme yöntemlerine göre farklı isimlerde ve ağırlıklarda yer almaktadır. Amerika Birleşik Devletleri değerlendirme yöntemlerinde TMI, TPI ya da NM olarak adlandırırken; İsveç, TMI; Dani-

Tablo 2. Yavru (Döl) Kontrolü Projesi-son durum, Ekim 2013 (18)

Döngü	İstasyona gelen aday boğa sayısı	Elde sperması bulunan boğa sayısı	Test sperması dağıtılmış boğa sayısı	Halen sperması alınan boğa sayısı	İstasyondaki boğa sayısı
1	34	26	26	0	0
2	24	18	18	0	0
3	22	10	10	0	0
4	23	19	19	0	0
5	9	8	8	0	0
6	10	6	6	0	0
7	14	6	6	6	14
Toplam	136	93	93	6	14

marka, S-İndeks; Kanada, LPI; İtalya, PFT ya da ILQM; Almanya, RZG; Fransa, ISU; Yeni Zelanda, BW; İngiltere ise TOP olarak adlandırmaktadır. Her indeksin değerlendirme skalası da farklı olabilmektedir. Buna göre, bir boğanın TMI'sı Amerika Birleşik Devletleri'nde 1418 olarak gösterilirken, İsveç'te TMI: 19 olarak ya da İngiltere'de TOP: 506 olarak değerlendirilebilmektedir. Süt protein oranı, süt yağ oranı, tip, dayanıklılık, meme sağlığı, fertilitte ve hastalıklara direnç başlıca değerlendirmeye alınan kriterlerdir (4). Progeny testin başarısı her ülkenin resmi kriterlerine göre farklılıklar gösterir. Ülkelerin kendi yetiştirme hedefleri vardır ve bunlar zamanla geliştirilir ve böylelikle uluslararası TMI da değişir (14).

Sonuç

Sonuç olarak; progeny test, başta verim özellikleri olmak üzere sağlık, dayanıklılık ve fertilitte yönünden üstün özelliklere sahip olan ve bu genetik potansiyellerini gelecek kuşaklara aktarabilecek hayvanların seçiminin yapılabilirdiği yöntemdir. Bu doğrultuda günümüzde birçok ülkede progeny test çalışmaları yapılmaktadır. Türkiye'de 1989 yılında ilk olarak hayata geçirilen TÜGEM ile ANAFI tarafından ortaklaşa gerçekleştirilen, TURK-ANAFI projesi kapsamında, sahada sağılan süt miktarının belirlenmesi için, ineklerin kayıt altına alınması uygulaması Türkiye için de başlamış oldu (9). Çalışmada, İtalyan Holstein ırkı ineklerin ülkemizin hava ve barınak koşullarına çok iyi adapte olduğu, Türkiye'de doğanlara nazaran ilk buzağılama yaş-

larının düştüğü, süt verimlerinin önemli oranda arttığı ve verimli yaşam sürelerinin çok daha fazla olduğu görüldü (9). Bu projenin devamı niteliğinde, TÜGEM ile TDSYMB'nin birlikte yürüttükleri yeni bir "Yavru (Döl) Kontrolü Projesi" hayata geçirilmiştir. Proje işleyişi kapsamında Menemen Suni Tohumlama Laboratuvarı'nda yedi döngü tamamlanmış, test örnekleri işletmelere gönderilmiş ve birçoğunun kızlarının verim özellikleri elde edilmiştir (18). Son elde edilen verilere göre, Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği 2013 Boğa Kataloğu'nda, toplam 57 adet progeny teste tabi tutulmuş boğanın sperması bulunduğu belirlenmiştir (17). Progeny test uygulamalarında önemli olan, ilgili ülkenin kendi koşulları içerisinde en fazla yarar sağlayacak boğaları seçip, bu boğaların spermalarını kullanarak hayvansal üretimini artırmasıdır.

Kaynaklar

1. Akçapınar H, Ünal N. Hayvan Islahı Temel Bilgileri. Ankara: AÜ Vet Fak Zootečni AD Ders Notları, 2005; pp. 34-47.
2. Akman N. Damızlık süt sığırları yetiştiriciliğinde döl kontrolü. Damızlık Sığır Yetiştiricileri Derg 1999; 6: 14-5.
3. Alpan O, Arpacık R. Sığır Yetiştiriciliği. Ankara: Şahin Matbaası, 1996; pp. 83-119.
4. Daşkın, A. Sığırcılık İşletmelerinde Reprodüksiyon Yönetimi ve Suni Tohumlama. Ankara: Aydan Web Ofset, 2005; pp. 98-136.

5. Doğan İ. Kümeleme analizi ile seleksiyon. Turk J Vet Anim Sci 2002; 26: 47-53.
6. Düzgüneş O, Eliçin A, Akman N. Hayvan Islahı. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, 2003; pp. 56-137.
7. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Hayvansal üretim, Suni tohumlama. http://www.tarim.gov.tr/uretim/Hayvansal_Uretim_suni_tohumlama.html Erişim Tarihi: 13.05.2011
8. Karagöz S. Türkiye'de döl kontrolü projesi. <http://balikesirdsyb.org/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=40>; Erişim tarihi: 25.08.2010
9. Kaya İ, Uzman C, Kaya A, Akbaş Y. Comparative analysis of milk yield and reproductive traits of Holstein-Friesian cows born in Turkey or imported from Italy and kept on farms under the Turkish-ANAFI project. Ital Anim Sci 2003; 2: 141-50.
10. Meinert TR, Norman HD, Mattison JM, Sattler CG. Usability for genetic evaluations of records from herds participating in progeny test programs of artificial insemination organizations. J Dairy Sci 1997; 80: 2599-605.
11. Meinert TR, Pearson RE. Estimates of genetic trend in an artificial insemination progeny test program and their association with herd characteristics. J Dairy Sci 1992; 75: 2254-64.
12. Norman HD, Powell RL, Wright JR, Sattler CG. Timeliness and effectiveness of progeny testing through artificial insemination. J Dairy Sci 2003; 86: 1513-25.
13. Özbeyaz C. Sığır Yetiştiriciliği. Ankara: AÜ Vet Fak Zootečni AD Ders Notları, 2006; pp. 44-5.
14. Powell RL, Norman HD, Sanders, AH. Progeny testing and selection intensity for holstein bulls in different countries. J Dairy Sci 2003; 86: 3386-93.
15. Scott PG. Bull selection - do your homework. http://www.ext.vt.edu/news/periodicals/livestock/aps-05_12/aps-279.html Erişim Tarihi: 12.06.2008
16. Tekin N. Hayvan yetiştiriciliğinde reproduktif biyotekniklerin önemi ve yeri. Vet. Hek. Derg. 2007; 78: 15-7.
17. Türkiye Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği. Boğa Kataloğu. 2013.
18. Türkiye Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği. Menemen Suni Tohumlama İstasyonu: Döl kontrolü projesi boğa envanteri. Ekim 2013.
19. Türkiye Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği. <http://www.dsymb.org.tr/?x=1&id=55> Erişim tarihi: 21.10.2013
20. Willam A, Egger-Danner C, Solkner J, Gierzinger E. Optimization of progeny testing schemes when functional traits play an important role in the total merit index. Livest Prod Sci 2002; 77: 217-25.

Yazışma Adresi:

Araş Gör. Dr. Mehmet Borga TIRPAN
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve
Sunı Tohumlama Anabilim Dalı,
06110 Dışkapı/ANKARA.
Tel: 0312-3170315 (dahili-4408)
E-mail: borgat@gmail.com



Dişi Köpeklerde GnRH Agonistlerinin Reprodüktif Kullanımı

Aytekin GÜNAY¹

¹ Uludağ Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Bursa-TÜRKİYE

Özet: Son yıllarda pet hayvan reproduksiyonu alanındaki çalışmalar GnRH agonisti deslorelinin kullanımı üzerine yoğunlaşmıştır. Deslorelin, küçük dozda yavaş salınım gösteren implant formundadır. Çalışmalar, anöstrustaki dişi köpeklerde östrusun uyarılması, prepubertal dişilerde östrusun baskılanması ile uzun süreli kontrasepsiyon üzerine odaklanmıştır. Fakat hala östrus siklusunun farklı evrelerindeki GnRH uygulamalarına ilişkin bilgi eksiklikleri bulunmaktadır. Günümüzde, GnRH agonist implantları, östrus siklusunun geri dönüşümlü baskılanması yanında anöstrustaki dişi köpeklerde fertil kızgınlıkların uyarımında dopamin agonistlerine alternatif olarak kullanım alanı bulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Dişi köpek, deslorelin, GnRH agonist, reproduksiyon

Reproductive Use of GnRH Agonists in Bitches

Summary: In recent years, studies have focused on use of GnRH agonist desloreline in small animal reproduction. Desloreline is in the form of an implant exhibiting slow release at low doses. Research has focused on the use of GnRH implants for long-term contraception the induction of oestrus in anoestrus and suppression of oestrus in prepubertal bitches. However, there is still lack of information about GnRH treatment in different stages of oestrus cycle. Nowadays, GnRH agonist implants can be used as an alternative to dopamine agonists to induce fertile oestrus of bitches in anoestrus as well as to suppress oestrus.

Key Words: Bitch, desloreline, GnRH agonist, reproduction

Giriş

GnRH, memelilerde reprodüktif fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynayan dekaeptit yapıda bir hormondur (13,23,24,31). Yarılanma ömrü 2-4 dakika olup pulzatil olarak her 20-30 dakikada bir hipofizyal portal sisteme salınmaktadır (24,29). Her salınım LH dalgası oluşturmakta fakat FSH dalgası oluşturmadığı belirsizdir. GnRH pulzasyon sıklığı, ovulasyon öncesi LH dalgasının yoğun olduğu dönemde en fazla, luteal fazda ise en düşüktür. Endojen GnRH sekresyonunun aralıklı salınım sıklığına sahip olması gonadotropin fonksiyonunun sürekliliği için gerekmektedir (1,24).

GnRH analogları ve etki biçimleri

GnRH agonist ve antagonistleri dişi ve erkek köpeklerde fertilitenin ve reprodüktif olayların kontrolünde yaygın kullanım alanı bulmaktadır (1,24,25). GnRH antagonistleri uygulandıklarında önemli miktarda histamin salınımı, mast hücre degranülasyonu, ödem ve anafilaktik reaksiyonlara neden olabilmeleri ve üretim maliyetlerinin yüksekliği gibi

sebeplerle agonistlerine göre kullanımı sınırlı kalmaktadır (12,25). GnRH antagonistleri, GnRH reseptörlerine bağlanabilmek için endojen GnRH ile yarışmakta, reseptörlere bağlanarak endojen GnRH'nın reseptörleri uyarmasını engellemekte ve sonuçta gonadotropinlerin ve steroidlerinin salınımında ani bir düşüş meydana getirmektedirler (1,29).

GnRH agonistleri, enzimatik yıkımlanmalarla değişime uğramış GnRH'ya benzeyen peptidlerdir (1,12,25). Yarılanma ömürlerinin uzun olması, GnRH agonistlerinin doğal GnRH'dan daha düşük dozlarda uygulanmalarına olanak sağlar ve hipofizdeki gonadotropin içeriğinde azalma meydana gelir (3). GnRH agonist tedavilerinde akut ve kronik olarak iki faz tanımlanmaktadır. Akut faz, FSH ve LH'nin birkaç gün artışı ile karakterizedir ve bu hormonların bazal seviyelere düşüşüyle sonlanır. Kronik faz ise GnRH reseptörlerinin agoniste sürekli maruz kalması, LH'nin pulzatil salınım mekanizmasının bozulması ve sonuçta LH ve FSH sentezinin azalması ile karakterizedir. Bunun sonucunda folliküllerin gelişimi, östrojen sentezi ve ovulasyon durur. GnRH agonisti eşik değerin üzerinde seyrettiği sürece LH miktarındaki eksiklik devam eder (18).

GnRH agonistleri ile fertilité kontrolü

Günümüzde dişi köpeklerde östrusun uyarılması amacıyla yaygın olarak bromocriptin (4,21,40) ya da cabergoline (5,10,11,14,15,16) gibi dopamine agonistleri kullanılmaktadır. Cabergoline ile yapılan çalışmalarda tedavi edilen hayvanların % 80'inden fazlasında östrus şekillenmekte ve bu sikluslar ovulasyonlu olup gebelikle sonuçlanmaktadır (5,10,11,14,15,16). Son yıllarda bu ilaçlara alternatif olarak dişi köpeklerde östrusu uyarmada GnRH agonistleri kullanılmaktadır (35,36,37). GnRH agonist uygulamalarının başlangıcında FSH ve LH konsantrasyonlarında birkaç gün sürebilen belirgin artış meydana gelir ki, bu etki flare-up olarak tanımlanır. Bu durum bazen ovulasyonlu bazen de ovulasyonsuz bir östrus uyarımıyla karakterizedir (34,37). Özellikle anöstrus dönemindeki köpeklerde östrusun uyarımında GnRH agonistleri başarılı sonuçlar vermektedir. GnRH agonisti desloreline, implant formunda iki formülasyonda (4.7 mg ve 9.4 mg) kullanılabilir (8,20,27,28,32,33). Desloreline tam bir GnRH agonisti yapısında olup GnRH'nın aminoasit yapısında yer alan glisinini yerini D-triptopan almasıyla oluşmuştur. Tanımlanan bu özellik nedeniyle desloreline dolaşımdaki yarılanma ömrü artmaktadır (25).

Kaya ve ark. (20), puberte öncesi dönemdeki dişi köpeklerde desloreline implantın "flare-up" etkisine neden olmadığını ve bu etkinin özellikle puberteye yakın dönemlerde oluşup oluşmadığına yönelik yeni çalışmalara ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir.

GnRH agonisti desloreline ile yapılan çalışmalarda östrus uyarma oranlarının %65'in üzerinde, fertilité sonuçlarının ise %25-69 arasında değiştiği belirtilmektedir (8,35,36). İmplantın uygulandığı anda köpeğin siklusun hangi safhasında olduğu, implantı uzaklaştırma ve ovulasyon zamanı gibi faktörlerin fertilité sonuçlarını etkileyebileceği araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (8,35,36,37). Östrusun uyarılması amacıyla yapılan bir araştırmada (8), farklı ırktan 32 köpek iki gruba ayrılmış, I. gruba bir önceki östruslarından 80-160 gün geçmiş 8 köpek, II. gruba ise bir önceki östruslarından 200-590 gün geçmiş 24 köpek oluşturmuştur. Tüm köpeklerin desloreline implant yerleştirildikten ortalama 4.3 ± 1.4 gün sonra (2-6 gün) kızgınlığa geldiği, ovulasyon oranının I. ve II. grupta sırasıyla; %62.5 ve %87.5 olarak saptandığı belirtilmiştir. Söz konusu araştırmada desloreline implant uygulamalarının anöstrustaki köpeklerde östrusu uyarmada kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Diğer bir araştırmada (29), anöstrusta olan ve bir önceki sikluslarından en az 160 gün geçmiş 16 dişi

köpekte östrusu uyarmak amacıyla desloreline implant (4.7mg) uygulanmıştır. Uygulamadan sonra östrusun uyarılma oranı %100, ovulasyon oranı % 81.3, gebelik oranı ise %68.8 olarak saptanmıştır. Walter ve ark. (37) 4.7 mg. dozda desloreline implantın anöstrus dönemindeki köpeklerde östrusu uyardığını ve ovulasyonun şekillendiğini ifade etmişlerdir.

Uzun süreli olarak agoniste maruz kalmak, gonadotrop hücrelerin yüzeylerindeki GnRH reseptörlerinin down-regülasyonu ile sonuçlanır. LH'nın pulzatile salınımı bozularak, LH ve FSH sentezleri azalır. Bu durum endojen GnRH'ya karşı hipofizer yanıtı bozar. Eşik değerin altındaki FSH salınımına folliküler gelişimin ve ovulasyonunun şekillenmemesi eşlik eder (18). Böylece GnRH agonistlerinin uygulanma sürelerine bağlı olarak dişi köpeklerde östrusu uyarma yanında östrusu geri dönüşümlü olarak baskılama özellikleri de karşımıza çıkmaktadır (22,27).

GnRH agonistleri, erkek ve dişi köpeklerde reproduktif fonksiyonu geri dönüşümlü olarak baskılamada herhangi bir yan etki göstermeyen depo formülasyonları ile geniş bir uygulama alanı bulmaktadır (7,18,27,34,38). Nafareline ve desloreline köpeklerde bu amaçla üretilmiş GnRH agonistleri olmakla beraber, desloreline popüler ve yaygın kullanım alanı bulmuştur. Desloreline daha az yan etkiye sahip olması, uzun süreli salınımı ve uygulanma rahatlığı gibi avantajları ile sürü hayvancılığı yanında kedi ve köpek reproduksiyonunda da uygulama şansı bulmuştur. Desloreline, hem dişi (6,18,28,30,38) hem de erkek (7,19,34) köpeklerde uzun süreli implant formunda, yan etki göstermeksizin hipofizdeki gonadotropinlerin GnRH reseptörlerinin down-regülasyonunu sağlayarak, reproduktif fonksiyonları baskılayabilme potansiyeline sahiptir. Erkek köpeklerde şirurjikal kastrasyonun dönüşümsüz olması, operasyona bağlı travmalar, anestezi riski ve bazı hayvan sahiplerinin bunu bir seçenek olarak görmemeleri gibi dezavantajları bulunmaktadır (7,18). Bu nedenlerle hormonal tedaviye yönelinerek, GnRH agonistlerinin köpeklerde sürekli uygulanması ile anti-fertilité ajanları olarak kullanımı klinik uygulamada yerini bulmuştur (7,12,19,25,27).

Anöstrus dönemindeki dişi köpeklerde desloreline implant ile östrus uyarımını önleyebilmeyi araştıran Corrada ve ark. (6) uygulamadan (10 mg) dört gün öncesinden başlanılarak kısa süreli megestrol asetat (2mg/kg; 8 gün) uygulamasının östrus belirtilerini önlemede başarılı sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra, agonist uygulamalarında eğer plazma progesteron konsantrasyonları 5ng/ml'nin altındaysa genellikle 4-8 gün içerisinde östrusların

şekillendiği ve bu östrusların agonist uygulamasından önce veya sonra 2 mg/kg dozda oral progesteron uygulamasıyla baskılanabileceği ifade edilmiştir (38). Anöstrustaki dişi köpeklerde yapılan başka bir çalışmada ise, deslorelin implantından önce progesteron uygulamasının implant uygulaması sonrası görülen proöstrus ve östrus belirtilerini beş köpekten sadece bir köpekte engelleyebildiği gözlenmiştir (30).

Uzun etkili GnRH agonist tedavilerinden sonra östrus belirtileri göstermeye devam eden bazı köpeklerin uygulamaya yanıt vermedikleri, çalışma gruplarında varyasyonlar oluşturdukları, bu farklılığın GnRH'nin down-regülasyonuna neden olduğu ve bu durumun her bireyin farklı genetik duyarlılığından kaynaklanmış olabileceği vurgulanmaktadır. Bu köpeklerde daha yüksek doz tedavilerin ise kontraseptif etki sağlayamadığı da bildirilmektedir (18).

Reproduktif siklusu baskılamak için anöstrus ve diöstrusta olan köpeklere Romagnoli ve ark. (28), tarafından 4.7 mg ve 9.4 mg deslorelin implant uygulanmıştır. Anöstrustaki on köpekten dördü östrus gösterirken, diöstrus dönemindeki köpeklerin hiçbirinin östrus bulguları göstermediği belirtilmektedir. Bu çalışmada herhangi bir yan etki gözlenmeksizin, östrusun uyarılma oranı 6/10 olarak saptanmıştır. Diöstrus döneminde 4.7 mg deslorelin uygulamalarının 4.5 ay, 9.7 mg deslorelin uygulamalarının ise 12 aydan daha kısa bir süre östrusu baskılamada başarılı sonuçlar verdiği sonucuna varılmıştır.

Wright ve ark. (38), deslorelin implantın ardından görülen proöstrus-östrus belirtilerinin önüne geçilebilmek için megestrol asetat kullandıklarını, megestrol asetat verilmeyen sadece deslorelin implant uygulanan gruptaki dokuz köpekten dördünün östrus gösterdiğini bildirmektedirler. Bu köpeklerin östrus döneminde çiftleştirildiği, yalnız iki tanesinin gebe kaldığı, fakat gebeliklerin 40. gün civarında abortla sonuçlandığı ifade edilmektedir. Abortların sebebi ise, deslorelinin GnRH reseptörlerinde down-regülasyona neden olarak plazma LH seviyesini düşürmesine ve bunun sonucunda korpus luteumun gerilemesine bağlanmaktadır (38).

GnRH agonisti deslorelinin ciddi yan etkilerinin olmadığı çok sayıda araştırmacı (18,25,33,34,38) tarafından belirtilmektedir. Bunun yanı sıra, deslorelin uygulanmış yaşlı dişi köpeklerde bireysel olarak, uzamış vaginal akıntı, kalıcı östrus, idrar kaçırma gibi yan etkilerin az da olsa gözlemlendiği bildirilmektedir (9,26). Benzer şekilde östrusu baskılamak amacıyla deslorelin implant uygulanan yedi yaş üzerindeki dişi köpeklerde folliküler kist,

uzamış östrus, pyometra gibi yan etkiler olduğu da belirtilmektedir (2).

Gebeliğin sonlandırılması

Köpeklerde LH'nin luteotrop hormon olarak gebelik süresince progesteronun luteal sekresyonunda gerekli bir hormon olduğu (6), GnRH agonistlerinin LH hormonunu baskılama etkisi ile gebeliğin sonlandırılması amacıyla kullanılabilirliği bildirilmektedir (17,39). Güngör ve ark.(17), GnRH agonisti olan deslorelini, köpeklere deri altı yolla çiftleşme sonrası 20-25. günlerde uyguladıklarını, uygulamayı takiben progesteron değerininin sekizinci günde gebeliğin devamı için gerekli olan miktarın altına düştüğünü ve 10. günde tek doz PGF_{2α} uygulaması ile birlikte kombine edildiğinde gebeliği sonlandırabildiği sonucuna varmışlardır. GnRH agonistlerinin gebeliğin sonlandırılmasında, diğer abort uyarılma uygulamalarından daha zahmetsiz, ucuz ve az yan etki oluşturması avantajları ile köpeklerde rutin gebeliğin sonlandırma yöntemleri arasına girebileceği bildirilmektedir (17).

Sonuç

Son yıllarda küçük hayvan reproduksiyonu alanındaki çalışmalar, GnRH agonistlerinin kullanımı üzerine yoğunlaşmıştır. Anöstrus dönemindeki dişi köpeklerde düşük dozda yavaş salınım gösteren, yan etkileri çok daha az olan GnRH agonist implantları, fertil kızgınlıkların uyarımında dopamine agonistlerine alternatif olarak kullanım alanı bulmaktadır. GnRH agonistlerinin uygulanma sürelerine bağlı olarak, köpeklerde östrusu uyarma yanında, östrusu baskılama özellikleri de avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Prepubertal köpeklerde östrusun dönüşümlü olarak baskılanması, uzun süreli kontrasepsiyon ve uzamış anöstrus olguları üzerine daha fazla araştırmaya yönelmesi gerekmektedir. Köpek reproduksiyonu alanında anöstrustaki veya diöstrustaki dişi köpeklerde östrusun uyarılması üzerine gebelik sonuçları elde edilen çalışmalarda başarılı sonuçlar alınmış, fakat östrus siklusunun değişik evrelerini göz önüne alınarak agonist kullanımına yönelik klinik ve endokrinolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynaklar

1. Adams TE. Using gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH analogs to modulate testis function and enhance the productivity of domestic animals. Anim Reprod Sci 2005; 88 (1-2): 127-39.
2. Arlt SP, Spankowsk S, Heuwieser W. Follicular cysts and prolonged oestrus in a

- female dog after administration of a deslorelin implant. *N Z Vet J* 2011; 59 (29): 87-91.
3. Aspden WJ, Jakson A, Trigg TE, D'Occhio MJ. Pituitary expression of LH- and FSH-subunit mRNA, cellular distribution of LH-subunit mRNA and LH and FSH synthesis during and after treatment with a gonadotropin releasing hormone agonist in heifers. *Repro Fertil and Dev* 2003; 15 (3): 149-56.
 4. Beijerink NJ, Dieleman SJ, Kooistra HS, Okkens AC. Low doses of bromocriptine shorten the interestrus interval in the bitch without lowering plasma prolactin concentration. *Theriogenology* 2003; 60 (7): 1379-86.
 5. Cirit Ü, Bacinoglu S, Cangül I T, Horoz Kaya H, Tas M, Ak. The effects of a low dose of cabergoline on induction of estrus and pregnancy rates in anestrus bitches. *Anim Reprod Sci* 2007; 101 (1-2): 134-44.
 6. Corrada, Y, Hermo G, Johnson CA, Trigg TE, Gobello C. Short-term progestin treatments prevent estrus induction by a GnRH agonist implant in anestrus bitches. *Theriogenology* 2006; 65 (2): 366-73.
 7. Dominique M. Behavioural changes after treatment with GnRH implants in male dogs; the behavioural effects of a reversible chemical castration. In comparison: a literature review of the behavioural effects of surgical castration in male dogs. Thesis. Department of Clinical Sciences of Companion Animals Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University-Holland, 2009.
 8. Fontaine E, Mir F, Vannier F, Gérardin A, Albouy M, Navarro C, Fontbonne A. Induction of fertile oestrus in the bitch using Deslorelin, a GnRH agonist. *Theriogenology* 2011; 76 (8): 1561-6.
 9. Fontaine E, Fontbonne A. Use of Deslorelin to control fertility in the bitch. In Symposium Deslorelin: Deslorelin in practice, 7th EVSSAR Congress. Louvain la Neuve. May, 15-17, 2010; Belgium.
 10. Gobello C, Castex G, Corrada Y. Use of cabergoline to treat primary and secondary anestrus in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2002; 220 (11): 1653-4.
 11. Gobello C. Dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH agonists and anti-estrogens in canine reproduction: A review. *Theriogenology* 2006; 66(6-7): 1560-7.
 12. Gobello C. New GnRH analogs in canine reproduction. *Anim Reprod Sci* 2007; 100 (1-2):1-13.
 13. Gorbman A, Sower SA. Evolution of the role of GnRH in animal (metazoan) biology. *Gen Comp Endocrinol* 2003; 134 (3): 207-13.
 14. Günay A, Günay Ü, Soylu MK. Cabergoline applications in early and late anoestrous periods on German shepherd dogs. *Revue Méd Vét* 2004; 155 (11): 557-60.
 15. Günay A, Soylu M K. A study of induction of oestrus and ovulation in bitches in anoestrus period. 34 Jahrestagung Physiology und Pathology der Fortpflanzung 24 Veterinar Humanmedizinische Gemenischtaftstagung. Februar, 127, 2001; Giessen-Germany.
 16. Günay, A, Soylu, MK. Anöstrus dönemindeki köpeklerde östrus ve ovulasyonun uyarılması üzerine çalışmalar. *U Ü Vet Fak Derg* 1996; 15 (1-2-3): 165-75.
 17. Güngör Ö, Kaya M, Gürbulak K, Oral H, Kaya S, Kaçar C. Use of GnRH agonist (desloreline) in combination with PGF2 α on the termination of pregnancy in bitches. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 2010; 16 (6): 903-08.
 18. Herbert CA, Trigg, TE: Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. *Anim Reprod Sci* 2005; 88 (1-2): 141-53.
 19. Junaidi A, Williamson PE, Martin GB, Stanton PG, Blackberry MA, Cummins JM, Trigg TE. Pituitary and testicular endocrine responses to exogenous gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and luteinising hormone in male dogs treated with GnRH agonist implants. *Reprod Fertil Dev* 2007; 19 (8): 891-98.
 20. Kaya D, Aslan S, Kaya S, Kuru M, Kaçar C, Schäfer-Somi S. Clinical and endocrine short-term effects of GnRH analogue deslorelin in prepubertal bitches: Does a "flare-up" occur? *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2013; 19 (2): 299-304.
 21. Kooistra HS, Okkens AC, Bevers MM, Popp-Snijders C, van Haften B, Dieleman SJ, Schoemaker J. Bromocriptine-induced premature oestrus is associated with changes in the pulsatile secretion pattern of follicle-stimulating hormone in beagle bitches. *J Reprod Fertil* 1999; 117 (2): 387-93.

22. Maenhoudt C, Santos NR, Fontaine E, Mir F, Reynaud K, Navarro C, Fontbonne A. Results of GnRH agonist implants in oestrous induction and oestrous suppression in bitches and queens. *Reprod Dom Anim* 2012, 47 (6): 393-7.
23. Metallinou C, Asimakopoulos B, Schröer A, Nikolettos N. Gonadotropin-releasing hormone in the ovary. *Reprod Sci* 2007; 14 (8): 737-49.
24. Millar RP. GnRHs and GnRH receptors. *Anim Reprod Sci* 2005; 88 (1-2): 5-28.
25. Padula AM. GnRH analogues-agonists and antagonists. *Animal Reprod Sci* 2005; 88 (1-2): 115-26.
26. Palm J, Reichler IM. Effectiveness of deslorelin acetate for the suppression of heat in the bitch. *EVSSAR Congress*. May, 87-88, 2010; Louvain la Neuve-Belgium.
27. Ponglowhapan S. Clinical applications of GnRH agonist Deslorelin in dogs and cats. *Thai J Vet Med Suppl* 2011; 41: 59-63.
28. Romagnoli S, Stelletta C, Milani C, Gelli D, Falomo ME, Mollo A. Clinical use of deslorelin for the control of reproduction in the bitch. *Reprod Dom Anim* 2009; 44 (2) : 36-9.
29. Schally AV. Luteinizing hormone-releasing hormone analogs: Their impact on the control of tumorigenesis. *Peptides* 1999; 20 (10): 1247-62.
30. Sung M, Armour AF, Wright PJ. The influence of exogenous progestin on the occurrence of proestrous or estrous signs, plasma concentrations of luteinizing hormone and estradiol in deslorelin (GnRH agonist) treated anestrous bitches. *Theriogenology* 2006; 66 (6-7): 1513-7.
31. Temple JL, Millar RP, Rismann EF. An evolutionarily conserved form of gonadotropin-releasing hormone coordinates energy and reproductive behaviour. *Endocrinology* 2003; 144 (1): 13-9.
32. Toydemir TSF, Sontaş BH, Kılıçarslan MR. New indications of a GnRH agonist deslorelin in small animal reproduction. *EVSSAR 15th Congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction. Proceedings of the 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. July, 26-29, 2012; Whistler- Canada.*
33. Trigg T E, Doyle AG, Walsh JD, Swangchan-uthai T. A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology* 2006; 66 (6-7): 1507-12.
34. Trigg TE, Wright PJ, Armour AF, Williamson PE, Junaidi A, Martin GB, Doyle AG, Walsh J. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *J Reprod Fertil Suppl* 2001; 57: 255-61.
35. Volkmann D, Kutzler M, Wheeler R, Krekeler N. The use of deslorelin implants for the synchronization of estrous in diestrous bitches. *Theriogenology* 2006; 66 (6-7): 1497-501.
36. von Heimendahl, A, Miller C. Clinical evaluation of Deslorelin to induce oestrus, ovulation and pregnancy in the bitch. *EVSSAR 15th Congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction. Proceedings of the 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. July, 26-29, 2012; Whistler-Canada.*
37. Walter B, Otdorff C, Brugger N, Braun J. Estrus induction in Beagle bitches with the GnRH-agonist implant containing 4.7 mg Deslorelin. *Theriogenology* 2011; 75 (6): 1125-9.
38. Wright PJ, Verstegen JP, Onclin K, Jöchle W, Armour AF, Martin GB, Trigg TE. Suppression of the oestrus responses of bitches to the GnRH analogue deslorelin by progestin. *J Reprod Fertil Suppl* 2001; 57: 263-8.
39. Yüksel HT, Güngör Ö. Köpeklerde istenmeyen gebeliklerin sonlandırılmasına güncel medikal yaklaşımlar. *Dicle Üniv Vet Fak Derg* 2012; 1 (1): 1-6.
40. Zöldág L, Fekete S, Csáky I, Bersényi A. Fertile estrus induced in bitches by bromocryptine, a dopamine agonist: A clinical trial. *Theriogenology* 2001; 55 (8): 1657-66.

Yazışma adresi:

Doç. Dr. Aytakin GÜNAY
 Uludağ Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek
 Yüksekokulu Görükle Kampüsü 16059/BURSA.
 E-posta: agunay@uludag.edu.tr
 Tel: 0 224 2942362; 0 535 7369283
 Fax: 0 224 2942303



Ruminantların Gastro-intestinal Nematodlarında Anthelmentik Dirençliliği

Mustafa KÖSE

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar-TÜRKİYE

Özet: Ruminantların gastrointestinal nematod enfeksiyonlarının kontrolünde anthelmentiklerin yoğun kullanılması sonucunda bu ilaçlara karşı direnç gelişmiş ve bu durum dünya genelinde birçok ülkede büyük bir sorun haline gelmiştir. Sürekli kullanılan, benzimidazol, imidazothiazol ve makrosiklik laktonlara karşı *Haemonchus*, *Teladorsagia* ve *Trichostrongylus* gibi önemli nematod cinslerinde direnç olguları bildirilmektedir. Buna ilaveten gastrointestinal nematod popülasyonlarında çoklu ilaç direnci de tespit edilmiştir. Gastrointestinal nematodların bu anthelmentiklere karşı direnç kazanması ruminantlarda büyük ekonomik kayıplara, sağlık ve hayvan refahı problemlerine yol açmaktadır. Bu derlemede direnç gelişiminin mekanizmaları, direnç tespit yöntemleri, direnç kontrol stratejileri ve anthelmentik dirençliliğinin Türkiye'deki durumu ele alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: Anthelmentik dirençliliği, gastro-intestinal nematodlar, ruminantlar

Anthelmintic Resistance in Gastro-Intestinal Nematodes of Ruminants

Summary: The intensive use of anthelmintics for the control of gastro-intestinal nematode infections of ruminants has resulted in the development of resistance that has become a major practical problem in many countries worldwide. Anthelmintic resistance to benzimidazoles, imidazothiazoles and macrocyclic lactones has continuously been reported, particularly for the important genera, *Haemonchus*, *Teladorsagia* and *Trichostrongylus*. Furthermore, multiple drug-resistant populations of these gastro-intestinal nematodes have also been detected. Anthelmintic resistance developed in these nematode parasites of ruminants causes a large amount of economic losses, health and welfare problems worldwide. In this review, it is aimed to explain the mechanism, various detection methods, control strategies and the status of anthelmintic resistance in Turkey.

Key Words: Anthelmintic resistance, gastro-intestinal nematodes, ruminants

Giriş

Anthelmentik dirençliliği, önceden duyarlı olduğu bir anthelmentik ilaca karşı parazit popülasyonlarında meydana gelen duyarlılık kaybıdır (7, 44, 53). Oluşan bu direnç yeni nesillere aktarılabilir (31, 53). Gastrointestinal nematodlar bütün dünyada hayvan sağlığını ve refahını olumsuz etkileyerek büyük ekonomik kayıplara neden olan ve yaygın görülen parazitlerdir. Geçen yüzyılın ortalarından bu yana anthelmentik ilaçlar kontrol programlarının temel ve vazgeçilmez unsurları olmuştur. Mera hayvancılığında kemoterapiye yüksek oranda bel bağlanması zaman içinde gastrointestinal nematodlarda anthelmentik ilaçlara karşı direnç gelişimine neden olmuştur (39). Günümüzde ruminant ve tek tırnaklıların gastrointestinal nematodlarına karşı yaygın anthelmentik dirençliliği olguları rapor edilmektedir (7, 26, 45, 50). Dünya genelinde koyun yetiştiriciliğinde çoğunlukla

Haemonchus, *Teladorsagia*, *Ostertagia* ve *Trichostrongylus* ve daha az oranda da *Cooperia* ve *Nematodirus* cinslerine ait türler anthelmentik dirençliliği tespit edilen baskın türler olmuştur (39).

Bir parazit popülasyonunda tek bir anthelmentik türüne karşı direnç gelişmekle beraber, makrosiklik laktonlarda olduğu gibi o gruptaki bir anthelmentik türüne karşı gelişen duyarlılık kaybı grubun diğer üyelerine karşı da oluşabilmektedir (53). Yapılan araştırmalar gastrointestinal nematodlarda birçok anthelmentik grubuna karşı gelişen dirençteki hızlı artışın mera hayvancılığı yapan bütün ülkeleri tehdit eder duruma geldiğini göstermektedir (27, 29, 39). Gastrointestinal nematod enfeksiyonlarının kontrolünde kullanılan anthelmentik ilaçların sık ve sürekli kullanımları ile direnç teşhisinde yaşayan güçlükler yetiştiricilikte önemli bir maliyet oluşturmaktadır. Bu ilaçlara karşı gelişen direnç bir yandan yetiştiricilik maliyetlerini yükseltirken, diğer taraftan hayvan sağlığı ve refahını olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle, son yıllarda araştırmacıların bu konuya ilgisinin giderek arttığı görülmektedir (12, 27).

Günümüzde yaygın olarak kullanılan anthelmentiklerin gelecek yıllarda da kontrol programlarının temel seçeneği olacağı düşüncesi, bu kimyasallara karşı nematodların geliştirdiği dirençliliği geciktirmeye yönelik araştırmaları arttırmıştır (1, 26, 29). Bu konudaki araştırmaların temel amacı, özellikle gastrointestinal nematodlarda anthelmentiklere karşı gelişen dirençliliğin teşhis ve izlenebilmesi için güvenilir ve standardize edilmiş yöntemler geliştirmektir.

Anthelmentik Dirençliliğinin Tarihi

Anthelmentik dirençliliği ilk olarak 1950'lerin sonuna doğru koyunlarda *Haemonchus contortus*'un ve tek tırnaklılarda cyathostominlerin meydana getirdikleri enfeksiyonların tedavisinde kullanılan phenothiazine karşı bildirilmiştir (12, 29). Helmintlere karşı geliştirilen ilk geniş spektrumlu antibiyotik grubu olan benzimidazolün 1961 yılında kullanımının üzerinden daha birkaç yıl geçmeden koyunlarda *H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta* ve *Trichostrongylus colubriformis*'e ve tektırnaklı cyathostominlerine karşı direnç geliştiği bildirilmiştir (29). Yapılan çalışmalar, 1970'lerin ortalarında koyun ve tek tırnaklılardaki çok sayıda nematod türüne karşı benzimidazol ve imidazothiazole-tetrahydropyrimidine grubuna, 1980'lerde ise avermectin-milbemycin grubu anthelmentiklere karşı direnç gelişimini ortaya koymuştur (12, 29). Gastrointestinal nematodların çok sayıda anthelmentik grubuna karşı geliştirdiği ilaç dirençliliği tüm dünyada öyle bir noktaya gelmiştir ki, 1990'lı yıllarda anthelmentik dirençliliği mera hayvanı yetiştiriciliğinin en büyük problemi haline gelmiştir (12, 13, 63).

Anthelmentik Dirençliliğinin Gelişimi

Gastrointestinal nematodlarda gelişen anthelmentik dirençliliği, tedavi sıklığı gibi bazı önemli faktörlerin varlığına bağlıdır. Aynı grup anthelmentik ile sık tedavi edilen hayvanların parazitlerinde hızlı bir direnç oluşumu geliştiği bildirilmektedir (16).

Anthelmentik dirençliliği gelişiminde rol oynayan bir diğer önemli faktör, yetersiz dozlarda kullanılan anthelmentiklerdir. Zira bu durum bazı heterozigot dirençli parazitlerin canlılığını sürdürmesine ve dirençli suşların seleksiyonuna da katkı sağlamaktadır (17). Anthelmentik ilaçların farklı hayvan türlerinde biyoyararlanım oranlarının, yani aynı tür parazitlere karşı etkin dozlarının farklı olması farklı hayvan türlerinin bir arada yetiştirildiği çiftliklerde direnç gelişiminin önemli bir nedeni olabilmektedir. Örneğin keçilerde anthelmentiklerin etkili dozları koyunlarda uygulanan dozların 1.5-2 katını bulabil-

mektedir (22). Bir arada yetiştirilen keçi ve koyunlara aynı dozda anthelmentik uygulanması, keçilerin yetersiz doz ilaç almasına ve bir kısım gastrointestinal nematodların daha dirençli olarak kurtulabilecekleri anlamına gelmektedir. Bu durum keçilerde gelişen anthelmentik dirençliliği önemli nedenlerinden birisi olarak ifade edilmektedir (22).

Uzun süre aynı grupta yer alan anthelmentiklerin kullanımı da dirençlilik gelişiminde rol oynamaktadır. Bu ilaçların etkili konsantrasyonları zaman içinde azalmaktadır. Çoğu zaman profilaktik amaçla yapılan sürü ilaçlamaları yaygın direnç oluşumuna neden olmuştur. Kontrolsüz hayvan hareketleri de anthelmentiklere direnç sağlamış parazitlerin yayılmasında önemli bir faktör olarak belirtilmektedir (25, 27, 44).

Bir parazit popülasyonunda anthelmentiklere karşı dirençliliğin gelişmesinde etkili başlıca dört faktör bildirilmektedir. Birinci faktör, anthelmentik etkisine maruz kalmamış popülasyondaki (refugia) parazit sayısıdır. Direnç gelişimindeki esas sorun sağaltım sonrası canlı kalan ve geliştirdiği direnci sonraki nesillere aktaran parazitlerin oranıdır. Bu orandaki fazlalık dirençlilik gelişimini artırırken, bunun aksine sağaltıma maruz kalmamış parazitlerin varlığı dirençlilik gelişimini yavaşlatmaktadır (7, 26, 27, 40, 61).

İkinci faktör, seleksiyona uğramamış nematodlarda gen frekansıdır. Tedavi edilmemiş bir popülasyonda direnç genlerinin frekansı, anthelmentik dirençliliğinin ne kadar hızlı gelişeceğini belirleyen en önemli faktördür. Tabiatla bir parazit popülasyonundaki parazitlerde rastgele mutasyonlar oluşabilir ve bunun sıklıkla ortaya çıkması da anthelmentik dirençliliği gelişimini hızlandırabilmektedir (7). Metabolizmaya etki eden çeşitli enzim mekanizmaları, antelmentiğin taşınması ya da anthelmentiklerin bağlandığı reseptör bölgelerindeki mutasyonlar bu genetik çeşitlilik içinde var olabilmektedir. Bir anthelmentik ilaca düzenli olarak maruz kalmış bir nematod popülasyonunda parazitler, değişikliğe uğramış genomu ile evrimsel bir avantaj sağlamaktadır. Seleksiyona uğramamış bir popülasyon içinde özel bir ilaca karşı direnç kazanmış parazitlerde mutasyon ya da mutasyonların ne kadar yaygın olduğu bilinmemektedir. Bir parazit popülasyonunda antelmentiğe hiç maruz kalmamış parazitlerde allelerin kodladığı direnç, mutasyonun sonucu olarak ortaya çıkabilmektedir (39).

Üçüncü faktör, anthelmentik dirençliliğinin genetiğiyle ilgilidir. Nematodlardaki direnç genleri dominant değil de resesif ise direnç daha hızlı gelişmektedir (7). *H. contortus*'larda benzimidazol grubunun, cambendazol veya levamisol direncinin

(23, 52), *T. colubriformis*'lerde levamizol direncinin resesif özellik gösterdiği bildirilmiştir (37).

Dördüncü faktör ise, seleksiyona uğramamış parazitlerin biyolojik uygunluğudur. Direnç gelişim oranı ayrıca dirençli parazitlerin duyarlı parazitlere (yumurtlama, konakta inhibe olma, merada canlı kalabilme, otlara göç edebilme ve konak tarafından alındığında enfeksiyon oluşturabilme kapasiteleri gibi) biyolojik yönden uygun olup olmamalarına bağlıdır (40).

Anthelmentik Dirençliliğinin Mekanizması

Direncin yönetim ve kontrolünde anthelmentik farmakolojisinin bilinmesi iki önemli katkı sağlamaktadır. Bunlardan birincisi, biyolojik deneyler ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yardımıyla bir parazit popülasyonu içinde gelişen direncin ölçümü, karşılaştırılması ve izlenebilmesinde amacıyla in vitro test yöntemlerinin tasarlanmasıdır. İkincisi ise çeşitli parazitler formlara ya da genotiplere karşı matematiksel modeller dizayn ederek kontrol stratejileri geliştirilmesidir.

Benzimidazol dirençliliği

Benzimidazol dirençliliğinin mekanizmasının açıklanmasında bir dizi farmakolojik ve moleküler teknikten yararlanılmıştır. Yapılan araştırmalar, benzimidazolün mikrotubulleri bozduğunu ve β -tubulin üzerinde bulunduğu sanılan bağlayıcı bir kısım bulunduğunu ortaya koymuştur. İlaç hedefi olarak β -tubulin keşfedildikten sonra moleküler çalışmalar *H. concortus*'un tubulin izotipleri üzerine yoğunlaşmıştır. *Haemonchus concortus* ve diğer trichostromyloid nematodlarla yapılan deneysel çalışmalar açıkça göstermiştir ki, bu parazitlerde benzimidazol dirençliliği β -tubulin izotip 1 geninde nokta mutasyona neden olmakta ve sonraki seleksiyonların sonucunda popülasyonun izotip 2 alleli tamamıyla kaybolmaktadır. Bu genlerdeki nokta mutasyonlar sekans (dizi) analizi ile teşhis edilebilmektedir (7, 26, 40, 53, 62).

İmidothiazol / Tetrahidroprimidin (nikotinik agonistler) dirençliliği

İmidothiazol (levamizol) ve tetrahidropriminin (pyrantel, morantel ve oxantel) antelmentikler nikotinik asetil kolin reseptörlerini (nAChR) hedef alarak nöro muskuler reseptör agonisti olarak etki göstermekte ve nematodlarda spazmlı felce neden olmaktadır. Bu antelmentiklere karşı nematodların geliştirdiği dirençliliğin aynı mekanizmalarla gerçekleştiği düşünülmektedir (45, 52). Levamizol gibi

yaygın kullanılan ve nematodların kas membranlarında kolinerjik agonisti olarak etki gösteren imidothiazol anthelmentiklere karşı gelişen dirençliliğin biyokimyasal mekanizmaları hala tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Ancak, deneysel çalışmalar bu dirençliliğin molekülün bağlandığı hedef kısımlardaki değişikliğe bağlı olduğunu ortaya koymuştur (37, 47, 53). Radyoligand bağlayıcı testler ile yapılan çalışmalarda, toz halinde amino-levamizolün *H. concortus*'un nikotinik asetil kolin reseptörlerine iki bölgede bağlandığı görülmüştür. Dirençli nematodlarda levamizolün bağlandığı bölgelere affinitesi duyarlı nematodlarda görüldenden çok daha zayıf olmaktadır (52, 53). Güçlü levamizol dirençliliği gösteren *Caenorhabditis elegans* türünde nAChR alt ünitesini kodlayan birkaç gen identifiye edilmiş, daha sonra band-kelepçe tekniği yardımıyla bireysel nAChR'lerin özelliklerine bakarak dirençlilik mekanizmasıyla ilgili bazı bulgular elde edilmiştir (18). Bu çalışmalar sonucu, dirençli ve duyarlı *Oesophagostomum dentatum* izolatlarının levamizol ile aktive edilmiş reseptör kanal akımlarında da birtakım değişiklikler saptanmıştır. Dirençli ve duyarlı izolatlarda reseptör sayıları benzer olsa da, tahmini kemoterapötik ilaç konsantrasyonu analiz edildiğinde dirençli izolatlarda duyarlı olanlara göre daha düşük aktif kanal bulunduğu görülmüştür. Ayrıca dirençli izolatlarda levamizol reseptörlerinin desensitizasyonunda azalma olduğu ileri sürülmüştür. Diğer nikotinik agonistlere karşı gelişen dirençliliğin biyokimyasal temelini de levamizol direncine benzer şekilde olduğu şeklinde kanıtlar mevcuttur (48).

Makrosiklik lakton dirençliliği

Dünya genelinde yapılan çeşitli in vitro ve saha çalışmalarda makrosiklik laktonlar ve milbemycinlere karşı gastrointestinal nematodların dirençlilik geliştirdiği bildirilmiştir (13, 53). Bazı çalışmalarda ise, etki mekanizması ve kimyasal yapılarıyla benzerlik gösteren bu anthelmentiklerin direnç gelişim mekanizmaları arasında farklılıklar olduğu öne sürülmektedir (13, 36, 53). Moxidectin (milbemycin) ile ivermectin kombinasyonuna dirençli *H. concortus*'ların tek başına kullanılan moxidectine duyarlı oldukları görülmüştür (6).

Haemonchus concortus izolatlarında tekil bir majör gen tarafından kontrol edildiği bildirilen ivermectin direncinin (36), *T. colubriformis* izolatlarında daha fazla gen tarafından kontrol edildiği (21) moleküler çalışmalarla ortaya konmuştur. İvermectin uygulaması sonrasında duyarlı ve dirençli *H. concortus* türlerinin farinks kaslarındaki etkilenmiş hedef bölgelerde meydana gelen yutkunma refleksi inhibis-

yonunda da farklılıklar gözlenmiştir (30, 53). Makrosiklik laktonların *H. contortus*'un GluCl kanal alt ünitesini kodlayan genlerde bozukluklara neden olduğu öne sürülmüştür. İvermectin direnci yönünde seleksiyona uğrayan nematodlarda GluCl kanal α alt ünite geninin tekil bir allelinin klonlanmasında azalma olduğu bildirilmiştir. Yeni yapılan araştırmalar makrosiklik laktonlara karşı gelişen direncin bu şekilde olabileceğini göstermektedir (4).

Anthelmantik Dirençliliğinin Tespiti

Gastrointestinal nematodlarda anthelmantik dirençliliğinin öneminin anlaşılması, araştırmacıları dirençliliğin teşhis ve takibinde güvenilir ve standardize edilebilir yöntemler geliştirmeye sevk etmiştir (5, 26, 61). Günümüzde gastrointestinal nematodlarda anthelmantiklere karşı gelişen dirençliliğin tespit ve izlenmesinde in vivo ve in vitro testler ile moleküler tabanlı teknikler kullanılmaktadır.

Anthelmantik Dirençliliğinin Tespitinde Kullanılan In Vivo Testler

In vivo testlerle anthelmantik etkinliğinin tespitinde, araştırmada kullanılan hayvanların kesilmesi ve olgun parazitlerin sayılmasına bağlı olarak maliyetlerin artması ve zaman alıcı olması, hayvanlardaki ilaç farmakodinamiklerine bağlı testlerden elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliğinin düşük olması gibi bir takım dezavantajlar vardır (61).

Dışkıda yumurta sayısı azaltma testi (FECRT)

Anthelmantik dirençliliğinin tespiti amacıyla dünyada en yaygın olarak kullanılan testtir. Dünya Veteriner Parazitoloji Geliştirme Derneği (WAAVP) tarafından da kullanımı tavsiye edilen FECR testi, antelmantiğin kullanılacağı gün ile tedaviden 10-14 gün sonra elde edilen gram dışkıdaki yumurta sayılarının (EPG) karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Yumurta sayısında azalmanın %95'ten düşük olması test edilen nematod popülasyonunda o antelmantiğe karşı dirençlilik geliştiği şeklinde yorumlanmaktadır (5, 6).

Kontrollü etki testi (CET)

Anthelmantik verilmiş hayvanlarda gastrointestinal nematodların kesim sonrası kantitatif miktarlarının tespiti esasına dayanan ve saha çalışmalarına uygun olmayan bu güvenilir yöntem, laboratuvar hayvanlarıyla yapılan deneysel çalışmalarda daha çok kullanılmaktadır. Testin uygulanmasında öncelikle laboratuvar hayvanları kullanılacak antelmantiğe duyarlı ve dirençli gastrointestinal nematod izolatlarıyla ayrı ayrı enfekte edilmekte, daha

sonra bu hayvanlar rastgele seçilerek sağaltım yapılan ve yapılmayan gruplara ayrılmaktadır. Tedaviden 10-15 gün sonra nematodlar toplanmakta, identifiye edilmekte ve sayılmaktadır (28, 64).

Sonuçların analizi aşağıdaki formüllere göre yapılmaktadır (5).

Gruptaki hayvan sayısı $=n_i$

$$N = \sum n_i$$

Aritmetik ortalama: $\bar{X}_i = \sum X_{ij} / n_i$

Varyans: $S_i^2 = (\sum_j X_{ij}^2 - (\sum_j X_{ij})^2 / n_i) / (n_i - 1)$

Redüksiyon Yüzdesi: $R = 100(1 - \bar{X}_i / \bar{X}_c)$

\bar{X}_i : Tedavi sonrası yumurta sayısının aritmetik ortalaması

\bar{X}_c : Kontrol grubu yumurta sayısının aritmetik ortalaması

Yaklaşık %95 güven limitleri:

Redüksiyon varyansı (log scale): $Y^2 = S_i^2 / n_i \bar{X}_i^2 + S_c^2 / n_c \bar{X}_c^2$

Üst güven limiti: $100 \left[1 - \bar{X}_i / \bar{X}_c \exp(-2.048 \sqrt{Y^2}) \right]$

Alt güven limiti: $100 \left[1 - \bar{X}_i / \bar{X}_c \exp(+2.048 \sqrt{Y^2}) \right]$

Kritik Anthelmentik Testi (CAT)

Bu teknik, anthelmentik sağaltımdan dört gün sonrasına kadar dışkıların toplanması, parazitlerin sayımı ve kesimden sonra hayvanda kalan parazitlerin yüzdesinin hesaplanması esasına dayanmaktadır. Bu testin avantajı, her hayvanın teker teker değerlendirilebilmesi ve kontrollü etki testinden daha az hayvan gerektirmesidir (27).

Anthelmentik Dirençliliğinin Tespitinde Kullanılan In Vitro Testler**Yumurtadan çıkış testi (EHA)**

Bu test, benzimidazol grubu anthelmentiklere karşı gelişen direnci tespit edebilen bir dizi yöntemin jenerik ismidir. Bu testler, benzimidazolün ovisional etkileri ve dirençli izolatların yumurtalarının duyarlı olanlara göre daha yüksek benzimidazol konsantrasyonlarında embriyone olabilmeleri ve larvaların yumurtadan çıkabilmesi esasına dayanmaktadır. Burada temel amaç, özellikle suda iyi çözünebilen thiabendazol gibi anthelmentiklerin seri konsantrasyonlarında henüz gelişme göstermemiş nematod yumurtalarını inkube etmektir. Antelmentiğin farklı konsantrasyonlarında gelişen veya ölen yumurtaların oranı tespit edilir, kontrol grubundaki doğal ölümler ölçü alınarak doz-yanıt sınırı belirlenir. Elde edilen verilerin istatistiksel yöntemler ile işlenmesi sonucunda yumurtaların % 50'sini öldürebilen ilaç konsantrasyonu (ED₅₀) hesaplanır (1, 8, 27).

Larval gelişim testi (LDA)

Bu yöntem, yumurtadan çıkış testlerine göre daha zaman alıcı ve zahmetli olmasına rağmen makrosiklik laktonların da içinde bulunduğu geniş spektrumlu anthelmentik gruplarının tamamına karşı gelişen dirençliliğinin tespitinde kullanılabilir. Testin benzimidazol, levamisol ve ivermektin dirençliliğinin tespitinde kullanışlı olduğu bildirilmiştir (24). Bu yöntemde nematod yumurtaları kültüre alınarak elde edilen birinci dönem larvalar çeşitli konsantrasyonlarda anthelmentiklerin ilave edildiği sıvılara ya da jelatinöz besi yerlerine aktarılmakta, ilacın üçüncü larva dönemine kadar etkisi hesaplanmaktadır (8, 27). Bu testin FECR ve EHA testlerine göre daha duyarlı olduğu, %10 oranındaki dirençliliği bile tespit edebildiği bildirilmiştir (14).

Erişkin gelişim testi (ADA)

Trichostrongylid nematodlarda benzimidazol dirençliliğini tespit etmek amacıyla geliştirilmiş bir yöntemdir. *Haemonchus contortus*'un yumurta

üretebilen erişkin nematod oluncaya kadar kültüre edilmesi esasına dayanmaktadır. Karmaşık kültür metotları gerektirmesi nedeniyle daha ziyade araştırma maksatlı kullanılmaktadır (27).

Larval paraliz testi (LPA)

Bu yöntemde, gastrointestinal nematodların enfektif üçüncü dönem larvaları anthelmentiklerin çeşitli sulandırılmaları ile 24 saat süreyle inkube edilmektedir. Bu sürenin sonunda, larvaların hangi konsantrasyonda paraliz olduklarına bakılarak belirlenen eşik doz, referans izolatlarla mukayese edilmektedir. Dirençli izolatlarda yüksek düzeyde asetilkolin esteraz (AChE) inhibitörü tespit edilmesinden hareketle modifiye edilen yöntemde göre; trichostrongylid larvaları bir asetilkolin esteraz inhibitörü olan eserin ile inkube edilmiş ve thiabendazol dirençliliğini tespit etmede yararlı olabileceği kanaatine varılmıştır (27, 57).

Larval motilite testi (LMT)

Bu testin benzimidazol ve makrosiklik lakton dirençliliğinin tespitinde kullanışlı olduğu bildirilmiştir. Bu testte 3. dönem larvaların ilacın seri konsantrasyonları ile 25 °C'de karanlık ortamda inkube edilerek ışıkla uyarıldıktan sonra elektronik dedektörle veya süzgeçten göç ya da gözlem gibi metotlar kullanılarak motiliteleri ölçülmektedir (19, 20).

Erişkin migrasyon inhibisyon testi (AMIA)

Bu test, domuzlarda *Oesophagostomum dentatum*'un benzimidazol ile pyrantele duyarlı ve dirençli izolatlarını ayırt etmekte kullanılmaktadır. Erişkin parazitler kesim sonrası toplanmakta, 30 dakika süreyle antelmentiğin çeşitli konsantrasyonları ile inkube edildikten sonra migrasyon odalarına alınmaktadır. Por genişliği 300-500 µm olan Poliamid meçlerde 30 dakika süreyle göç etmelerine izin verilmektedir. İlacın konsantrasyonları ile doza duyarlı bir eğri aracılığı ile migrasyon inhibisyonu tespit edilebilmektedir (42, 43).

Biyokimyasal (kolorimetrik) testler

Nematodlarda benzimidazol direnci tubulin'in antelmentiğe affinitesinin azalması ile ortaya çıkmaktadır. Bu yöntemde toz haline getirilmiş benzimidazolün üçüncü dönem larvaların tubulin ekstraktlarına bağlanmasına bakılarak dirençlilik teşhis edilmektedir. Bu testin oldukça hızlı ve güçlü olduğu, yüksek tekrar edilebilirliğe izin verdiği, duyarlı olduğu, parazit popülasyonunda en küçük direnç değişikliğini bile tespit edebildiği ve fazla sayıda larva

ya ihtiyaç duyduğu, fakat rutin tetkikler için uygun bulunmadığı bildirilmiştir (34, 51). Biyokimyasal testlerde; benzimidazole dirençli ve duyarlı trichostrongylid nematod izolatlarının spesifik olmayan esterazları ile asetil kolin esterazları mukayese edilmektedir. Kolorimetrik testlerde benzimidazole dirençli nematodların enfektif larvalarında benzimidazole duyarlı larvalara göre spesifik esteraz aktivitesinin önemli miktarda yüksek olduğu ve bu durumun direncin teşhisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (56).

Moleküler tabanlı testler

Anthelmentik dirençliliğinin tespiti için yapılan son çalışmalar moleküler tabanlı testlere odaklanmıştır. Nükleik asit tabanlı tekniklerle anthelmentiklere duyarlı nematod izolatlarında %1 oranındaki dirençli bireyleri ortaya koyabilmektedir (49). Moleküler bazlı teknikler ile daha çok benzimidazol direnci üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Çalışmalar, sıklıkla ruminantların trichostrongylid nematodlarının izotip-1 β tubulin geninin kodon 200'ünde fenilalaninin tirosine değiştiği mutasyon üzerinde durmuştur (33). Burada potansiyel problem tek bir nokta mutasyonunu baz alan testlerin direncin birden fazla mutasyondan ileri geldiği durumlarda yetersiz kalmasıdır (46). Bu durum, direncin tespiti için birden fazla prob kullanılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Birçok parazitik nematodta bulunan, dirençten sorumlu mutasyon allellerin frekansının incelenmesinde bunun kullanılabileceği bildirilmiştir (27). Benzimidazole dirençli nematodların tespitinde allel-spesifik real-time PCR yönteminin kullanılabileceği de ortaya konmuştur (2, 41, 49, 62). Allel-spesifik β tubulin kodon 200 PCR ile PCR-RFLP yöntemlerinin kombine edilmesi ile *H. contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* ve *Teladorsagia circumcincta* üçüncü dönem larvalarının identifiye edilebildiği bu yöntemin benzimidazol direncinin tespitinde kullanılabileceği bildirilmiştir (55). Levamisol ve makrosiklik laktonlara karşı gelişen direncin moleküler tabanının anlaşılmasındaki güçlükler real-time PCR ile direnç tespitinin optimize edilmesini geciktirmektedir. Bu konuda henüz yeterli bilgi birikimi sağlanamamıştır (7, 27).

Türkiye'de Anthelmentik Dirençliliği

Türkiye'de küçük ruminantların gastrointestinal nematodlarında anthelmentik dirençliliği üzerine ilk araştırma Tınar ve arkadaşları (58) tarafından Güney Marmara Bölgesi'nde yedi koyun ve beş keçi sürüsünde FECR testi ile yapılmıştır. Araştırmada albendazol ve thiabendazol kullanılan tüm çiftliklerde ortalama FECR değerleri %95-100 bulunmuş,

buna karşılık bir koyun ve dört keçi çiftliğinde tetramizolün etkisinin yetersiz olduğu ve ivermectinin sadece bir keçi çiftliğinde yumurta sayısını düşürmediği görülmüştür. Tetramizol tedavi gruplarının fekal kültürlerinde *Teladorsagia* spp. ve *H. contortus* üçüncü dönem larvaları izole edildiği, tetramizole karşı trichostrongillerde direnç tespit edildiği fakat diğer anthelmentik gruplarına karşı henüz direnç gelişmediği bildirilmiştir. Köse ve arkadaşları (32), Afyonkarahisar'da yedi koyun çiftliğinde albendazol, oksfendazol-oksiklozanid kombinasyonu ve ivermectin kullanarak yaptıkları araştırmada beş çiftlikte ivermectin gruplarında direnç belirlenmişler, FECR ortalama değerlerini sırasıyla % 68.57, %46.42, %84.41, %65.21 ve %91.66 olarak hesaplamışlardır. Araştırmacılar, diğer anthelmentiklere karşı direnç gelişmediğini ve dirençli gruplarda yapılan dışkı kültürlerinde *H. contortus* ve *Oesophagostomum* sp. üçüncü dönem larvaları izole ettiklerini bildirmişlerdir. Çıracık ve arkadaşları (11), Avustralya'dan ithal edilen ve Uludağ Üniversitesi'nde karantinaya alınan 49 Saanen ırkı keçiyi dört gruba ayırarak bu hayvanlara albendazol, ivermectin ve levamisol uygulamışlardır. Deney gruplarında FECR ortalama değerlerini tedaviden 15 gün sonra sırası ile %57, %28 ve %86 bulmuşlardır. Fekal kültürlerde *Haemonchus* ve *Teladorsagia* (albendazole), *Teladorsagia* (ivermectin) ve *Haemonchus* (levamisole) üçüncü dönem larvaları izole ettiklerini bildirmişlerdir. Yapılan in vitro yumurtadan çıkış testinde ise ED₅₀ değeri 0.73 μ g/ml olan thiabendazol benzimidazol direnci tespit edilmiş ve bu sonucun Türkiye'de ruminantların trichostrongylid popülasyonlarında belirlenen ilk çoklu (multipl) anthelmentik dirençliliği olduğu bildirilmiştirlerdir.

Çıracık ve ark. (10) tarafından Marmara Bölgesi'nde tektirnaklılarda yapılan iki çalışmadan birincisinde *Parascaris equorum*'da makrosiklik lakton direnci, ikincisinde ise (9), pyrantel ve makrosiklik lakton direnci tespit edilmiştir.

Türkiye'de gastrointestinal nematodlara karşı direnç gelişimine neden olabilecek yukarıda ifade edilen nedenler fazlasıyla mevcut olmasına rağmen, hayvanlarda bu parazitlere karşı ortaya çıkan dirençliliği ortaya koymak üzere konvansiyonel tekniklerle yapılmış pek az çalışma mevcut olup, moleküler tekniklerin kullanıldığı hiçbir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle Türkiye'de gastrointestinal nematodlarda anthelmentik dirençliliği konusunda daha geniş araştırmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Direncin Kontrolü

Hayvanların gastrointestinal nematod enfeksiyonlarının etkili ve sürdürülebilir şekilde kontrol edilebilmesinde anthelmentik dirençliliği halen yetiştiriciliğin en büyük problemlerinden biri olmaya devam etmektedir (3, 7, 40, 59). Anthelmentik dirençliliğinin kontrol altına alınmasında, anthelmentik etkilerine maruz kalmamış parazit popülasyonlarının korunmasının önemi uzun zaman önce yapılan çalışmalar neticesinde ortaya konmuştur (38, 59). Sağaltımdan canlı kurtulan nematodların direnç nesillerin oluşturulmasına yapacağı katkının bir şekilde sınırlandırılması gerekmektedir. Anthelmentik etkiye maruz kalmamış nematod popülasyonları (refugia) dirençli nematodların sayısının azaltılmasında kritik öneme sahiptir. Bu nematodların kaynağı meradaki larvalar, tedavi edilmemiş hayvanlar ve konak hayvandaki ilaca duyarlı olmayan inhibe gelişme formlarıdır. Rotasyonel otlatma gibi meradaki larva sayısını etkili bir şekilde azaltan bir mera yönetim sisteminin etkili bir anthelmentikle birlikte nematod kontrolünde kullanılması direncin seleksiyonuna neden olmaktadır. Kuraklık meradaki larvaların sayısının azalmasında etkili olan diğer bir faktördür. Güney yarım kürede anthelmentik dirençliliğinin seleksiyon hızının batı Avrupa'dan daha yüksek olmasının nedeninin kuraklık esnasında etkili bir anthelmentik sağaltımı neticesinde meralardaki larva sayılarının dramatik bir şekilde azalması olduğu düşünülmektedir (7, 27, 35, 40).

Anthelmentik etkiye maruz kalmamış nematodların oranını yükseltmek için hedef seçerek yapılan sağaltımda sadece ağır enfekte hayvanlar tedavi edilmektedir. Anthelmentik dirençliliğinin sağaltılmamış bir miktar hayvan kaldığında daha yavaş gelişiyor olması, kontrollü ve hayvanların sağlığını etkilemeyecek düzeyde sürüden bazı hayvanların sağaltımının yapılmadığı bir kontrol yöntemi geliştirilmiştir. FAMACHA adı verilen bu yöntemde *H. contotus* ile enfekte sürülerde belirli aralıklarla aneminin düzeyi izlenerek sadece şiddetli anemi gösteren hayvanların sağaltımı yapıldığı belirtilmektedir (60). Böylece, meralarda anthelmentik etkisine maruz kalmamış larvaların sayıca artırılması suretiyle dirençliliğin geciktirilmesi veya kontrolünün sağlanabileceği öne sürülmektedir (54, 60). İlk defa meraya çıkacak buzağuların etkili bir anthelmentik tedaviden sonra yaşlı hayvanlarla çıkarıldığı mera yönetim sisteminde direncin düşük düzeylerde kalacağı ifade edilmektedir. Hayvanların otladığı meraların değiştirilmesinin direncin seleksiyonunu yavaşlattığı, fakat yeni meralarda uygun tedavi zamanlamasının düzenlenmesinin zaman alacağı belirtilmektedir (12, 54, 60).

Anthelmentik ilaç kombinasyonlarının dirençlilik gelişiminde azalmaya yol açtığı iddia edilmişse de (3), ilaç kombinasyonların pahalı olmasının yanında bunlara karşı da dirençlilik gelişebildiği ifade edilmiştir. Nitekim birçok ülkede sığırlarda benzimidazol-levamisol kombinasyonlarına karşı nematodlarda direnç gelişimi bildirilmiştir (7).

Dirençli nematodlarla enfekte hayvanların karantinaya alınarak geniş spektrumlu ve farklı bir anthelmentikle sağaltım yapılmasından en az 48 saat sonra yeniden meraya salınmasının direnç gelişiminin yavaşlatacağı ifade edilmiştir. Ancak bu metodun başarılı olabilmesi için, hayvanların yeniden meraya bırakılmadan önce dirençli, canlı hiç bir nematodun bu hayvanlarda kalmadığından emin olunmalıdır (15). İngiltere'de makrosiklik lakton direncinin varlığı bildirilen sığırlarda gastrointestinal nematodların benzimidazol ve levamisol ile sağaltıldığı bildirilmekle birlikte karantina tedbirlerinin direnç gelişimine etkisi henüz tam olarak anlaşılamamıştır (7).

Gastrointestinal nematodlarda anthelmentik dirençliliğinin kontrolü için alternatif yöntemler de geliştirilmiştir. Bunlar; gastrointestinal nematod enfeksiyonlarına dirençli hayvan yetiştirmek, akılcı mera yönetim sistemleri, iyi besleme, antiparaziter aşılar geliştirme, bitkisel kökenli moleküller ve meraların tenenden zengin bitkilerle desteklenmesi, biyolojik kontrol gibi yöntemlerdir (7, 26, 27, 40).

Sonuç

Gastrointestinal nematodlara karşı gelişen anthelmentik dirençliliği, özellikle meralarda yapılan hayvan yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara neden olmakta, hayvan sağlığı ve refahını olumsuz etkilemektedir. Dünyanın her yerinde ve özellikle mera hayvancılığının yaygın yapıldığı güney yarıkürede gastrointestinal nematodlara karşı anthelmentik dirençliliği olgularının bildirilmesi, bu sorunun dünya çapında bir yetiştiricilik sorunu olduğunu göstermektedir. Son yıllarda hızlı bir gelişim gösteren moleküler biyolojik teknikler de anthelmentik dirençliliğinin hızlı tespiti ve izlenmesinde, direnç mekanizmalarının anlaşılmasında araştırmacılara umut vermektedir.

Kaynaklar

1. Álvarez-Sánchez MÁ, Mainar-Jaime R, Pérez García J, Rojo-Vázquez FÁ. A review of the methods for the detection of anthelmintic resistance. Rev Ibérica Parasitol 2002; 62 (1-2): 51-9.

2. Álvarez-Sánchez MA, Perez-Garcia J, Cruz-Rojo MA, Rojo-Vazquez FA. Real time PCR for the diagnosis of benzimidazole resistance in trichostrongylids of sheep. *Vet Parasitol* 2005; 129 (3): 291-8.
3. Barnes EH, Dobson RJ, Barger IA. Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. *Parasitol Today* 1995; 11 (2): 56-63.
4. Blackhall WJ, Pouliot JF, Prichard RK, Beech RN. *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains. *Exp Parasitol* 1998; 190(1): 42-8.
5. Coles GC, Bauer C, Borgsteede FHM, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, Waller PJ. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology(WAACP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 1992; 44 (1): 35-44.
6. Coles GC, Giordano-fenton DJ, Tritschler JP. Efficacy of moxidectin against nematodes in naturally infected sheep. *Vet Rec* 1994; 135 (2): 38-9.
7. Coles GC. Anthelmintic resistance and the control of worms. *J Med Microbiol* 1999; 48 (4): 323-8.
8. Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, Von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, Taylor MA, Vercruyse J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 2006; 136 (3): 167-185.
9. Çırak VY, Güleğen E, Bauer C. Benzimidazole resistance in cyathostomin populations on horse farms in western Anatolia, Turkey. *Parasitol Res* 2004; 93: 392-5.
10. Çırak VY, Kar S, Girişkin O. İvermektin ve pirantele karşı at Strongylidae'lerinde antelmintik direnç araştırılması ve *Parascaris equorum*'da makrosiklik lakton direnci. *T Parazit Derg* 2010; 34 (1): 35-9.
11. Çırak VY, Koşum N, Bauer C. Multiple anthelmintic resistance in a trichostrongylid population in Saanen goats imported into Turkey from Australia. DVG-Jahrestagung der Fachgruppe „Parasitologie und parasitäre Krankheiten“, 7.-9. Juli 2010 in München.
12. De Graef J, Claerebout E, Geldhof P. Anthelmintic resistance of gastrointestinal cattle nematodes. *Vlaams Diergen Tijds* 2013; 82: 113-23.
13. Dent JA, Smith MM, Vassilatis DK, Avery L. The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 (6): 2674-90.
14. Dobson RJ, Le Jambre LF, Gill JH. Management of anthelmintic resistance: inheritance of resistance and selection with persistent drugs. *Int J Parasitol* 1996; 26 (8): 993-1000.
15. Dobson RJ, Besier RB, Barnes EH, Love SC, Vizard A, Bell K, Le Jambre LF. Principles for the use of macrocyclic lactones to minimise selection for resistance. *Aust Vet J* 2001; 79 (11): 756-61.
16. Dorny P, Claerebout E, Vercruyse J, Sani R, Jalila A. Anthelmintic resistance in goats in peninsular Malaysia. *Vet Parasitol* 1994; 55 (4): 327-42.
17. Egerton JR, Suhayda D, Eary CH. Laboratory selection of *H. contortus* for resistance to ivermectin. *J Parasitol* 1988; 74 (4): 614-7.
18. Fleming JT, Squire MD, Barnes TM, Tornoe C, Matsuda K, Ahnn J, Fire Asulston JE, Barnard EA, Sattelle DB, Lewis JA. *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes lev-1, unc-29, and unc-38 encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. *J Neurosci* 1997; 17 (15): 5843-57.
19. Folz SD, Pax RA, Thomas EM, Bennet JL, Lee BL, Conder GA. Detecting in vitro anthelmintic effects with a micromotility meter. *Vet Parasitol* 1987; 24 (3): 241-50.
20. Gill JH, Redwin JM, Van Wyk JA, Lacey E. Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 1991; 21 (7): 771-6.
21. Gill JH, Lacey E. Avermectin/milbemycin resistance in trichostrongyloid nematodes. *Int J Parasitol* 1998; 28 (6): 863-77.
22. Hennessy DR. The disposition of antiparasitic drugs in relation to the development of resistance by parasites of livestock. *Acta Trop* 1994; 56 (2-3): 125-41.

23. Herlich H, Rew RS., Colglazier ML. Inheritance of cambendazole resistance in *Haemonchus contortus*. Am J Vet Res 1981; 42 (8): 1342-4.
24. Hubert J, Kerboeuf D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. Vet Rec 1992; 130(16): 442-6.
25. Hughes P, Dowling A, Callinan A. Resistance to macrocyclic lactone anthelmintics and associated risk factors on sheep farms in the lower North Island of New Zealand New Zealand Vet J 2007; 55 (4): 177-83.
26. Ihler CF. Anthelmintic resistance. An overview of the situation in the Nordic countries. ACTA Vet Scand 2010; 52 (1): 24-8.
27. Jabbar A, Iqbal Z, Kerboeuf D, Muhammad G, Khan MN, Afaq M. Anthelmintic resistance: The state of play revisited Life Sci 2006; 79 (26): 2413-31.
28. Johansen MY. An evaluation of techniques used for the detection of anthelmintic resistance in nematode parasites of domestic livestock. Vet Res Commun 1989; 13 (6): 455-66.
29. Kaplan RM. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. Trends Parasitol 2004; 20 (10): 477-81.
30. Kotze AC. Effects of macrocyclic lactones on ingestion in susceptible and resistant *Haemonchus contortus* larvae. J Parasitol 1998; 84 (3): 631-5.
31. Köhler P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. Int J Parasitol 2001; 31: 336-45.
32. Köse M, Kozan E, Sevimli Kırçalı F, Eser M. The resistance of nematode parasites in sheep against anthelmintic drugs widely used in Western Turkey. Parasitol Res 2007; 101: 563-7.
33. Kwa MSG, Veenstra JG, Roos MH. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. Mol Biochem Parasitol 1994; 63: 299-303.
34. Lacey E, Snowden KL. A routine diagnostic assay for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes using tritiated benzimidazole carbamates. Vet Parasitol 1988; 27: 309-24.
35. Lalchandama K. Anthelmintic resistance: the song remains the same. Sci Vis 2010; 10 (4): 111-22.
36. Le Jambre LF, Gill JH, Lenane IJ, Baker P. Inheritance of avermectin resistance in *Haemonchus contortus*. Int J Parasitol 2000; 30: 105-11.
37. Martin RJ, Murray I, Robertson AP, Bjorn H, Sangster N. Anthelmintics and ion-channels: after a puncture, use a patch. Int J Parasitol 1998; 28 (6): 849-62.
38. Michel JE. Strategies for the use of anthelmintics in livestock and their implications for the development of drug resistance. Parasitology 1985; 90 (4): 621-8.
39. Papadopoulos E, Gallidis E, Ptochos S. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. Vet Parasitol 2012; 189 (1): 85-8.
40. Papadopoulos E. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. Small Ruminant Res 2008; 76 (1): 99-103.
41. Pape M, Posedi J, Failing K, Schnieder T, von Samson-Himmelstjerna G. Analysis of the beta-tubulin codon 200 genotype distribution in a benzimidazole-susceptible and -resistant cyathostome population. Parasitology 2003; 127 (01): 53-9.
42. Petersen MB, Friis C, Bjorn H. A new in vitro assay for the quantification of benzimidazole activity against adult *Oesophagostomum dentatum*. Int J Parasitol 1997; 27: 1333-9.
43. Petersen MB, Craven J, Bjorn H, Nansen P. Use of a migration assay for the separation of adult pyrantel-susceptible and resistant *Oesophagostomum dentatum*. Vet Parasitol 2000; 91: 141-5.
44. Prichard RK, Hall CA, Kelly JD, Martin ICA, Donald AD. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. Aust Vet J 1980; 56: 239-50.
45. Prichard R. Anthelmintic resistance. Vet Parasitol 1994; 54: 259-68.
46. Prichard, R. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. Trends Parasitol 2001; 17 (9): 445-53.
47. Robertson AP, Bjorn HE, Martin RJ. Resistance to levamisole resolved at the

- single-channel level. FASEB J 1999; 13: 749-60.
48. Robertson AP, Bjorn HE, Martin RJ. Pyrantel resistance alters nematode nicotinic acetylcholine receptor single-channel properties. Eur J Pharmacol 2000; 394: 1-8.
49. Roos MH, Kwa MSG, Grant WN. New genetic and practical implications of selection for anthelmintic resistance in parasitic nematodes. Parasitol Today 1995; 11: 148-50.
50. Rothwell J, Sangster N. *Haemonchus contortus*: the uptake and metabolism of closantel. Int J Parasitol 1997; 27: 313-9.
51. Sangster NC, Prichard RK, Lacey E. Tubulin and benzimidazole resistance in *Trichostrongylus colubriformis* (nematoda). J Parasitol 1985; 71: 645-51.
52. Sangster NC, Redwin JM, Bjorn H. Inheritance of levamisole and benzimidazole resistance in an isolate of *Haemonchus contortus*. Int J Parasitol 1998; 28: 503-10.
53. Sangster NC, Gill J. Pharmacology of anthelmintic resistance. Parasitol Today 1999; 15 (4): 141-6.
54. Scheuerle M, Mahling M, Muntwyler J, Pfister K. The accuracy of the FAMACHA-method in detecting anaemia and haemonchosis in goat flocks in Switzerland under field conditions. Vet Res 2010; 170 (1-2): 71-7.
55. Silvestre A, Humbert JF. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. Exp Parasitol 2000; 95: 271-6.
56. Sutherland IA, Lee DL. Colorimetric assay for the detection of benzimidazole resistance in trichostrongyles. Res Vet Sci 1989; 46 (3): 363-6.
57. Sutherland IA, Lee DL. A larval paralysis assay for the detection of thiabendazole resistance in trichostrongyles. Parasitology 1990; 100: 131-135.
58. Tınar R, Akyol ÇV, Çırak VY, Şenlik B, Bauer C. Investigations on the seasonal patterns of strongyle infections in grazing lambs, and the occurrence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in western Anatolia, Turkey. Parasitol Res 2005; 96: 18-23.
59. Van Wyk JA. Refugia – overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. J Vet Res 2001; 68: 55-67.
60. Van Wyk JA, Bath GF. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep by clinically identifying individual animals for treatment. Vet Res 2002; 33: 509-29.
61. Varady M, Papadopoulos E, Dolinska M, Königova A. Anthelmintic resistance in parasites of small ruminants: sheep versus goats. Helminthologia 2011; 48(3): 137-44.
62. von Samson-Himmelstjerna G, Buschbaum S, Wirtherle N, Pape M, Schnieder T. TaqMan minor groove binder real-time PCR analysis of b-tubulin codon 200 polymorphism in small strongyles (cyathostominae) indicates that TAC allele is only moderately selected in benzimidazole-resistant populations. Parasitology 2003; 127: 489-96.
63. Waller PJ. International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. Int J Parasitol 1999; 29: 155-64.
64. Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Duncan JL, Kassai T, Malone JB, Pankawich JA, Reinecke J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). Vet Parasitol 1995; 58: 181-213.

Yazışma Adresi:

Doç. Dr. Mustafa KÖSE
 Afyon Kocatepe Üniversitesi
 Veteriner Fakültesi, Parazitoloji A.D.
 A.N. SEZER Kampüsü, 03200- AFYONKARAHİSAR
 Tel: 0505 7188686
 E-posta: mkose@aku.edu.tr



Hepatocellular Carcinoma in a Dog

Zülfikar Kadir SARITAŞ¹, M Fatih BOZKURT², Musa KORKMAZ¹, F.Durmuş BAŞER³, Turan CİVELEK³

¹Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Afyonkarahisar-TURKEY

²Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Afyonkarahisar-TURKEY

³Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Afyonkarahisar-TURKEY

Summary: A female Terrier dog with the age of 11 was brought to our hospital with complains of anorexia, loss of weight, lethargy and abdominal swelling. In the abdominal palpation, a mass extending towards the caudal in the right quadrant was identified. Presence of a mass was confirmed in the direct radiographic examination, which supports the clinical finding. In the abdominal ultrasonography it was determined that the liver had lost its homogenous structure, there was free fluid in the abdomen, and the liver borders were irregular. The ALP, total protein, ALB and GGT were identified as 328 IU/L, 2.74 g/dl, 1.85 g/dl and 12.2 U/l respectively in the biochemical analysis. Experimental laparotomy was applied to the case and a diffused mass was identified in the liver. Samples were taken from the neoplastic masses during the operation and the abdomen was closed after identifying diffused neoplastic formations in all lobes. Following the histo-pathological examination of the sample, the patient was diagnosed with hepatocellular carcinoma. In this paper, it was aimed to report the clinical, radiological, ultrasonographic, biochemical and haematological findings of a hepatocellular carcinoma observed in a dog.

Key Words: Biochemical analysis, dog, hepatocellular carcinoma, ultrasonography

Bir Köpekte Hepatosellüler Karsinom

Özet: 11 yaşlı dişi Terrier ırkı köpek, anoreksi, zayıflama, uyuşukluk ve abdominal genişleme şikayetleri ile hastanemize getirilmiştir. Abdominal palpasyonda abdomenin sağ kadranda kaudale doğru uzanan kitle belirlenmiştir. Olguda direkt radyografik muayenede klinik bulguyu destekleyen kitle varlığı teyid edilmiştir. Abdominal ultrasonografide karaciğerin homojen yapısını kaybettiği, abdomende serbest sıvı varlığı belirlenmiş ve karaciğer sınırlarının düzensiz olduğu saptanmıştır. Biyokimyasal analizde ALP'nin 328 IU/L, total proteinin 2.74 g/dl, ALB'in 1.85 g/dl, GGT'nin 12.2 U/l olduğu belirlendi. Deneysel laparotomi yapılan olguda karaciğerde yaygın kitle varlığı belirlendi. Operasyon sırasında tümöral kitlelerden örnekler alınarak tüm loblarda yaygın tümöral oluşumların varlığının belirlenmesi üzerine abdomen kapatıldı. Alınan örnekten yapılan histopatolojik incelemede hepatosellüler karsinom tanısı kondu. Sonuç olarak bir köpekte rastladığımız hepatosellüler karsinom olgusunun; klinik, radyolojik, ultrasonografik, biyokimyasal ve hematolojik bulgularının paylaşılması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyokimyasal analiz, hepatosellüler karsinom, köpek, ultrasonografi

Introduction

It is reported that the primary hepatocellular tumors (Hepatocellular carcinoma, hepatoma) are rarely seen in animals (6). Hepatocellular Carcinoma (HCC) is most frequently observed in dogs and cattle and less often in pigs and cats (6). Canine HCC is divided into three morphological groups as massive, nodular and diffuse, and massive lesion which involves a single liver lobe is the most common one (4). Liver lobectomy is the recommended therapy method and prognosis after surgical excision is reported to be good in dogs (4). It is defined in the literature that the ultrasonographic findings of the cellular carcinoma

commonly vary depending on a single or multiple focal lesion presence or wide hepatic mass presence (hyperechoic, hypoechoic, mix) (3). In the present case presentation, it is aimed to report the HCC case diagnosed in a dog admitted to our hospital.

Case Presentation

A female Terrier dog with the age of 11 which was admitted to Afyon Kocatepe University Veterinary Faculty Animal Hospital and displayed complains of loss of appetite and abdominal swelling in the last two weeks constituted the material of the case presentation. The case had a breast cancer surgery 3 years ago. The abdomen was hanging and stretched and a mass in the abdomen that



Figure 1. Radiographic view of case (V/D)

extended from the right quadrant towards the caudal was palpated. Direct radiography of the abdomen was taken and abdominal ultrasonography was performed. In the meantime, venous blood sample was taken and biochemical and hematological analyses were initiated (Tables 1 and 2). The liver was found to be enlarging (hepatomegaly) towards the caudal in the radiography taken in V/D position (Figure 1). In the ultrasonography (USG), it was determined that the liver had lost its homogenous appearance, its borders became irregular, there was a



Figure 2. Ultrasonographic view of case

heterogeneous structure concordant with the massive appearance and there was free fluid in the liver. The hepatomegaly was confirmed with the USG findings, which supported the radiography (Figure 2). It was found in the biochemical measurements that the alkaline phosphatase (ALP) level increased whereas total protein (TP), albumin and glucose levels decreased (Table 1). Leukocytosis was detected in the hematological examination. The hematocrit (HCT) level together with mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin (MCH) levels displayed a decrease (Table 2).

Table 1. Biochemical analysis results of case

Parameter	Results	Reference range
ALT	47 U/L	5-60
AST	47 U/L	5-55
ALP	328 U/L	10-150
UREA	45.m mg/dL	18.8-55.6
T. Bilirubin	0.07 mg/dL	0.10-0.60
D. Bilirubin	0.00 mg/dL	≤0.3
Ca	9.4 mg/dL	8.7-11.8
P	3.59 mg/dL	2.9-6.2
TP	2.74 g/dL	5.5-7.5
ALB	1.85 g/dL	2.6-4.0
CK	445.9 U/L	14-120
LDH	160.7 U/L	24-219
GLU	46 mg/dL	60-125
GGT	12.2 U/L	1-10

Table 2. Haematological findings of case

Parameter	Results	Reference range
WBC	24.6X10 ⁹ /L	6.0-17.0
RBC	5.69X10 ⁹ /L	5.50-8.50
HGB	11.0g/dL	11.0-19.0
HCT	33.0 %	39-56
MCV	58.1 fL	62.0-72.0
MCH	19.3 pg	20.0-25.0
PLT	203x10 ⁹ /L	117-460

**Figure 3.** View of the masses in the liver during surgery

Since these findings indicated a possibility of liver failure and neoplasia, we decided to perform experimental laparotomy after taking the permission of patient's owner. After the support therapy, preparations for the operation were made and the experimental laparotomy on the median line was performed. During laparotomy, the liver was determined to be enlarging and diffuse neoplastic formations were detected in all lobes (Figure 3). Tumor surgery on the liver was not considered since the neoplastic formations were diffuse. Some samples were taken from the neoplastic formations and the dog was awakened after ensuring the homeostasis. Pain management

was provided by administering tramadol intravenously in 2 mg/kg dose in the postoperative period.

Histopathological examination

The gray mass of 3x2x2 cm dimensions which was taken during the operation and sent in formol was fixed in a neutral formalin solution for 48 hours. Routine tissue processing was followed and it was embedded in paraffin. Sections of 4-6 microns were taken by using microtome. Immunohistochemical staining was performed on the sections with hematoxylin-eosin (HE) and by using Ki-67 and pan-cytokeratin antibodies via the avidin-biotin-peroxidase complex method. In the microscopic examination, hypochromatic cell islands that originate from the hepatocytes and that are encompassed by thin connective tissues and consist of cells that display atypical properties with one or two nucleoli, round and big nuclei and narrow cytoplasm were observed (Figure 4a). In the immunohistochemical examination, pan-cytokeratin, which is an epithelial tumor indicator, was positive in most of the regions (Figure 4b). Proliferation index was found approximately 50% as a result of the staining using Ki-67 (Figure 4c). Based on findings, the case was diagnosed with HCC.

Discussion

It is reported that there is insufficient amount of data regarding the clinical signs of HCC in dogs (6). The non-specific clinical findings seen in dogs are reported as anorexia, vomiting, ascites, lethargy, loss of weight and abdominal swelling. It is also suggested that the palpable abdominal mass in the HCC can easily be detected (6). Anorexia, loss of weight, lethargy and abdominal signs of the current this case are in line matching up with the literature. On the other hand,

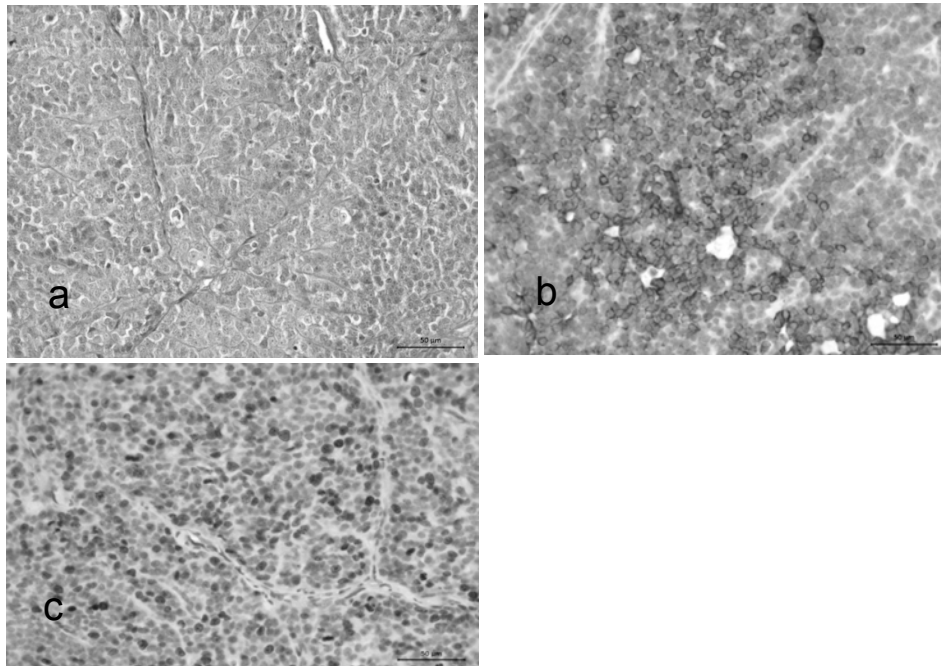


Figure 4 a,b,c. Histopathologic sections of mass

abdominal mass was detected in the radiography and USG. Cuccovillo and Lamb (1) performed the ultrasonographic examination of the liver lesions of 21 dogs and 1 cat in their retrospective study and they determined HCC in two cases in dogs. They performed biopsy in one of these cases and they reported that they applied necropsy or laparotomy to the other. They determined an irregular anechoic central region in the USG of the target lesion in one of the cases. They thought that it was the reflection of the necrotic tissue cavity. In this case, it was determined that the liver lost its homogenous structure, its borders became irregular and it took a heterogeneous form. ALP is a membrane-bound glycoprotein which is present in many tissues. In the HCC case seen in a dog, ALP level was determined as 9820/IU (2). The high level of ALP in this case supports the reported case. Moreover, an increase in hypoalbuminemia and a decrease in the GGT together with hypoglycemia were determined in the biochemical analyses. In light of these findings, development of liver failure was concluded. Liver lesions in all lobes identified during the experimental laparotomy supported the results of biochemical analyses. It is reported that serum alpha-fetoprotein (AFP) measurement can be used in the diagnosis of HCC (5). The AFP was not measured in this case.

In the hemogram of the case; leucocytosis was present; the haemoglobin was in the lower limit; haematocrit was low; and the MCV was reduced, all of which were considered to support the clinical and histopathological findings. Surgery was not performed in the present case since diffuse neoplastic formations were present in all lobes of the liver. In this study, it was aimed to report the USG and laboratory findings of a 11 years old female, Terrier dog with the HCC.

References

1. Cuccovillo A, Lamb CR. Cellular features of sonographic target lesions of the liver and spleen in 21 dogs and a cat. *Vet Radiol Ultrasound* 2001; 43(3): 275-8.
2. Fukui Y, Sato J, Sato R, Yasuda J, Naito Y. Canine serum thermostable alkaline phosphatase isoenzyme from a dog with hepatocellular carcinoma. *J Vet Med Sci* 2006; 68 (10): 1129-32.
3. Lodi M, Chinosi S, Faverzani S, Ferro E. Clinical and ultrasonographic features of canine hepatocellular carcinoma (CHC). *Vet Res Commun* 2007; 31 (Suppl 1): 293-5.

4. Seki M, Asano K, Ishikagi K, Iida G, Watari T. En block resection of a large hepatocellular carcinoma involving the caudal vena cava in a dog. J Vet Med Sci 2011; 73(5): 693-6.
5. Yamada T, Megumi F, Kitao S, Ashida Y, Nishizono K, Tsuchiya R, Shida T, Kobayashi K. Serum alpha-fetoprotein Values in Dogs with Various Hepatic Diseases. J.Vet.Med.Sci, 1999; 61(6): 657-9.
6. Yener Z, Keleş İ, Karaca M. Bir van kedisinde hepatosellüler karsinom. Vet Bil Derg 2001; 17 (2): 57-63.

Corresponding Author:

Zülfikar Kadir SARITAŞ. DVM, PhD.
Afyon Kocatepe University, Faculty of
Veterinary Medicine,
Department of Surgery. A.N.S Campus.
TR-03200. Afyonkarahisar-TURKEY
Tel: +90 272 228 13 12-16203.
Fax:+90 272 228 13 49
e-mail: zksaritas@hotmail.com.

