

**Journal of Advances in
VetBio Science and Techniques
JAVST**



**Vet
Bio**

Year: 2016

Volume: 1

Issue: 1

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief

İlker CAMKERTEN, University of Aksaray

Hikmet ÜN, University of Aksaray

Co-Editor-in-Chief

Kerem URAL, University of Adnan Menderes

Editorial Board Members

Zbigniew ADAMIAK, University of Warmia-Mazury, Olsztyn,
Poland

Mehmet ÇABALAR, University of Harran

Çenker Çağrı ÇINGİ, University of Afyonkocatepe

Güzin ÇAMKERTEN, University of Aksaray

Suat DİKEL, University of Çukurova

Muhammed KATICA, University of Sarajevo

Hail SELCUKBİRİCİK, University of Aksaray

Ilia TSHACEV, University of Stara zagora, Bulgaria

Deniz ALIÇ URAL, University of Adnan Menderes

İbrahim AKIN, University of Adnan Menderes, *Language*

Mehmet GÜLTEKİN, University of Adnan Menderes, *Language*

Hasan ERDOĞAN, University of Adnan Menderes, *Statistical analysis*

Web Designer : Fatih USTA

Typesetter: Faruk KAHRAMAN

Pressed Date: December 2016

Copyright © 2016 JAVST

Journal of Advances in VetBio Science and Techniques (JAVST) is aimed to serve as scientific research journal related to Veterinary Medicine&Biological Sciences. JAVST is a 4 monthly *, open access, and fully refereed international journal with very low publication fee. JAVST is to publish high quality scientific research articles on the subjects of **Veterinary Medicine & Biological sciences**. In addition short communications and reports, case reports, letter to the editor and reviews are also accepted. Publishing languages are Turkish and English. The editorial policy of the journal is based on independent, unbiased, and single blinded peer-review. Scientists of Veterinary Medicine&Biology and who are training/interesting with Veterinary Medicine-Biology are the target groups of JAVST.

www.javst.website

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

Email: ejavst@gmail.com

Tel: 05536203468

*April-August-December

Concession holder is
Dr. İlker Camkerten

Advisory Board

Zbigniew ADAMIAK, University of Warmia-Mazury, Olsztyn, Poland

Mehmet AVCI, University of Harran, Şanlıurfa, Türkiye

Ulvi Reha FİDANCI, University of Ankara, Ankara, Türkiye

Muhammed KATICA, University of Srajevo, Bosnia&Herzegovina

Koycho KOEV, University of Stara zagora, Bulgaria

Przemysław SOBIECH, University of Warmia-Mazury, Olsztyn, Poland

Tevhide SEL, University of Ankara

Nihat ŞINDAK, University of Siirt, Siirt, Türkiye

Ilia TSHACEV, University of Stara zagora, Bulgaria

Katarzyna ŻARCZYŃSKA, University of Warmia-Mazury, Olsztyn, Poland

List of Referees for This Issue

M. Sinan AKTAŞ, University of Atatürk

İlker ÇAMKERTEN, University of Aksaray

Mustafa DURMUŞ, University of Çukurova

Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU, University of Aksaray

Hüdai İPEK, University of Aksaray

Esmeray KÜLEY-BOĞA, University of Çukurova

Hakan SAGIRKAYA, University of Uludağ

Halil SELÇUKBİRİCİK, University of Aksaray

Hikmet ÜN, University of Aksaray

Ömer VARIŞLI, University of Kırıkkale

Meriç L. AVSEVER, University of Aksaray

Suat DİKEL, University of Çukurova

***Sur-names are listed alphabetically**

CONTENTS

Research Articles

- Süperovulasyon Uygulamasına Farklı Irkların Verdikleri Cevapların Araştırılması 1-5
Tahir Karasahin, Sedat Hamdi Kızıl, Muharrem Satılmış, Numan Akyol, Şükrü Dursun, Mesut Kırbaş
- Applications of Different Comet Assay (the Single Cell Gel Electrophoresis) Methods for Detecting DNA Damage in Cryopreserved Fish Sperm 6-13
Burak Evren İnanan, Nazlı Yıldırım, Ekin Demirkaya
- Giardia Duodenalis ile İnfekte Buzağılarda Doğal Kist Saçılımı 14-19
Adnan Ayan, Kerem Ural, Nuran Aysul, Mehmet Gültekin, Hasan Erdoğan, Canberk Balıkçı, Songül Toplu, Göktuğ Toros
- Nutrition and Gender Effect On Body Composition of Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) 20-25
Mustafa Öz
- Ketamine-Ksilazin Anestezisi Uygulanmış Bozova Tazılarında Oksidatif Stress Parametreleri 26-30
Güzin Çamkerten, İlker Çamkerten, Nihat Şındak, Gaye Bulut
- Review**
- Hemotropik mikoplazmalar: Haemobartonella'dan Mycoplasma'ya 31-40
Öznur Aslan

Dergide yayımlanan makalelerin yazar kurum bilgilerinde OHAL nedeniyle değişiklikler oluşmuş olabilir. Bu değişiklikler nedeniyle oluşabilecek her türlü sorumluluk yazar(lar)ın kendisine ait olup, yayıncı herhangi bir sorumluluk kabul etmemektedir.

Süperovulasyon Uygulamasına Farklı Irkların Verdikleri Cevapların Araştırılması

Investigation of the Response of Different Breeds to the Superovulation Treatment

Özet

Bu çalışma, süperovulasyon programı uygulanan 3 farklı sığır ırkının (Simental, Siyah-Alaca ve Esmer) süperovulasyon uygulamasına verdikleri cevapların ve elde edilen embriyo kalitelerinin karşılaştırılması amacıyla yapıldı. Çalışmada her ırktan en az bir doğum yapmış aynı yaş ve kondisyonlara sahip inekler kullanıldı. Her ineğe östrus siklusunun herhangi bir döneminde 1.38 g progesteron içeren intravaginal CIDR (Pfizer Inc., New York, USA) 9 gün süreyle uygulandı. Her ineğe progesteron uygulamasının 7. gününden başlamak üzere günde 2 defa, 4 gün boyunca toplam 400 mg i.m. FSH (PLUSET/Laboratorios Calier) uygulaması yapıldı. Bütün hayvanlara 5. FSH uygulaması ile birlikte 150 µg. d-choprostenol (Dalmazin/Vetaş) yapıldı ve 6. FSH uygulaması ile birlikte CIDR uzaklaştırıldı. Son FSH uygulamasının ardından östrus belirtilerinin 12. ve 24. saatlerinde suni tohumlama yapıldı. İlk suni tohumlamadan 7 (yedi) gün sonra non-surgical yöntemle uterus yıkaması yapılarak embriyolar toplandı. Elde edilen sonuçlara göre Simental ırkı ineklerin süperovulasyon uygulamasına olan cevabının diğer ırklardan daha iyi olduğu gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: Süperovulasyon, Embriyo, Simental, Siyah Alaca, Esmer

Abstract

This study was carried out to compare three different breeds (Simmental, Holstein and Brown Swiss) for the response to the superovulation program and embryo quality. Cows from each breed which have given at least one birth and which are at the same age and conditions were used. Regardless of the period of the oestrus cycle, intravaginal CIDR (Pfizer Inc., New York, USA) implant including 1.38 g progesteron was applied to each cow and kept 9 days long. A total of 400 mg i.m. FSH (PLUSET/Laboratorios Calier) was injected twice a day during 4 days from 7th day after implantation of CIDR to cows. All animals were injected 150 µg d-choprostenol (Dalmazin/Vetaş) together with 5th FSH injection, and right after 6th FSH injection CIDR was removed. After the last FSH injection, in the 12th and 24th hours from the beginning of oestrus, cows were inseminated. Seven days after first insemination, embryos were collected via non-surgical uterine flushing. According to the results, superovulation response was better in Simmental cows than the others. The best response for superovulation in FSH hormone was also observed in Simmental breed cows.

Key Words: Superovulation, Embryo, Simmental, Holstein, Brown Swiss

Tahir KARASAĞIN¹,
Sedat Hamdi KIZIL²,
Muharrem SATILMIŞ²,
Numan AKYOL³,
Şükrü DURSUN⁴,
Mesut KIRBAŞ⁵

¹ Aksaray Üniversitesi
Veteriner Fakültesi, Fizyoloji
Anabilim Dalı, Aksaray-Türkiye

² Uluslararası Hayvancılık
Araştırma Ve Eğitim Merkezi
Müdürlüğü, Ankara-Türkiye

³ Kırıkkale Üniversitesi
Veteriner Fakültesi, Dölerme ve
Sunı Tohumlama Anabilim
Dalı, Kırıkkale-Türkiye

⁴ Aksaray Üniversitesi
Veteriner Fakültesi, Doğum ve
Jinekoloji Anabilim Dalı,
Aksaray-Türkiye

⁵ Bahri Dağdaş Uluslararası
Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Müdürlüğü, Konya-Türkiye

Sorumlu yazar

Doç. Dr. Tahir KARASAĞIN

Aksaray Üniversitesi Veteriner
Fakültesi Fizyoloji Anabilim
Dalı Adana Yolu Üzeri E-90
Karayolu 7. Km, 68100
Aksaray / TÜRKİYE

tahirkarasahin@gmail.com

Copyright © 2016 JAVST

Giriş

Embriyo transfer (ET) teknolojisi genetik ilerlemeyi hızlandırmak ve yüksek genetik kapasiteye sahip donörlerden elde edilen yavru sayısını artırmak amacıyla kullanılmaktadır (Baruselli vd, 2006; Bülbül vd, 2010; Mapletoft vd, 2002). Sığırlarda genetik ilerleme ve yetiştirme için uzun süreçlere ihtiyaç vardır. Embriyo transferi teknolojisi genetik ilerlemenin süresinin kısaltılması açısından önemlidir (Nilchuen vd, 2011; Barati vd, 2006). Embriyo transferinin en önemli ve vazgeçilmez unsurlarından biri de süperovulasyondur. Süperovulasyonun amacı, fazla sayıda follikülleri baskı altına alarak onları ovulasyon için hazır hale getirmektir (Akyol vd, 2014). Sığırlarda embriyo üretim çalışmaları yaygın olarak yapılmaktadır (Quaresma vd, 2003). Süperovulasyon ve embriyo toplamak için birçok farklı protokol olmasına rağmen, bu protokoller son derece değişken sonuçları ortaya koymaktadır (Silva vd, 2009). Bos Taurus'larda süperovulasyon başına ortalama 5-6 adet transfer edilebilir embriyo elde edildiği bildirilmektedir (Hasler, 1992). İneklerden bireysel olarak embriyo elde etme oranlarında çok geniş değişikliklerin olması süperovulasyon uygulamasının doğal olmayan prosedüründen kaynaklanabilmektedir (Stroud ve Hasler, 2006). Donör sığırlardan elde edilen embriyo kalitesine, iç ve dış faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir (Silva vd, 2009). İç faktörler arasında ırk, yetiştirme, gonadotropinlere karşı bireysel duyarlılık, yaş, beslenme alışkanlıkları ve sağlık durumu etkili olmaktadır (Akyol vd, 2014; Silva vd, 2009). Dış faktörler arasında FSH'nın değişik ticari preparatlarının kullanılması, dozu, uygulama şekli ve mevsim sayılabilir (Kafi ve McGowan, 1997).

Bu çalışmada; Simental, Holsteyn ve İsviçre Esmeri ırkların süperovulasyon uygulamalarına verdikleri cevaplarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Her bir ırktan en az bir doğum yapmış üçer baş donör inek embriyo elde etmek amacıyla kullanıldı. Çalışmada kullanılan donörler farklı zamanlarda birden fazla defa kullanılmıştır. Siyah Alaca ırkında (H grubu) 11, Esmer ırkta (E grubu) 9 ve Simental ırkında (S grubu) 12 uterus yıkama işlemi gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan hayvanların yaşama ve verim payları hesaplandı. Tüm hayvanlara kuru yonca otu, kuru çayır otu ve arpa samanı ile birlikte konsantre yem ile günde iki defa beslendi. Su ise ad libitum olarak verildi. Hayvanlar yarı açık serbest sistem ahırlarda barındırıldılar. Bütün hayvanlara östrus siklusunun dönemine bakılmaksızın 9 gün süreyle 1.38 g progesteron içeren intravaginal CIDR (Pfizer Inc., New York, USA) uygulandı ve bu uygulama zamanı sıfıncı (0) gün olarak kabul edildi. Sığırlara CIDR takılmasını takip eden 7. günden itibaren dört gün boyunca günde iki kez azalan dozlarda sabah akşam (80:80 mg, 60:60 mg, 40:40 mg, 20:20 mg) olacak şekilde toplam 400 mg/i.m. FSH (Folltropin-V-Bioniche, Belleville, Ontario Canada) uygulandı. Bütün hayvanlara 5. FSH enjeksiyonu ile birlikte 150 µg. d-kloprostenol (Dalmazin/Vetaş) uygulandı ve 6. FSH enjeksiyonu ile birlikte CIDR uzaklaştırıldı. Son FSH uygulamasının 12. ve 24. saatlerinde inekler 2 kez tohumlandı. Suni tohumlamadan sonraki 7. günde %1 buzağı serumu (CS) (N4762, SİGMA) ve antibiyotik (125 mg/l Kanamisin) içeren laktatlı ringer solüsyonu (Eczacıbaşı) ile uterus yıkama işlemi yapılarak embriyolar toplandı. Uterus yıkamasını takiben elde edilen süzöntü laboratuvarında mikroskop altında tarandı. Bulunan embriyolar Phosfat Buffer Solüsyonu (PBS) + %20 CS + %04 Bovine Serum Albümine (BSA) (A9647) solüsyonu içerisine aktarılıp stereo mikroskop altında değerlendirilip kalite ve gelişim safhalarına göre sınıflandırıldı. Elde edilen embriyolar

IETS'nin (Wright JM (1998), belirlediği kriterlere göre kalite sınıflandırması yapıldı.

Bulgular

Çalışma sonucunda süperovulasyon uygulamasına ırklar bazında elde edilen bulgular Tablo 1'de verilmiştir. Bu çalışmada H grubunda 11, E grubunda 9 ve S grubunda 12 uterus yıkama işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen korpus luteum sayıları, ovum-embriyo kazanma, transfer edilebilir embriyo, dejenere embriyo ve fertilize olmamış oosit değerleri; H grubunda sırasıyla 8.36 ± 2.37 , 70.65 (65/92), 3.27 ± 2.05 , 1.45 ± 0.92 , 1.18 ± 1.28 , E grubunda, 10.22 ± 2.62 , 95.65 (88/92), 3.66 ± 2.67 , 1.56 ± 1.01 , 4.33 ± 1.14 , S grubunda, 15.92 ± 2.27 , 83.24 (159/191), 6.83 ± 1.96 , 3.33 ± 0.88 , 3.08 ± 1.22 olarak tespit edildi. Irklar arasında CL sayısı ve embriyo kazanma oranı bakımından gruplar arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Transfer edilebilir embriyo ve transfer edilemeyen embriyo bakımından gruplar arası istatistik olarak fark gözlenmemiştir ($P > 0.05$). Hesaplamalarda one way anova kullanılmıştır. S grubunda hayvan başına 15.92 ± 2.27 olan CL ortalaması, H grubundan elde edilen sonuçlara kıyasla daha yüksek bulunmuştur ($P < 0.05$). Geri kazanma oranları bakımından Esmer ırkın süperovulasyonu sonucunda tespit edilen korpus luteumlara ait hücrelerin büyük bir çoğunluğunun elde edildiği (% 95.65) ve bu oranın diğer 2 ırka ait geri kazanımdan yüksek olduğu görülmüştür ($P < 0.05$).

Tartışma

Bu çalışma 3 farklı sığır ırkına uygulanan (Siyah Alaca, Esmer ve Simental) süperovulasyon programının elde edilen embriyo sayı ve kalitesi üzerindeki etkisini tespit etmek amacıyla gerçekleştirildi. Sığırlarda süperovulasyon programını etkileyen çok çeşitli

faktörler vardır. Bu faktörler arasında en önemlileri; hayvanların ırkı ve yetiştirildiği çevredir (Mapletoft vd, 2002). Çevresel faktörler arasında; beslenme durumu, üreme geçmişi, sezon, yetiştirme tarzı ve ovaryumların uygulama sırasındaki durumları süperovulasyonu etkileyen faktörlerdendir (Mapletoft vd, 2002). Embriyo üretimini sınırlayan temel faktörlerden biri, ticari olarak süperovulasyon amacıyla kullanılan gonadotropinlerin ovaryumlar üzerindeki etkisi ve yeterli sayıda oosit ovulasyonu sağlamasıdır (Kelly vd, 1997).

Demczuk vd, (1998) Simental ırkı ineklerde yaptıkları çalışmada ortalama 9.8 adet transfer edilebilir embriyo elde ettiklerini belirtmişlerdir. Simental ırkı ineklerin süperovulasyonu amacıyla iki farklı FSH preparatının kullanıldığı bir çalışmada Pluset kullanılan grupta 7.56, Pluset ve Folltropin birlikte kullanıldığı grupta ise ortalama 10.44 transfer edilebilir embriyo elde edilmiştir (Nascimento, 2004). Bizim yaptığımız çalışmada FSH preparatı olarak Folltropin kullanılmış olup elde edilen transfer edilebilir embriyo sayısının bu çalışmalardan düşük olduğu görülmüştür. Bülbül vd, (2010) İsviçre Esmeri sığırlarda yaptıkları çalışmalarında ortalama 9.2 adet Cl ve 4.5 adet transfer edilebilir embriyo elde edildiğini bildirmişlerdir. Tarafımızdan yapılan çalışmada, bu çalışmaya yakın sonuçlar elde edilmiştir. Detterer vd, (1997) 2 veya daha fazla doğum yapmış Siyah Alaca ırkı ineklerde yaptıkları çalışmalarında elde ettikleri ortalama 9.23 adet embriyodan ortalama 4.46, adedinin, Viera vd, (2014) Siyah Alaca ırkı ineklerde 10.6 hücreden 7.5, Hasler vd, (1981) 3-6 yaş arası Siyah Alaca ineklerde ortalama 10.7 adet hücreden 7.1 adedinin nakledilebilir nitelikte olduğunu belirtmişlerdir. Bizim yaptığımız araştırmada ise gerek ovaryum üzerindeki Cl sayısı ve gerekse transfer edilebilir kaliteli embriyo sayısı bakımından ilgili yazarlardan daha az bulunmuştur.

Düşük olmasının en önemli sebebinin yetiştirme şartları ve beslemenin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Siyah Alaca ırkı sığırlarda yapılan bir başka çalışmada süperovulasyon başına ortalama 4.15 transfer edilebilir embriyo, 2.12 transfer edilemez embriyo elde edildiği bildirilmiştir (Hızlı vd, 2012). Multiple ovulasyon ve embriyo transfer (MOET) kapsamında Mısır'da yapılan çalışmada İsveç Esmer'i ineklerin süperovulasyon programına cevabının Siyah Alaca ineklerden daha iyi olduğu belirtilmiştir (Hüseyin vd, 2014). Yine Amerikan Embriyo Transfer Birliğinin verilerine göre süperovulasyon sonucu, etçi ırklarda ortalama 6.6, sütçü ırklarda ise 5.7 kaliteli embriyo elde

edildiği bildirilmektedir (Hasler, 2010). Sunulan çalışmada etçi özelliği ağır basan kombine ırklardan Simental ırkı ineklerden süperovulasyon sonrası elde edilen sonuçların diğer iki ırktan daha iyi olduğu görülmektedir. Özellikle ortalama CL ve transfer edilebilir embriyo sayıları bakımından daha iyi sonuçlar alınmıştır. Süperovulasyon sonrası elde edilen hücre ve embriyoların geri kazanım oranı ise Esmer ırkta %95.65 gibi oldukça yüksek bir oranda çıkmıştır. Bu durumun en büyük sebebi olarak Esmer ırk ineklerin uteruslarının anatomik yapısının manüplasyonlarda kolaylık sağlamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 1: Süperovulasyon uygulaması sonucu elde edilen veriler.
Table 1: The data obtained from superovulated application.

	Siyah Alaca	Esmer	Simental
N	11	9	12
Toplam CL	92	92	191
Ortalama CL	8.36±2.37 ^b	10.22±2.62 ^{ab}	15.92±2.27 ^a
Transfer edilebilir embriyo	36	33	82
Ortalama transfer edilebilir embriyo	3.27±2.05	3.66±2.67	6.83±1.96
Dejenere embriyo	16	14	40
Ortalama dejenere embriyo	1.45±0.92	1.56±1.01	3.33±0.88
UFO	13	39	37
Ortalama UFO	1.18±1.28	4.33±1.14	3.08±1.22
Toplam oosit ve embriyo	65	88	159
Geri kazanım oranı (%)	70.65 ^c	95.65 ^a	83.24 ^b
Folikül bulunma oranı (%)	27.27	11.11	8.33

(P<0.05)

Sonuç

Sonuç olarak her üç ırkın embriyo transferi amacıyla süperovulasyonda kullanılabilmesi kanaati oluşmuştur.

Kaynaklar

Akyol N, Kızıl SH, Satılmış M, Karaşahin T, Erat S (2014): The results of consecutive superovulations in cows by induction with various exogenous progesterone routes. Turk J Vet Anim Sci 38: 157-160.

Barati F, Niasari_Naslaji A, Bolourchi M., Sarhaddi F, Razavi K, Naghzali E, Thatcher WW (2006): Superovulatory response of Sistani cattle to three different doses of FSH during winter and summer. Theriogenology 66: 1149-1155.

Baruselli PS, Sa Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MF, Barros CM, Bo GA (2006): Superovulation and embryo transfer in Bos indicus cattle. Theriogenology 65: 77-88.

- Bülbül B, Kırbaş M, Köse M, Dursun Ş (2010):** Investigation of superovulation response in brown swiss cows after synchronization using progesterone and oestradiol valerate. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 16(3): 463-468.
- Demczuk E, Kozicki LE, Pontelli ES, Salles JO (1998):** Embryo transfer in Simmental cows in northwest Paraná and South of Mato Grosso do Sul. *Braz J Vet Res Anim Sci* 35(4): 174-177.
- Detterer J, Schmidt T, Harlizius B (1997):** Factors influencing the variability in superovulation results in German Holstein cattle. *Theriogenology* 47(1): 169, Proceedings Annual Conference of the International Embryo Transfer Society.
- Hasler JF, Brooke GP, McCauley AD (1981):** The relationship between age and response to superovulation in holstein cows and heifers. *Theriogenology*, 15(1): 109.
- Hasler JF (1992):** Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J Dairy Sci* 75: 2857-2879.
- Hasler JF (2010):** Bovine embryo transfer: are efficiencies improving? Applied Reproductive Strategies Conference Proceedings August 5th & 6th, Nashville, TN. 265-282.
- Hızlı H, Ayaşan T, Kılıçalp N, Kara U, Karakozak E, Özcan BD, Gök K, Çamlıdağ A, Çoban S, Mutlu H, Seğmenoğlu MS (2012):** Verici inek ve düvelerde tekrarlanan süperovulasyonların embriyo kalitesi üzerine etkisi. *Van Vet J*, 23(1): 11-14.
- Hussein MM, Abdel Aziz RL, Abdel-Wahab A, El-Said H (2014):** Preliminary study of factors affecting the superovulatory response of high producing dairy cows superstimulated regardless of the stage of estrous cycle in Egypt. *Beni-Seuf Univ J Appl Sci* 3: 286-292.
- Kafi M, McGowan MR (1997):** Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim Reprod Sci* 48:137-157.
- Kelly P, Duffy P, Roche JF, Boland MP (1997):** Superovulation in cattle: effect. of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Anim Reprod Sci* 46:1-14.
- Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP (2002):** Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev* 42: 601-611.
- Nascimento AB, Seneda MM, da Silveira EC, Pansard H (2004):** Gonadotrophin association in super-ovulation of embryo donor cows. *Cienc anim bras* 14(2): 89-94.
- Nilchuen P, Rattanatabtimong S, Chomchai S (2011):** Superovulation with different doses of follicle stimulating hormone in Kamphaeng Saen beef cattle. *Songklanakarın J Sci Technol* 33(6): 679-683.
- Quaresma MA, Costa LL, Silva JR (2003):** Superovulation of Mertolenga cows with two FSH preparations (FSH-P and FOLLTROPIN). *Rev Port Cien Vet* 98(546): 81-84.
- Silva JCC, Alvarez RH, Zanenga CA, Pereira GT (2009):** Factors affecting embryo production in superovulated Nelore cattle. *Anim Repro* 6:440-445.
- Stroud B, Hasler JF (2006):** Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology* 65: 65-76.
- Vieira LM, Rodrigues CA, Mendanha MF, Sá Filho MF, Sales JNS, Souza AH, Santos JEP, Baruselli PS (2014):** Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. *Theriogenology* 82: 204-212.
- Wright JM (1998):** Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. In, Stringfellow DA, Seidel SM (Eds): *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 3rd ed., pp. 167-170, Savoy, Illinois.

Applications of Different Comet Assay (the Single Cell Gel Eelectrophoresis) Methods for Detecting DNA Damage in Cryopreserved Fish Sperm

Kriyoprezervasyon Uygulanmış Balık Sperm Hücrelerinde DNA Hasarının Tespitinde Farklı Comet Analizi (Tek Hücre Jel Elektrofizi) Metotlarının Uygulanmaları

Abstract

Cryopreservation as an assisted reproduction method is commonly used for successful long-term storage of not only human but also animal gametes, even their embryos. Moreover, cryopreservation of sperm offers many advantages. In fish, for instance, it is useful for improving artificial reproduction, facilitating genetic manipulation, and reducing the amount of male breeders stocks. However, after cryopreservation, sperm cell could have some problems such as loss in motility and DNA damage, leading to lower fertilization and hatching rates. The comet assay is a simple, but sensitive tool for detecting strand breaks in DNA in single sperm cells. In this study, three comet assay methods which contain different chemical agents and have different application times were carried out on fish sperm. The mixed sperm samples obtained from mature carp (*Cyprinus carpio*) males were used in the experiments. Firstly, using fresh sperm samples, DNA damage is classified by means of lysis solutions of each used method without H₂O₂ and with 12, 25 and 50 µM H₂O₂. Thus, DNA damage is visually scored by measuring the DNA tail of each sperm cell in fluorescent microscope images as positive control (undamaged DNA), 1, 2, and 3 classes of damage, referring from the less to more damaged sperm cells. Secondly, after thawing, cryopreserved sperm samples were applied by the comet assay methods. The results of three methods have shown no significant differences among the percentages of undamaged DNA (67.7±2.0 %, 69.3±1.8 % and 68.2±2.8 %) and total damaged DNA (32.3±2.0 %, 30.7±1.8 % and 31.8±2.8 %) of sperm cells as. On the contrary, there were some statistical differences among the classes of damage. Consequently, all methods have been found successful in detection of undamaged and total damaged DNA but not in the recognition of the damage classes.

Key Words: Cryopreservation, Comet Assay, DNA damage, Fish sperm, Single Cell Gel Eelectrophoresis

Özet

Kriyoprezervasyon, hem insan hem de hayvan gametlerinin, hatta embriyolarının, başarılı bir şekilde uzun süreli saklanması için yaygın olarak kullanılan yardımcı üreme tekniklerindedir. Ayrıca, sperm kriyoprezervasyonunun birçok avantajı vardır. Örneğin, balıklarda suni döllemenin geliştirilmesinde, genetik manipülasyonların kolaylaştırılmasında, erkek anaç stokunun azaltılmasında kullanılır. Ancak kriyoprezervasyon sonrası, sperm hücrelerinde sonrasında dölleme ve yumurtadan çıkış oranlarının azalmasına sebep olacak motilite kaybı ve DNA hasarı gibi problemler ile oluşabilir. Comet analizi, DNA sarmalındaki kırıkları tek bir sperm hücresi seviyesinde tespit edebilen basit ve hassas bir araçtır.

Burak Evren İNANAN¹

Nazlı YILDIRIM²

Ekin DEMİRKAYA³

¹Aksaray University, Eski
Vocational School, Department
of Veterinary Science, 68100,
Aksaray, Turkey.
burakinanan@aksaray.edu.tr

²Muğla Sıtkı Koçman
University, Graduate School of
Natural and Applied Sciences,
Department of Biology, Muğla,
Turkey.

³Muğla Sıtkı Koçman
University, Graduate School of
Natural and Applied Sciences,
Department of Fisheries,
Muğla, Turkey.

Corresponding author:

Burak Evren İNANAN

Aksaray University, Eski
Vocational School, Department
of Veterinary Science, 68100,
Aksaray, Turkey.
burakinanan@aksaray.edu.tr

Copyright © 2016 JAVST

Bu çalışmada, farklı kimyasal maddeler ve uygulama zamanlarına sahip üç farklı Comet analiz metodu balık sperm hücrelerine uygulanmıştır. Olgun sazan balığı (*Cyprinus carpio*) bireylerinden alınan sperm örnekleri bu çalışmada kullanılmıştır. Öncelikle, taze sperm örnekleri kullanılarak, her metod için lizis solüsyonuna 12, 25 ve 50 μM H_2O_2 eklenerek DNA hasarı sınıflandırılmıştır. Böylece, DNA hasarı, her hücre DNA'sının oluşturduğu kuyruk uzunluğuna göre floresan mikroskop altında incelenerek görsel olarak, 1. 2. ve 3. dereceden hasarlı ve H_2O_2 eklenmemiş örnekler 0 (hasarsız) olarak ölçeklendirilebilir. Sonrasında, kriyoprezervasyon uygulanmış sperm örnekleri çözündürülerek, üç farklı Comet analiz metodu uygulanmıştır. Üç metoda ait yüzde hasarsız DNA sonuçları (%67,7 \pm 2,0; %69,3 \pm 1,8 ve %68,2 \pm 2,8) arasında ve toplam hasarlı DNA sonuçları (%32,3 \pm 2,0; %30,7 \pm 1,8 ve %31,8 \pm 2,8) arasında istatistiki olarak önemli derece fark saptanamamıştır. Buna karşın, DNA hasar sınıflandırmaları arasında bazı istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır. Sonuç olarak, her üç metod hasarsız ve toplam hasarlı DNA tespitinde benzer başarıyı göstermekte iken DNA hasar sınıflarının tanımlanmasında farklılıklar olabilmektedir.

Anahtar kelimeler: Kriyoprezervasyon, COmet Analizi, DNA Hasarı, Balık Sperm, Tek Hücre Jel Elektroforezi

Introduction

In reproductive biology, cryopreservation is a common method to preserve sperm cells, and has been applied in sperm of different animal groups as well as in fish sperm (Barbas & Mascarenhas, 2009; Diwan et al., 2010). The cryopreservation of sperm offers many benefits. In fish, for instance, the cryopreservation could be used in conservation of endangered fish species, acquiring desired genotype through cross-breeding, easy transportation of genetic material, broodstock protection, optimal sperm utilization in hatchery production and laboratory experiments, easy transportation of genetic material among hatcheries, economically and effectively maintenance of breeders in hatcheries, experimental material for advanced studies (Chao *et al.*, 1987; Chao & Liao, 2001).

Conceptually, the procedure of cryopreservation could be divided into two main processes; the freezing and the thawing. These processes have potential to damage sperm cells associated with loss of motility and accordingly fertility rate, loss of plasma membrane, the integrity mitochondria and DNA (Cabrita et al., 1998; Suquet et al., 1998). Damages in DNA as a result of the cryopreservation procedure were determined not just in human sperm also in boar, ram, and equine sperm by comet assay (Hughes et al., 1997; Baumber et al., 2003;

Soliman et al., 2004; Fraser & Strzeżek, 2005). Similar damages in DNA have been found in different fish species such as rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), gilthead sea bream (*Sparus aurata*), loach (*Misgurnus fossilis*), sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Zilli et al., 2003; Kopeika et al., 2003; Cabrita et al., 2005;).

The comet assay, or also known as single-cell gel electrophoresis, is one of the common methods for assessing DNA damage at individual cell level (Ostling & Johanson, 1984). There are several different types of comet assays which mostly vary based on the pH lysis and electrophoresis solutions (Nossoni, 2008). The procedure of comet assay demonstrated in Fig. 1 has seven main steps; isolation of cells, preparation of slides, lysis, unwinding of DNA strands, electrophoresis, neutralization, fluorescent staining and microscopic evaluation.

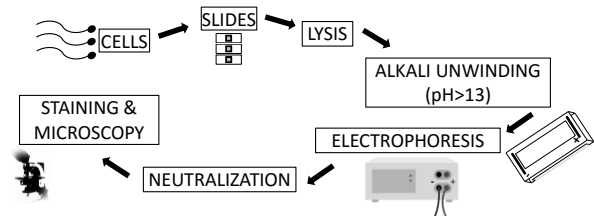


Figure 1. The basic flow diagram of the alkaline comet assay procedure, indicating main steps associated with the assay (modified from Tice et al. 2008).

Şekil 1. Comet analizi temel prosedürünün temel basamaklarını belirten akış şeması (Tice vd. (2008)'den değiştirilerek).

In this study, three comet assay methods, Singh et al. (1988), Cabrita et al. (2005), Shen & Ong, (2000), which contain different chemical agents and have different application times were carried out on fish sperm. These three methods have been compared with regards to their detection capacity in DNA damage scores.

Materials and Methods

In this study, the mixed sperm samples that obtained from mature carp (*Cyprinus carpio*) males manual abdominal stripping while avoiding any contamination from water, blood, urine, or faeces were used in the experiments. The experiments were carried out in two steps. Firstly, using fresh sperm samples, DNA damage is classified by means of lysis solutions of each used method without H₂O₂ and with 12, 25 and 50 µM H₂O₂. Thus, DNA damage is visually scored by measuring the DNA tail of each sperm cell in fluorescent microscope images as positive control (undamaged DNA), 1, 2, and 3 classes of damage, referring from the less to more damaged sperm cells. Secondly, after thawing, the comet assay methods were applied by the cryopreserved sperm samples.

Fresh and frozen/thawed sperm were rinsed with phosphate buffer saline (PBS) solution, and diluted until a final concentration of 8–10 x10⁶ sperm per ml. Slides were prepared one day before the experiments applying a thin layer of normal melting point agarose, eliminating agarose in excess. The slides were stored at room temperature and protected from dust and light. Low melting point agarose was prepared next day for the second layer. This agarose was mixed with 30 µl sperm suspension in an Eppendorf tube. The agarose: sperm suspension was added to the slides covering with a coverslip. After that, the coverslip was removed and slides were left to solidify at 4 °C for 10min. For each sample, three slides were prepared and examined. Then,

three comet assay methods, Singh et al. (1988), Cabrita et al. (2005), Shen & Ong, (2000), are applied to the sample, which main differences are summarized in Table 1. In all methods, for comet visualization 40 µl ethidium bromide at final concentration 0.5 µg/ml were pipetted into the sample, and the slides were examined with a system combining a fluorescence Zeiss Axio Scope A1 (Germany) microscope with AxioCam ICc 5 camera. 100 cells were scored per slide in triplicate.

In cryopreservation procedure, the semen samples were mixed in a ratio of 1:9 (v/v) with an extender composed of modified Kurokura solution (62 mM NaCl, 134 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and 2 mM NaHCO₃, pH 8.2), 10% DMSO, and 10% egg yolk (Magyary et al., 1996). After dilution, the samples were drawn into 0.25 ml straws (IMV, France) and sealed with polyvinyl alcohol. The straws were placed on a rack 2.5 cm above a liquid nitrogen surface for 10 min and then plunged directly into the liquid nitrogen. At least seven straws per a sperm sample were frozen. After a week of storage in liquid nitrogen, the samples were thawed in a 20°C water bath for 30 s (Öğretmen & Inanan, 2014). The results are shown as the means ± the standard deviation (SD). Non-parametric Mann–Whitney U tests followed by Kruskal–Wallis test were used, and $\alpha < 0.05$ were taken to indicate a significant difference between the treatments in terms of percentages of DNA damages.

Results and Discussion

The classification of DNA damaged cells were representative in Fig. 1. To obtain this classification, fresh samples were treated by the different concentrations of H₂O₂ in lysis solution. Under the fluorescence microscope, the sperm samples treated with lysis solution with H₂O₂ free were observed spherical in diameter between 24–30 µm. DNA of

sperm samples exposed by lysis solution with the different concentrations of H₂O₂ were tailed, and length of the tail DNA increased with the higher concentrations of H₂O₂. Thus, the sperm samples exposed by 12 µM H₂O₂ were visualized as an olive tail in 30-40 µm, and scored as grade 1 mild damaged DNA. Similarly, the sperm treatments with 25 and 50 µM H₂O₂ have image formations in the fluorescence microscope grade 2 moderate damaged DNA (length

between 40-50 µm) and grade 3 severe damaged DNA (length between >50 µm), respectively.

The three different comet assay methods were applied with the different concentrations of H₂O₂ in lysis solution to reveal that there is any difference in their scaling or classification of DNA damaged (Fig. 3). There were no significant differences between the percentage of both DNA undamaged and damaged cell among the three methods (P>0.05). Each H₂O₂ treatments were reflected a grade of DNA damaged.

Table 1. The main differences in the steps of among the comet assay methods used in this study (Si;Singh et al., 1998; Ca;Cabrita et al., 2005; Sh;Shen & Ong, 2000).

Tablo1. Bu çalışmada kullanılan COmet analizi metotlarının basamakları arasındaki temel farklılıklar (Si;Singh vd., 1998; Ca;Cabrita vd., 2005; Sh;Shen ve Ong, 2000).

The steps	Si	Ca	Sh
Gel setting on slides	Bottom layer; 0.5% NMA ¹ Top layer; Sample mixed with 0.5% LMA ²	Bottom layer; 0.5% NMA Top layer; Sample mixed with 0.5% LMA	Bottom layer; 0.75% NMA Middle layer; Sample mixed with 0.75% LMA Top layer; 0.75% LMA
Lysis solution	2.5 M NaCl, 100 mM Na ₂ -EDTA, 10 mM Tris, 1% N-Lauroylsarcosine 1% Triton X-100. pH 10, for 1 h at 4 °C	2.5 M NaCl, 100 mM Na ₂ -EDTA, 10mM Tris, 1% N-Lauroylsarcosine 1% Triton X-100. pH 10, for 1 h at 4 °C	2.5 M NaCl, 100 mM Na ₂ -EDTA, 10 mM Tris, 1% N-Lauroylsarcosine, 1% Triton X-100. pH 10, for 1 h at 4 °C
DNA decondensation		+ 10 mM dithiothreitol for 30 min at 4 °C. + 4 mM lithium diiodosalicylate for 90min	+ RNase treatment ³ for 4 h + proteinase K ⁴ treatment for 15 h
Electrophoresis solution	1 mM Na ₂ -EDTA, 300 mM NaOH	1 mM Na ₂ -EDTA, 300 mM NaOH	100 mM Tris, 300 mM sodium acetate
Unwinding of DNA	pH >13 for 20 min at 4 °C	pH 12 for 20 min at 4 °C	pH 10 for 20 min at 4 °C
Electrophoresis running	for 20 min at 25 V, 4 °C.	for 10 min at 25 V, 300 mA, 4 °C.	for 1 h at 12 V, 100 mA, 4°C
Neutralization	0.4 M Tris, pH 7.5 for 5 min at 4 °C.	0.4M Tris, pH 7.5 for 5min at 4 °C.	0.4 M Tris-HCl pH 7.4 for at least 5 min.
Drying of slides		methanol for 3min.	

¹NMA: normal melting agarose; ²LMA; low melting temperature agarose; ³RNase solution: 2.5 M NaCl, 5 mM Tris, 0.05% N-Lauroylsarcosine, pH 7.4, with 10 mg/ml RNase A; ⁴proteinase K solution: 2.5 M NaCl, 5 mM Tris, 0.05% N-Lauroylsarcosine, pH 7.4, with 200 mg/ml proteinase K.

The percentages of undamaged DNA were found 98.8±0.8 %, 98.8±0.6 %, and 98.8±0.8 % with three

comet assay methods, Singh et al. (1988), Cabrita et al. (2005), Shen & Ong, (2000), respectively. In the same

samples, also the percentages of Grade 1 damaged DNA were detected by all methods as < 2%. In the samples treated with 12 μM H_2O_2 , According to the methods, the percentages of Grade 1 damaged DNA were scored as $78.7\pm 0.8\%$, $21.3\pm 0.8\%$, and $78.7\pm 1.8\%$. In the same samples, the percentages of Grade 2 damaged DNA were determined as $21.3\pm 1.8\%$, $78.8\pm 1.8\%$, and $21.2\pm 1.8\%$. In the samples treated with 25 μM H_2O_2 , mainly the percentages of Grade 2 damaged DNA was determined as $83.8\pm 1.5\%$, $85.3\pm 3.3\%$, and $85.0\pm 2.3\%$. In the same samples, the percentages of Grade 1 and Grade 3 damaged DNA were also found as < 10 %. In the samples treated with 50 μM H_2O_2 , the percentages of Grade 3 damaged DNA were scored as $92.0\pm 1.3\%$, $93.5\pm 1.3\%$ and $92.8\pm 1.0\%$ with three methods (Fig. 3). The results of the applications of three methods to cryopreserved sperm were shown in Table 2. According to the methods, the percentages of undamaged DNA were calculated as $67.67\pm 2.0\%$, $69.33\pm 1.8\%$ and $68.17\pm 2.8\%$ in the cryopreserved sperm. On the other hand, the percentage of total damaged DNA was found as around 30 % with all methods. The only significant differences were observed in the grading of total damaged DNA ($P < 0.05$)

Eventually, the remarkable difference among the methods was appeared the pH of electrophoresis solutions. The electrophoresis solution of the method used in Singh *et al.* (1988) was >13, while the others were less than this value. According to experience gained in the current study, the final cell number and the thickness of agarose gel added to the slides are very

critical points in comet assay application of sperm cells. These two factors are directly responsible for the clear visualizing of DNA fragments to be scored in the fluorescent microscope.

It is obvious that DNA damage as a cryoinjury can be detected by different comet assay procedures. Also, both sperm samples treated by H_2O_2 and cryopreserved have shown different resistance behaviors at cell level in terms of DNA damages. The relationships between DNA damages and fertility, and also hatching ratios and malfunctions in offspring should be investigated in the further studies. Recently, with the popularity of gene and sperm banking of animal species, cryopreservation and the detection of cryoinjuries like DNA have become more important. Especially, for this kind of banking, it should be clearly viewed that effects of the different DNA damage grades on next progeny.

Conclusions

Even though the advantages of usage of cryopreserved sperm in artificial insemination, detection of DNA damages in sperm could turn out to be a critical factor. In this study, three comet assay applications suggested by previously studies have been compared. All methods have been found successful in detection of undamaged and total damaged DNA but not in the recognition of the damage classes. Consequently, the comet assay method suggested by Singh *et al.* (1988) is useful than the methods suggested by Cabrita *et al.* (2005) and Shen & Ong, (2000) in terms of consuming less chemical agent and having a shorter application time.

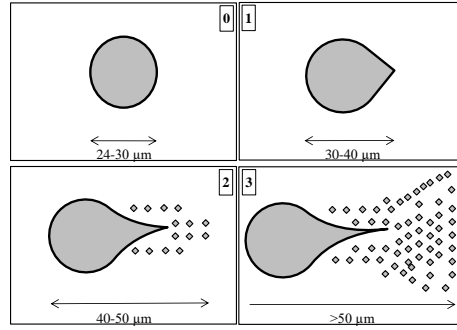


Figure 2. The figuration of comet images showing different levels of damage according to different-sized tails in visual scoring; score 0 (undamaged DNA); grade 1 (mild damaged DNA); grade 2 (moderate damaged DNA); grade 3 (severe damaged DNA).

Şekil 2. Farklı kuyruk uzunluklarına göre DNA hasar seviyelerinin görsel Comet görüntülerinin şematize edilmesi: 0; hasarlanmamış DNA, 1; az hasarlı DNA, 2; hasarlı DNA, 3; çok hasarlı DNA.

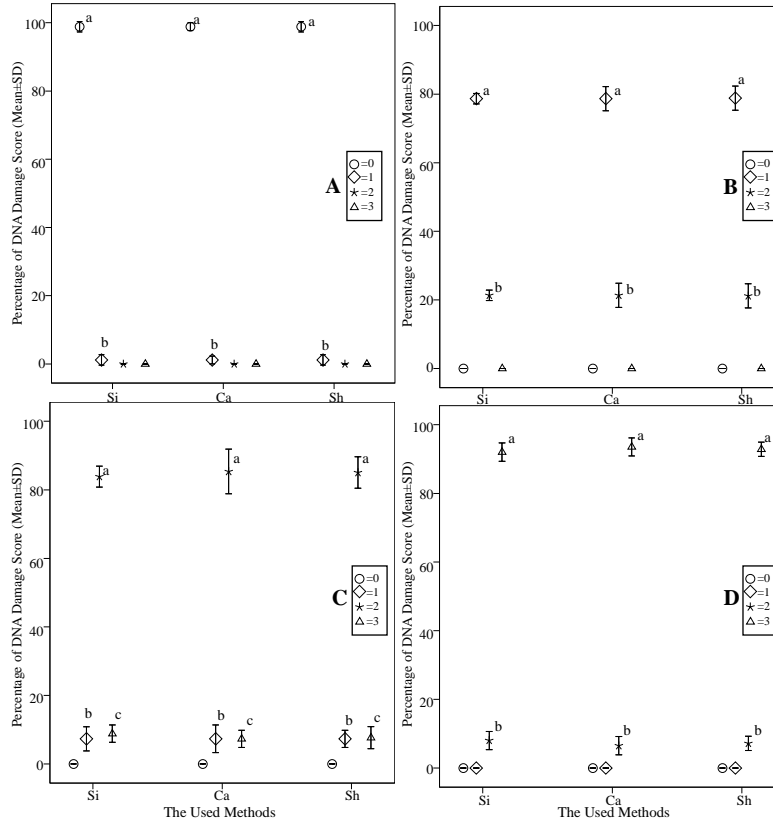


Figure 3. The classification of DNA damage scores (0; undamaged and various degrees of damage from minor to severe, 1, 2, and 3). To obtain this scale, the different concentrations of H₂O₂ added to lysis solution (A; lysis solution with H₂O₂ free, B; lysis solution with 12 μM H₂O₂, C; lysis solution with 25 μM H₂O₂, D; lysis solution with 50 μM H₂O₂) using different methods (Si; Singh et al., 1998; Ca; Cabrita et al., 2005; Sh; Shen & Ong, 2000). The letters show significance at $\alpha = 0.05$.

Şekil 3. DNA hasar derecelerinin sınıflandırılması (0; hasarlanmamış DNA, 1; az hasarlı DNA, 2; hasarlı DNA, 3; çok hasarlı DNA). Bu ölçeklendirme farklı metotların (hasarları (Si; Singh vd., 1998; Ca; Cabrita vd., 2005; Sh; Shen ve Ong, 2000)) lizis solüsyonlarına H₂O₂ eklenmeden (A), 12 μM H₂O₂ (B), 25 μM H₂O₂ (C) ve 50 μM H₂O₂ (D) eklenerek elde edilmiştir. Aynı harfler aralarında fark bulunmayan ($P > 0,05$) benzer grupları göstermektedir.

Table 2. The percentages of DNA damages of cryopreserved fish sperm obtained from different methods (Si; Singh et al., 1998; Ca; Cabrera et al., 2005; Sh; Shen & Ong, 2000). Grade 1; mild undamaged DNA, Grade 2; moderate undamaged DNA, Grade 3; severe undamaged DNA. The same letter shows no significance at the 5% level.

Tablo 2. Farklı metotlar kullanılarak elde edilen kriyoprezervasyon uygulanmış balık sperm hücrelerinde yüzde DNA hasarları (Si; Singh vd., 1998; Ca; Cabrera vd., 2005; Sh; Shen ve Ong, 2000). 0; hasarlanmamış DNA, 1; az hasarlı DNA, 2; hasarlı DNA, 3; çok hasarlı DNA. Sütunlardaki aynı harfler aralarında fark bulunmayan ($P>0,05$) benzer grupları göstermektedir.

Methods	Total damaged				
	undamaged DNA	DNA	Grade 1	Grade 2	Grade 3
Si	67.67±2.0 ^a	32.3±2.0 ^a	15.0±2.0 ^a	13.0±1.8 ^a	4.3±2.5 ^a
Ca	69.33±1.8 ^a	30.7±1.8 ^a	7.8±1.8 ^b	11.8±2.4 ^a	11.0±1.0 ^b
Sh	68.17±2.8 ^a	31.8±2.8 ^a	4.3±1.3 ^b	12.2±1.3 ^a	15.3±0.3 ^c

References

- Barbas, J.P. & Mascarenhas, R.D. (2009).** Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* **10**(1), 49-62.
- Baumber, J.B., Barry A., Jennifer, J., Stuart A. (2003).** Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa. *J Androl* **24**(4), 621-628.
- Cabrera, E., Alvarez, R., Anel, L., Rana, K.J., Herráez, M.P. (1998).** Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm, *Cryobiology* **37**, 245-253.
- Cabrera, E., Robles, V., Rebordinos, L., Sarasquete, C., Herráez, M.P. (2005).** Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* **50**, 144-153.
- Chao, N. & Liao, I.C. (2001).** Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture* **197**, 161-189.
- Chao, N.H., Chao, W.C., Liu, K.C., Liao, I.C. (1987).** The properties of tilapia sperm and its cryopreservation, *J Fish Biol* **30**, 107-118.
- Diwan, A.D., Ayyappan, S., Lal, K.K., Lakra, W.S. (2010).** Cryopreservation of fish gametes and embryos. *Indian Journal of Animal Sciences* **80**(4), 109-124.
- Fraser, L. & Strzeżek, J. (2005).** Effects of Freezing-Thawing on DNA Integrity of Boar Spermatozoa Assessed by the Neutral Comet Assay. *Reprod Domest Anim* **40**, 530-536.
- Hughes, C.M., Lewis, S.E.M., McKelvey-Martin, V.J., Thompson, W. (1997).** Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay, *Mutat. Res.* **374**, 261-268.
- Kopeika, J., Kopeika, E., Zhang, T., Rawson, D.M., Holt, W.V. (2003).** Detrimental effects of cryopreservation of loach (*Misgurnus fossilis*) sperm on subsequent embryo development are reversed by incubating fertilised eggs in caffeine, *Cryobiology* **46**, 43-52.
- Magyary, I., Urbanyi, B., Horvath, L., (1996).** Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm II. Optimal conditions for fertilization. *J Appl Ichthyol* **12**, 117-119.
- Nossoni F. (2008).** Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay): Methodology, Potential Applications, and Limitations in Cancer Research. *MMG 445 Basic Biotechnology eJournal* **4**, 30-35.
- Öğretmen, F., Inanan, B.E. (2014).** Effect of butylated hydroxytoluene (BHT) on the cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **151**, 269-274.
- Ostling, O. & Johanson, K.J. (1984).** Microelectrophoretic study on radiation-induced DNA migration from individual cells. *Biochem Biophys Res Commun* **123**, 291-298.

- Peris, S. I., Morrier, A., Dufour, M., Janice, L. (2004).** Bailey Cryopreservation of Ram Semen Facilitates Sperm DNA Damage: Relationship Between Sperm Andrological Parameters and the Sperm Chromatin Structure Assay. *J Androl* **25**(2), 224-233.
- Shen, H.M. & Ong, C.(2000).** Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* **15**, 529-536.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988).** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* **175**(1), 184-191.
- Suquet, M., Dreanno, C., Petton, B., Normant, Y., Omnes, M.H., Billard, R. (1998).** Long term effects of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. *Aquat. Living Resour* **11**, 45-48.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C, Sasaki, Y.F.(2008).** Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* **35**, 206-221.
- Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Storelli, C., Vilella, S. (2003).** Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology* **47**,227-235.

***Giardia Duodenalis* ile İnfekte Buzağlarda Doğal Kist Saçılımı**

Natural Cyst Shedding in Calves Infected with *Giardia Duodenalis*

Özet

Bu çalışma saha koşullarında Aydın yöresindeki farklı ilçelerde ishaller ve *Giardia duodenalis* ile doğal enfekte 9 buzağında gerçekleştirildi. İmmunokromotografik hızlı diagnostik test kitleri ile *G. duodenalis* antijenleri belirlenen olgular Nested PZR analizine tabi tutularak tanı kesinleştirildi. Gram dışkıda kist sayımları (Macmaster metodu) sonrası 0., 3., 7. ve 10. günlerde kist sayımlarının geometrik ortalama sırasıyla 18412.60; 10504.26; 17675.21 ve 10767.17 adet olduğu belirlendi. Kist açılımı ele alındığında başlangıç değerlerine (0. gün) göre 3., 7. ve 10 günlerde istatistiksel önemi bulunmayan bir azalmanın gerçekleştiği; 7. günde 3. ve 10. günlere kıyasla istatistiksel anlamı bulunmayan bir artışın gözlemlendiği dikkati çekti. Nested PZR analizinde tüm dışkı örneklerinin pozitif olduğu tespit edildi. Yazarların bilgisine göre Ege Bölgesindeki *G. duodenalis* ile doğal enfekte buzağlarda PZR eşliğinde gerçekleştirilen bu çalışmada, doğal kist saçılımının tespit edilmesiyle ileride gerçekleştirilecek parazitolojik, klinik ve moleküler çalışmalara yön verebileceği düşünüldü. İlaveten anılan çalışmanın bölge enfeksiyon haritasına değerli katkı sağlayacağı kanaatine varıldı. Ülkemizde önemli ekonomik kayıplara neden olan buzağı ishalleri içerisinde *G. duodenalis*' in unutulmuş etiyolojik etkenler arasında yer aldığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar Kelimeler: *G. duodenalis*, buzağı, Nested PZR

Abstract

The present study was carried out on field conditions, involving 9 diarrhetic calves naturally infected with *Giardia duodenalis* in different districts of Aydın region. Precise diagnosis has confirmed by Nested PCR analysis of cases, to these of which in immunochromatographic rapid diagnostic test kits revealed *G. duodenalis* antigens as regarding cyst excretion. Following cysts count in gram stool (Macmaster method), the geometric means on days 0., 3., 7. ve 10. were determined 18412.60; 10504.26; 17675.21 ve 10767.17 respectively. Initial values (day 0) compared with the 3rd, 7th days revealed in significant reduction, besides on day 7, in comparison to 3rd and 10th days, insignificant increase. All fecal samples were deemed positive with Nested PZR analysis. According to present authors knowledge this study carried out in calves infected with *G. duodenalis* via PCR, determination of natural cyst shedding may provide future directions for arasitological, clinical and molecular studies. And also it was concluded that the latter study may provide valuable contribution to the regional infection map. It must also be taken into account *G. duodenalis* as a forgotten etiological agent, involved in calf diarrhea causing economical loss in our country.

Key words: *G. duodenalis*, calf, Nested PZR

Adnan AYAN^A
Kerem URAL^B
Nuran AYSUL^A
Mehmet GÜLTEKİN^B
Hasan ERDOĞAN^B
Canberk BALIKÇI^B
Songül TOPLU^{B*}
Gökтуğ TOROS^B

^aAdnan Menderes Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Ana Bilim Dalı,
Aydın

^bAdnan Menderes Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi İç
Hastalıkları, Ana Bilim Dalı,
Aydın

Sorumlu yazar

Songül TOPLU

Adnan Menderes Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi, İç
Hastalıkları Anabilim Dalı

PK:17 09016 Işıklı/Aydın -
TÜRKİYE

songul.toplu@adu.edu.tr

Copyright © 2016 JAVST

Giriş

Giardia duodenalis' in zoonotik özelliğinin yanında gelişme geriliği ve yemden yararlanma oranını azaltarak ve ishale sebep olarak ekonomik kayıplara neden olması, çiftlik hayvanlarındaki giardiazise ilişkin farkındalığın günümüzde daha da artmasına sebep olmaktadır (O'Handley vd., 2003). Bir gram dışkıda meydana gelen 10^6 kist saçılımı geniş ölçüde çevresel kontaminasyona tekabül etmekte ve bu durum insanlarda su ile yaygın bulaşmanın oluştuğu giardiazisi, çiftlik hayvanlarının rezervuar olması açısından bir adım daha öne çıkarmaktadır (Buret vd., 1990; O'Handley vd., 2000).

Giardia duodenalis dünyada yaygın olarak görülen, insan ve memeli hayvanlarda gastrointestinal enfeksiyona neden olan flagellalı paraziter bir etkindir (Feng ve Xiao, 2011). Dışkı ile dış ortama atılan kist formu +4 C⁰ 'de ve nemli ortamda 90 gün canlılığını koruyabilmektedir (Meyer ve Jarrol, 1980; Craun, 1990). Etkenin aynı türler ya da farklı konakçılar arasındaki bulaşması kist ile kontamine su, dışkı ya da gıdanın alınmasıyla gerçekleşebilmektedir (Rendtorff, 1978; Mark-Carew vd., 2010).

Genç buzağılarda giardiazisle enfeksiyon yaygın görülmekle birlikte (O'Handley vd., 2000; O'Handley ve Olson, 2006; Winkworth vd., 2008; Thoma vd., 2010), prevalansı iklim, bağışıklık durumu ve yönetim gibi etkenlere bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Ralston vd., 2003; O'Handley ve Olson, 2006; Tiranti vd., 2011; Gillhuber vd., 2014). Giardiaziste gözlemlenen ishalin ortaya çıkışı bahsedilen faktörlerle ilişkilendirilebildiği gibi subklinik olarak seyreden enfeksiyonlarda ortaya çıkmayabilmektedir (Ruest vd., 1997; O'Handley vd., 2001; Geurden vd., 2006).

Yapılan birkaç çalışmada Giardia ile doğal enfeksiyonun daha çok neonatal periyodun sonunda

şekillendiği ve sıklıkla da kronik formda ishal bulguları göstermeksizin seyrettiği belirtilmektedir (O'Handley ve Olson, 2006). Bunun yanı sıra süttten kesilen buzağılarda süt emme dönemine göre daha yaygın seyrettiğini belirten çalışmalarda mevcuttur (Trout vd., 2005). Buzağılarda 4 günlük yaşta dışkıda kist saçılımı görülebilmeye (Geurden vd., 2009) rağmen klinik bulguların 1 aylık yaştan büyüklerde ortaya çıktığı bildirilmektedir (O'Handley vd., 1999; Huetink vd., 2001; Trout vd., 2004; Geurden vd., 2006). Dışkıda en fazla kist saçılımının 4-12 haftalık yaşta (gram dışkıda 10^5 - 10^6 kist) meydana geldiği belirtilmektedir (O'Handley vd., 1999; Ralston vd., 2003). Ayrıca konaktan kist atılımı aralıklı olarak gerçekleşmektedir (Buret vd., 1990; Adam, 2001; DuBois vd., 2008; Xiao ve Fayer, 2008).

Bu çalışma ile Ege Bölgesindeki Nested PZR ile tanısı doğrulanan *G. duodenalis* ile doğal infekte buzağılarda, doğal kist saçılımının tespit edilmesiyle ileride gerçekleştirilecek parazitolojik, klinik ve moleküler çalışmalara yön verebilmesi amaçlandı. İlâveten anılan çalışmanın bölge enfeksiyon haritasına değerli katkı sağlayacağı kanaatine varıldı. Ülkemizde önemli ekonomik kayıplara neden olan buzağı ishalleri içerisinde *G. duodenalis* 'in unutulmuş etiyolojik etkenler arasında yer aldığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Materyal-Metot

Araştırmanın materyalini Aydın ili çeşitli yerleşim alanlarında yer alan sütçü sığır işletmelerine bağlı ishal ve benzeri gastrointestinal şikayetleri bulunan 5'i erkek ve 4'ü dişi olmak üzere yaşları 20 gün ila 2,5 ay arasında değişiklik gösteren ve biri Simental geri kalını Holstein ırkı olan 9 buzağıdan oluşturuldu.

Diğer enfeksiyöz ishal ajanlarının eliminasyonu amacıyla hasta başında hızlı test kitlerinden (Anigen

Rapid Bovid-5 Ag Test Kiti, Bionote Lab) yararlanıldı. Giardia pozitif bulunan buzağıkların dışkıları toplanarak çinko sülfat flotasyon ya da Giemsa boyama yöntemi ile mikroskop altında etkene yönelik inceleme yapıldı. Çalışmanın başlangıcında kullanılan hızlı tanı test kitleriyle *G. duodenalis*' in vejetatif evreleri ve kistlerine yönelik antijenik tespit immunokromatografik olarak belirlendi. Mikroskopik muayeneler ve hızlı tanı test kitleriyle giardiazis belirlenen 9 örnekte QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany) ile protokole uygun olarak DNA ekstraksiyon metodu uygulandı. Daha sonra Cacciò ve ark (2002) tarafından tanımlanan G7 F5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC-3 forward ve G759R 5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3 reverse primerleri kullanılarak 753 bp büyüklüğündeki β -giardin gen bölgesinin PZR ile amplifikasyonu yapıldı. Aynı PZR ürünleri BG1F 5'-GAACGAGATCGAGGTCCG-3' forward ve BG2R 5'-CTCGACGAGTTCGTGTT-3 reverse²⁷ primerleri ile tekrar PZR amplifikasyonu gerçekleştirildi (Şekil 1.). Bu işlemlerin ardından PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde 90 volt doğrusal akımda 1 saat koşuruldu. Bu işlemin ardından jel görüntüleme cihazında *G. duodenalis*' in 511 bp büyüklüğündeki bant görüntüleri elde edilerek tanı kesinleştirildi.

Giardiazis ile enfekte buzağıklardaki kist saçılımları 0., 3., 7. ve 10. günlerde toplanan dışkı örneklerin uygun metod ile mikroskop altında kist sayımının yapılmasıyla gerçekleştirildi.

Kist sayımları sonucunda elde edilen sayısal değerler geometrik ortalamalar baz alınarak tanımlayıcı istatistikleri gerçekleştirildi. Ookist sayılarının günler arası farklılıklarının karşılaştırılmasında Wilcoxon testi kullanıldı. İstatistiksel analizler SPSS 15.0 paket programı ile gerçekleştirilerek $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

Tanı konulan olgulara çalışma süresince herhangi bir sağıltım uygulamasında bulunulmadı. Ancak çalışma tamamlanır tamamlanmaz tüm buzağıklara anti-giardial amaçla 30 mg/kg seknidazol (Flagentyl tablet, Eczacıbaşı) tek dozda oral yolla uygulandı.

Bulgular

Yapılan klinik muayene ile çalışmaya dahil edilen buzağıkların tümünde ishal bulguları gözlemlenirken bir tanesinde emme refleksinin zayıf olduğu belirlendi. Üç olguda 3. günde ishal bulguları ortadan kalkmasına rağmen dışkıyla kist saçılımının devam ettiği yapılan mikroskopik incelemelerle ortaya çıkarıldı.

Trofozoit ve kistlerin belirlenmesi amacıyla 0., 3., 7., ve 10. günlerde gerçekleştirilen natif muayene ile bütün buzağıklarda dışkıda kist saptandı. Yapılan örneklemelerin hiçbirinde trofozoit formu belirlenemedi. Natif dışkı bakışının yanı sıra yapılan çinko sülfat flotasyon (1.18 dansite) yönteminde de tüm buzağıklardaki kist varlığı doğrulandı. Tanıyı desteklemek ve kuvvetlendirmek amacıyla 0. günde hızlı tanı test kitleriyle etkene yönelik antijen varlığı belirlendi. Gram dışkıda kist sayımları (Macmaster metodu) sonrası 0., 3., 7. ve 10. günlerde kist sayımlarının geometrik ortalama sırasıyla 18412.60; 10504.26; 17675.21 ve 10767.17 adet olduğu belirlendi. Kist açılımı ele alındığında başlangıç değerlerine (0. gün) göre 3., 7. ve 10. günlerde istatistiksel önemi bulunmayan bir azalmanın gerçekleştiği; 7. günde 3. ve 10. günlere kıyasla istatistiksel anlamı bulunmayan bir artışın gözlemlendiği dikkati çekti. İlgili bulgular tablo 1'de gösterildi. Çalışma süresince kist saçılımının devam ettiği, 3 buzağıda 0. güne kıyasla kist atılım sayısında artış şekillenmesine rağmen 6 buzağıda azalma belirlendi. Kist atılım sayısının arttığı gözlemlenen 3 buzağıda 7. ve 10. günde de kist atılımının başlangıç gününe göre fazla olduğu tespit

edildi. Çalışmanın son gününde 5 olguda diğerlerine göre yüksek kist atılımı belirlendi. Diğer taraftan Nested PZR analizinde tüm dışkı örneklerinin pozitif olduğu tespit edildi. İlgili bulgular şekil 1’de sunuldu.

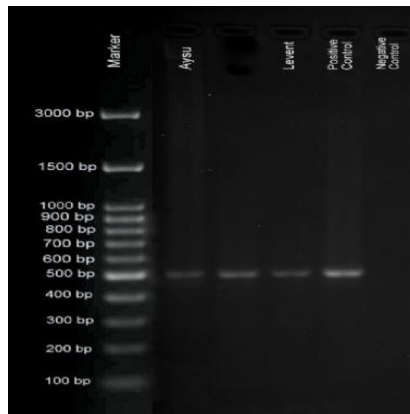
Tartışma

Kronik formda ve neonatal dönemin sonunda karşılaşıldığı belirtilen giardiazis olgularının (O’Handley ve Olson, 2006) süttten kesilen buzağılarda da yaygın seyrettiği (Trout vd., 2005) ve kist saçılımının 4 günlük yaşta başlamasına (Geurden vd., 2009) rağmen en fazla şekillendiği dönemin 4-12 haftalık yaş aralığı olduğu ifade edilmektedir. (O’Handley vd., 1999; Huetink vd., 2001; Trout vd., 2004; Geurden vd., 2006). Bu araştırmada yukarıda bahsi geçen çalışmalar ile örtüşür şekilde 20 günlük bir buzağıda çalışma süresince kist atılımı gözlemlenmekle beraber süttten kesilen buzağılarda da enfeksiyon varlığına rastlanmış ancak yaşlara göre prevalansının değerlendirilmesi yapılacak kadar örnek çalışmaya dahil edilememiştir. Ayrıca günlere göre kist saçılımı farklılık göstermektedir.

Dışkı ile dış ortama atılan kist formu +4 C⁰ ‘de ve nemli ortamda 90 gün canlılığını koruyabilmektedir

(Meyer 1980; Craun, 1990). Aydın ili ve civarı etkenin dış ortamda korunmasına yönelik çevresel şartları sağlayan bir ilimizdir. Bununla birlikte Aydın ilinde insanlarda zoonotik assemblajlara yönelik çalışmalarda mevcuttur (Yazıcı vd., 2007; Karadam vd., 2008; Ertuğ vd., 2016). Bu sebeple çiftlik hayvanlarında belirlenen suşların (assemblajların) moleküler karakterizasyonu farklı çiftliklerde zoonotik potansiyelin ortaya konulmasını, böylelikle bölge enfeksiyon haritasının netleştirilerek gerekli önlemlerin alınmasını sağlayacaktır.

Bu çalışma *G. duodenalis* ile doğal infekte 9 buzağıda gerçekleştirildi. İmmünokromotografik hızlı diagnostik test kitleri ile Giardia duodenalis antijenleri belirlenen olgularda, gram dışkıda kist sayımları gerçekleştirildi. Gram dışkıda kist sayımları sonrası 0., 3., 7. ve 10. günlerde kist sayımlarının geometrik ortalama sırasıyla 18412.60; 10504.26; 17675.21 ve 10767.17 adet olduğu belirlendi (Tablo 1A, Tablo 1B). Elde edilen bu verilerin, özellikle sonradan gerçekleştirilecek deneysel ya da sağaltım çalışmalarına baz oluşturacağı, muhtemelen kist atılımındaki farklılaşmanın sağaltım protokollerinin de değişimine sebep olabileceği söylenebilir.



ŞEKİL 1: *Giardia duodenalis* ile doğal infekte buzağılarda Nested PZR analiz sonuçlarına ait agaroz jel görüntüsü.
FIGURE 1: Related to results of Nested PCR analysis in natural infected calves with *Giardia Duodenalis*.

TABLO 1A: Gram dışkıda kist sayılarının günlere göre dağılımı

TABLE 1A: Daily distribution of cysts count in gram stool

Kontrol grubu	0. gün	3. gün	7. gün	10. gün
G1 (2 aylık erkek)	20000	8000	4000	8000
G2 (2,5 aylık erkek)	8000	20000	32000	16000
G3 (2 aylık dişi)	12000	28000	10000	24000
G4 (2 aylık dişi)	16000	12000	8000	12000
G5 (20 günlük erkek)	8000	256000	80000	56000
G6 (2 aylık erkek)	48000	12000	16000	96000
G7 (2,5 aylık dişi)	8000	4000	48000	4000
G8 (2 aylık erkek)	36000	8000	4000	6000
G9 (1,5 aylık dişi)	20000	4000	4000	140000

TABLO 1B: 0., 3., 7. ve 10. günlerde *G. duodenalis* kist saçılımıTABLE 1B: *G. duodenalis* cysts excretion in 0., 3., 7. and 10. days

Kist saçılımı	
0. gün (X _G)	15979,93
(min-maks)	8000-48000
3. gün (X _G)	14035,64
(min-maks)	4000-256000
7. gün (X _G)	12924,98
(min-maks)	4000-80000
10. gün (X _G)	20592,60
(min-maks)	140000-4000

Kaynaklar

Adam RD (2001): Biology of *Giardia lamblia*. Clinical Microbiology Reviews. J Virol 14(3): 447-475.

Buret A, Wallis PM, Befus D, Olson ME (1990): Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. J Infect 162(1): 231-237.

Craun GF (1990): Waterborne giardiasis. In: Meyer EA. (ed), Giardiasis. 1st ed. New York, Elsevier Science Publishing, 358-362.

DuBois KN, Abodeely M, Sakanari J, Lee M, McKerrow JH, Sajid M (2008): Identification of the major cysteine protease of giardia and its role in encystation. J Biol Chem 283(26): 18024-18031.

Ertuğ S, Ertabaklar H, Özlem ÇS, Malatyali E, Bozdoğan B (2016): Genotyping of *Giardia intestinalis* strains isolated from humans in Aydın, Turkey. Mikrobiyol Bul 50(1): 152.

Feng Y, Xiao L (2011): Zoonotic potential and molecular epidemiology of giardia species and giardiasis. Clin Microbiol Rev 24(1): 110-140.

Geurden T, Levecke B, Caccio SM, Visser A, De Groot G, Casaert S, Claerebout E (2009): Multilocus genotyping of Cryptosporidium and Giardia in non-outbreak related cases of diarrhoea in human patients in Belgium. Parasitol 136(10): 1161-1168.

Geurden T, Vercruyse J, Claerebout E (2006): Field testing of a fenbendazole treatment combined with hygienic and management measures against a natural giardia infection in calves. Vet Parasitol 142(3): 367-371.

Gillhuber J, Rügamer D, Pfister K, Scheuerle MC (2014): Giardiasis and other enteropathogenic infections: a study on diarrhoeic calves in Southern Germany. BMC Res Notes 7(1): 112.

Huetink REC, Van der Giessen JWB, Noordhuizen JPTM, Ploeger HW (2001): Epidemiology of

- Cryptosporidium spp.* and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Vet Parasitol* 102(1): 53-67.
- Karadam SY, Ertabaklar H, Ertuğ S (2008):** Aydın'da üç farklı kreş ve anasımındaki çocuklarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 32: 257-60.
- Lalle M, Jimenez-Cardosa E, Cacciò SM, Pozio E (2005):** Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a β -giardin nested polymerase chain reaction assay. *J Parasitol* 91(1): 203-205.
- Mark-Carew MP, Khan Y, Wade SE, Schaaf S, Mohammed HO (2010):** Incidence of and risks associated with *Giardia* infections in herds on dairy farms in the New York City Watershed. *Acta Vet Scand* 52: 44.
- Meyer EA, Jarrol EL (1980):** *Giardia* and giardiasis. *Am J Epidemiol* 111: 1-12.
- O'Handley R, Cockwill C, McAllister TA, Jelinski M, Moreck DW, Olson ME (1999):** Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhoea. *J Am Vet Med Assoc* 214: 391-396.
- O'Handley RM, Buret AG, McAllister TA, Jelinski M, Olson ME (2001):** Giardiasis in dairy calves: effects of fenbendazole treatment on intestinal structure and function. *Int J Parasitol* 31(1): 73-79.
- O'Handley RM, Ceri H, Anette C, Olson ME (2003):** Passive immunity and serological immune response in dairy calves associated with natural *Giardia duodenalis* infections. *Vet Parasitol* 113(2): 89-98.
- O'Handley RM, Olson ME (2006):** Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. *Clin North Am Small Anim Pract* 22: 623-643.
- O'Handley RM, Olson ME, Fraser D, Adams P, Thompson RC (2000):** Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. *Vet Parasitol* 90: 193-200.
- Ralston BJ, McAllister TA, Olson ME (2003):** Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. *Vet Parasitol* 114: 113-122.
- Rendtorff RC (1978):** The experimental transmission of *Giardia lamblia* among volunteer subjects. In: *Jacobowski W, Hoff JC. (ed's), Waterborne transmission of giardiasis. Washington, Environmental Protection Agency, 64-81.*
- Ruest N, Couture Y, Faubert G, Girard C (1997):** Morphological changes in the jejunum of calves naturally infected with *Giardia spp.* and *Cryptosporidium spp.* *Vet Parasitol* 69(3): 177-186.
- Thomas G, Vercruyse J, Claerebout E (2010):** Is giardia a significant pathogen in production animals?. *Exp Parasitol* 124(1): 98-106.
- Tiranti K, Larriestra A, Vissio C, Picco N, Alustiza F, Degioanni A, Vivas A (2011):** Prevalence of *Cryptosporidium spp.* and *Giardia spp.* spatial clustering and patterns of shedding in dairy calves from Córdoba, Argentina. *Rev Bras Parasitol Vet* 20(2), 140-147.
- Trout JM, Santín M, Greiner E, Fayer R (2004):** Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. *Vet Parasitol* 124(3): 179-186.
- Trout JM, Santín M, Greiner E, Fayer R (2005):** Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in post-weaned dairy calves. *Vet Parasitol* 130(3): 177-183.
- Winkworth CL, Matthaei CD, Townsend CR (2008):** Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium spp.* in calves from a region in New Zealand experiencing intensification of dairying. *New Zeal Vet J* 56: 15-20.
- Xiao L, Fayer R (2008):** Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol* 38(11): 1239-1255.
- Yazıcı V, Sırken F, Ertabaklar H, Ertuğ S (2007):** Aydın il merkezindeki hastanelerde çalışan mutfak personelinde bağırsak parazitlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 31(2): 136-138.

Nutrition and Gender Effect on Body Composition of Rainbow Trout

(Oncorhynchus mykiss)

Beslenmenin ve Cinsiyetin Gökkuşığı Alabalığının (*Oncorhynchus Mykiss*) Vücut İçeriği Üzerine Etkisi

Abstract

In this study, body composition was compared between farmed female, farmed male, wild female and wild male rainbow trout; the latter escaped from farms to nature and fed natural food. The total crude protein, lipid, ash and moisture of fish meat were determined in analyses. It was found that there were big differences between body composition of cultured rainbow trout and wild rainbow trout and their male and female. While in cultured female trouts; crude protein, crude ash moisture and lipid ratios were found respectively as 19.41%, 1.78%, 73.62% and 3.73%; in cultured male trouts crude protein, crude ash moisture and lipid ratios were found respectively as 18.73%, 1.52%, 75.23% and 3.36% in wild female trouts; crude protein, crude ash moisture and lipid ratios were found respectively as 19.65%, 1.61%, 73.83% and 2.97% in wild male trouts; 19.11%, 1.39%, 75.09% and 2.53%.

In the result of this research; it was found that crude protein and lipid content of female rainbow trout were higher; but, moisture content was lower. In addition, it was determined that the body composition of rainbow trout varies according to sex, feed and habitat.

Keywords: Wild rainbow trout, Farmed rainbow trout, Body composition

Özet

Bu çalışmada çiftlikte yetiştirilen (erkek ve dişi) ve çiftliklerden doğaya kaçarak burada doğal besinlerle beslenen (erkek ve dişi) gökkuşığı alabalığının besin içerikleri karşılaştırılmıştır. Analizlerde balık etinin toplam ham protein, lipid, ham kül ve nem oranı belirlenmiştir. Çiftliklerde yetiştirilen gökkuşığı alabalıklarının ve doğal gökkuşığı alabalıklarının vücut kompozisyonu ile erkek ve dişilerin vücut kompozisyonları arasında farklılıklar olduğu bulunmuştur. Kültürel ortamda yetişen dişilerde ham protein, ham kül, nem ve lipid miktarı sırasıyla, %9.41, %1.78, %73.62 ve %3.73 kültür erkeklerde ise %18.73, %1.52, %75.23 ve %3.36, doğadan avlanan dişilerde; %19.65, %1.61, %73.83 ve 2.97% erkeklerde ise %19.11, %1.39, %75.09 ve %2.53 bulunmuştur.

Bu araştırmanın sonucunda; Dişi gökkuşığı alabalıklarının ham protein ve lipid içeriğinin daha yüksek olduğu; Ancak, nem içeriği daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, gökkuşığı alabalıklarının vücut kompozisyonunun cinsiyete, beslenmesine ve yaşama ortamına göre değiştiği tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Doğal gökkuşığı alabalığı, Kültür gökkuşığı alabalığı, Vücut içeriği

Mustafa ÖZ

*Department of Fisheries and
Diseases Faculty of Veterinary
Medicine, Aksaray University,
Aksaray, Turkey*

Corresponding author

Dr. Mustafa ÖZ

*Department. of Fisheries and
Diseases Faculty of Veterinary
Medicine, Aksaray University,
Aksaray, Turkey*

Tel: (90) 541 459 8027

Fax: (90) 382 288 29 48

E-mail:

ozmustafa@aksaray.edu.tr

Copyright © 2016 JAVST

Introduction

Rainbow trout is native to the Pacific drainages of North America, ranging from Alaska to Mexico. Since 1874 it has been introduced to waters on all continents except Antarctica, for recreational angling and aquaculture purposes. Production greatly expanding in the 1950s as pelleted feeds were developed. Trout fisheries are maintained, or culture practised, in the upland catchments of many tropical and sub-tropical countries of Asia, East Africa and South America (FAO, 2016). The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) has been cultured since the early 1970s and Turkey has become one of the top trout producing countries in Europe with an annual production. On the other hand, it is also widely used as a farmed fish in many countries because of its rapid growth and high value as a food. It is economically important in the U.S.A., Japan, Europe, the Russian Federation and Canada (Yasmin et al. 2004).

Rainbow trout, part of the Salmonidae family (*Oncorhynchus mykiss*), is a commercially significant species consumed widely in Europe (Çaklı et al., 2006). It is a species of fish with an exceptionally fast growth rate and high nutritional value, leading to widespread cultivation in a variety of countries.

Due to the rich nutritional content, fish is an important food source in both developed and developing countries. Fish oils contain essential fatty acids and poly unsaturated fatty acids (PUFA), which are important for human health. This is an increasing demand from consumers for healthy, high quality, natural and fresh fish products.

The composition of the diet determines, to a large extent, the fat content of fish. The higher the ratio between the metabolizable energy and protein in the

diets, the higher the fat content in the tissue. Whole-body composition was also affected by season, water temperature and sexual maturation (Hepher, 1988).

Rainbow trout is one of the most commonly raised species in Turkey and around the world. Moreover, Turkey is one of the foremost trout producers of Europe. Rainbow trouts are being raised at almost every region of Turkey (Öz, 2016). Natural populations of trout which escape from farms to nature occur in these regions, It is important to investigate differences in proximate composition between wild and farmed fish due to variations in feeding conditions.

Thus, the aim of the study was to investigate compare body composition of male and female rainbow trout living under natural and cultural conditions.

Materials and Methods

Fish and sampling

Wild *Oncorhynchus mykiss* (male and female), which escaped from fish farms to nature were caught from Körkün Brook, which is a mountain brook at 1300 meters in Pozanti, Adana, Turkey, on June 2015. Farmed male and female *Oncorhynchus mykiss* were obtained from a local fish farm (Oz Alabalik fish breeding facility) that is built near Körkün Brook and uses waters of this brook. The oxygen content of the water was 10.89 ± 0.28 mg/L with a pH value of 8.2 ± 0.38 and temperature of 13 ± 0.40 °C. Forty wild (20 male- 20 female) and Forty (20 male- 20 female) farmed fish (average weight 350 g) were used for proximate analyses. Triplicate samples for each fish were analyzed for body composition and fatty acid profile. During the study, commercial trout

feed obtained from a private company (Abalioglu, Denizli, Turkey) was used. The nutritional values of the trout feed used in this study as follows: Crude protein (42.00%), Lipid (22.00%), Crude cellulose (3.00%), Moisture (10.00%), Crude ash (12.00%) and Total energy (4350 kcal/kg).

Proximate analysis

The fish samples were analyzed in triplicate for proximate composition: lipid content of rainbow trout by the Bligh & Dyer (1959) method, moisture and the ash content of fish by AOAC (1990) method, total crude protein by Kjeldhal method (AOAC, 1984).

Results and Discussion

Table 1 show the ratio of body composition of farmed female, male rainbow trout and wild female and male rainbow trout, respectively. Cultured female trouts; crude protein, crude ash moisture and lipid ratios were found respectively as 19.41%, 1.78%, 73.62% and 3.73%; in cultured male trouts crude protein, crude ash moisture and lipid ratios were found respectively as 18.73%, 1.52%, 75.23% and 3.36% in wild female trouts; crude protein, crude ash moisture and lipid ratios were found respectively as 19.65%, 1.61%, 73.83% and 2.97% in wild male trouts; 19.11%, 1.39%, 75.09% and 2.53%.

The differences in the body compositions of wild and farmed rainbow trout were in significant ($p < 0.05$). The comparison of body composition of each group was given in Fig. 1. Korkmaz and Kırkagaç (2008) also reported the ratio of the crude protein, lipid, ash and moisture of rainbow trout as 20.33%, 4.1%, 1.22% and 74.18%, respectively. In the current study, slightly lower protein level for farmed trout was

found. The body compositions of rainbow trout and other species vary depending on their genotypic features and habitats. Moreover, the nutritional habits and diet influence these differences (Kiris & Dikel, 2002; Uysal, Caklı, & Celik, 2002; Sener & Yildiz, 2003; Yildiz, Sener, & Timur, 2006).

In the present study, the protein content of female rainbow trouts were found higher than male fish in both cultural and wild groups. Regarding rainbow trout, Tokur et al. (2006) reported the protein value as 22.96% and the lipid content as 2.71%. Furthermore, it has been reported that the nutritional values vary according to the feeding regime, feed composition, living area, harvest season, sex, size and environmental factor (Weatherup & McCracken, 1999; Rasmussen, 2001; Özden & Erkan, 2008).

In other studies made in the same area before, the crude protein rates of rainbow trout and *Salmo trutta macrostigma* were found as respectively 22.33 ± 0.31 , 19.92 ± 0.4 (Öz and Dikel, 2015; Öz and Dikel, 2015).

Korkmaz and Kırkagaç (2008) reported raw protein, oil, raw cinder and moisture content of rainbow trout as 20.33%, 4.1%, 1.22% and 74.18%, respectively. Kus (2012) identified the protein, lipid, cinder and moisture values for rainbow trout as 19.94%, 6.45%, 1.21% and 72.26%, respectively. Dikel (1999) reported raw protein, lipid, raw cinder and dry matter content for freshwater rainbow trout as 19.11 ± 0.26 , 0.96 ± 0.01 , 1.60 ± 0.02 , and 21.67 ± 0.10 respectively, and the raw protein, lipid, raw cinder and dry matter content for saltwater rainbow trout as 18.46 ± 0.41 , 1.45 ± 0.017 , 1.58 ± 0.005 , 21.50 ± 0.21 , respectively. As a result of our study, rainbow trout fed with black cumin oil supplements have higher raw protein, raw cinder, lipid and

proportion of dry matter when compared to the results reported in the studies mentioned.

In our research, the moisture content of both natural and cultured rainbow trout were found higher. Alemu, *et al.*, reported, sex was found to have no significant ($P > 0.05$) influence in terms of the four proximate components (moisture, protein, fat and ash) measured in Nile Tilapia fillet collected from Lake Zeway (Alemu, *et al.*, 2013). Different researchers have

reported that, moisture content of male fish higher than female fish (Islam and Joadder, 2005; Cornelia, 2012; Bhavan *et al.*, 2010; Nargis, 2006). As similar to present study, the moisture content of male Gilthead bream fish is higher than female (Wassef and Shehata, 1991). The lower moisture content in female Nile Tilapia can be attributed to muscles of female fish contain more organic materials and less water than male (Amer *et al.*, 1991).

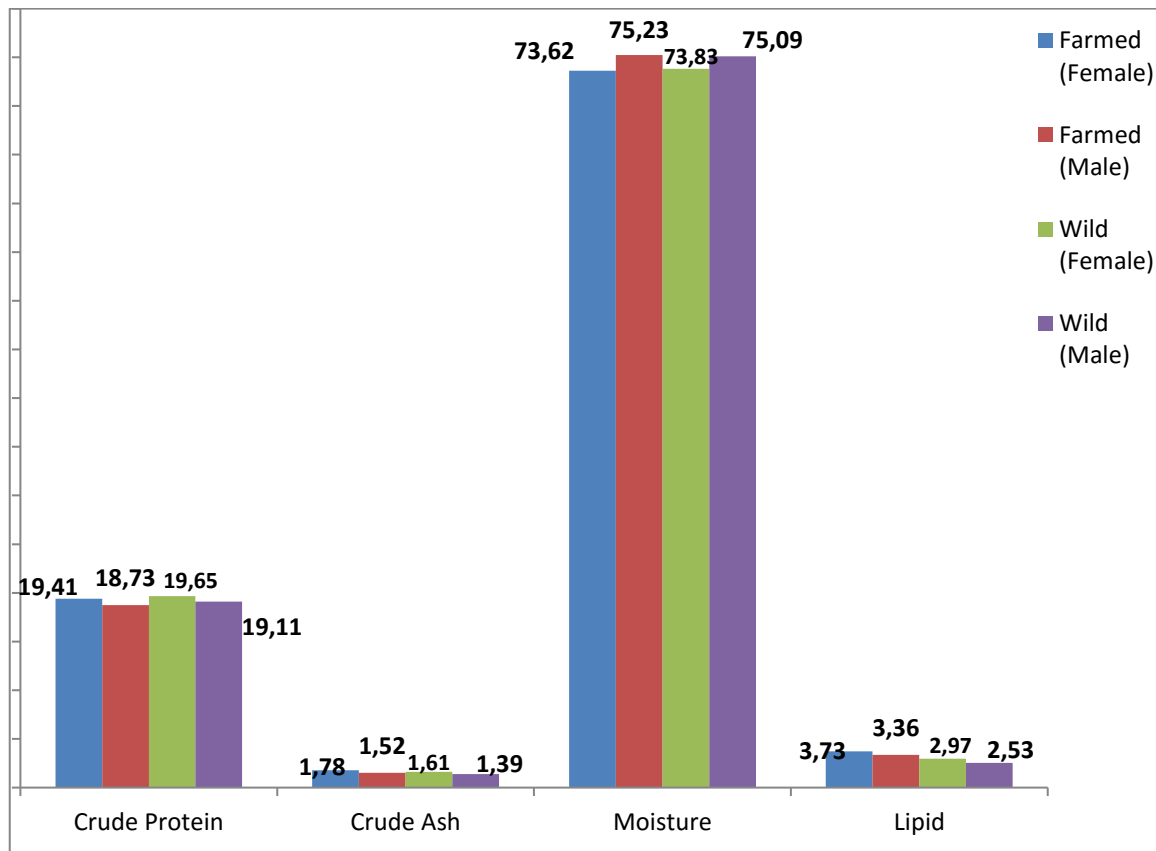


Figure 1. The comparison of body composition of wild and farmed rainbow trout.

Figür 1. Doğal ve kültür gökkuşağı alabalığının besin içeriklerinin karşılaştırılması

Table 1. The ratio of body composition of farmed female, male rainbow trout and wild female and male rainbow trout.
Tablo 1. Kültür dişi ve erkek gökkuşuğu alabalığı ile doğal erkek ve dişi gökkuşuğu alabalığının besin içeriklerinin karşılaştırılması

Body Composition	Farmed(Female)	Farmed(Male)	Wild(Female)	Wild(Male)
Crude Protein	19.41±0.20 ^a	18.73±0.12 ^b	19.65±0.22 ^a	19.11±0.08 ^b
Crude Ash	1.78±0.09 ^a	1.52±0.06 ^a	1.61±0.08 ^a	1.39±0.04 ^b
Moisture	73.62±0.14 ^b	75.23±0.28 ^a	73.83±0.36 ^b	75.09±0.41 ^a
Lipid	3.73±0.11 ^a	3.36±0.06 ^b	2.97±0.04 ^c	2.53±0.08 ^d

Each value indicates the average ± standard deviation (n=18*3). The averages expressed using different letters in each row are significantly different (p<0.05). n=18*3 for each group.

Kaynaklar

- Alemu, L. A., Melese, A. Y. & Gulelat, D. H., (2013). Effect of endogenous factors on proximate composition of Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus* L.) fillet from Lake Zeway. American Journal of Research Communication, 1(11): 405-410} www.usa-journals.com, ISSN: 2325-4076.
- Amer, H.A., Sedik, M.F., Khalafalla, F.A. and Awad, H.A. (1991). Results of chemical analysis of prawn muscle as influenced by sex variations. *Die Nahrung*. 35:133-138.
- AOAC, (1984) Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analysis Chemists. Association of Official Analytical Chemists, (14th ed.), Washington, DC
- AOAC, (1990) Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analysis
- Bhavan, P.S., Radhakrishnan, S., Seenivasan, C., shanthi, R., Poongodi, R. and Kannan, S. (2010). Proximate Composition and Profiles of Amino Acids and Fatty Acids in the Muscle of Adult Males and Females of Commercially Viable Prawn Species *Macrobrachium rosenbergii* Collected from Natural Culture Environments. *International Journal of Biology*.
- Bligh, E.C. & Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian J. Biochem. Physiol.*, 37:913-917.
- Cakli, S., Kilinc, B., Dincer, T. & Tolasa, S. (2006) Comparison of the shelf-lives of map and vacuum packaged hot smoked rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Eur. Food Res. Technol.* 224:19–26.
- Cornelia A.B. (2012). Investigation of the chemical composition and nutritional value of smoothhound shark (*Mustelus mustelus*) meat. Thesis presented in partial fulfillment of the requirements for the degree Master of Science in Food Science at the University of Stellenbosch. 2012.
- Dikel, S. (1999). Comparative analysis of carcass composition and nutritive contents of rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*) were produced in fresh and sea water. In Symposium of 10th National Sea Products, Adana/Turkey (pp. 97-111).
- FAO, (2005-2016). Cultured Aquatic Species Information Programme. *Oncorhynchus mykiss*. Cultured Aquatic Species Information Programme .Text by Cowx, I. G. In:FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 15 June 2005. [Cited 31 March 2016].
- Hepher, B. (1988). Nutrition of Pond Fishes. Cambridge University Press, Cambridge.
- Huss, H.H. (1988). Fresh Fish: Quality and Quality Changes. FAO 128p.
- Islam M.N. & M.A. Joadder. (2005) Seasonal variation of the proximate composition of freshwater Gobi, *Glossogobius giuris* (Hamilton) from the river padma. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 8(4): 532-536.
- Kiris G. A. & Dikel S. (2002). Comparison of growth performance and carcass composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) reared in fiberglass tanks and cages placed in a concrete pond. Ege University,

- Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 19, (3-4): 371–380.
- Korkmaz, A.Ş. & Kirkağaç, M. (2008) Fillet Yield, Body Composition and Energy Content of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Reared In Sea Net-Cages and Fresh Water Concrete Ponds , Ankara University, Faculty of Agriculture, Journal of Agricultural Sciences, 14 (4) 409-413.
- Nargis, A. (2006) Seasonal Variation in the Chemical Composition of Body Flesh of Koi Fish *Anabas testudineus* (Bloch) (Anabantidae: Perciformes). *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* 41:219-226.
- Öz, M. & Dikel, S. (2015). Body Compositions and Fatty Acid Profile of *Salmo Trutta Macrostigma* Caught from Korkun Brook. *Advances in Zoology and Botany*, 2015, 3.4: 190-192.
- Öz, M & Dikel, S. (2015). Comparison of Body Compositions and Fatty Acid Profiles of Farmed and Wild Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Science and Technology*, 3(4), 56-60.
- Öz, M. (2016). Türkiye Su Ürünleri Üretiminde Gökkuşluğu Alabalığının Yeri. 4th International Kop Local Development Symposium. October 21-23, 2016. Karaman – Turkey. Proceeding book. Page: 542-545.
- Sener E. & Yildiz M. (2003). Effect of the Different Oil on Growth Performance and Body Composition of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792) Juveniles. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 3: 111-116.
- Uysal I., Cakli Ş. & Celik U. (2002). Biochemical compositions of the Abant Trout (*Salmo trutta abanticus* T., 1954) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792) were fed with extruded pellet diet in culture conditions. *Ege University Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(3-4):447 – 454.
- Wassef, E.A. & Shehata, M.B. (1991). Biochemical composition of Gilthead bream *Sparus aurata* L. from Lake Bardawil (Egypt). *J.K.A.U.Mar. Sci.* 2:111-122.
- Yasmin, A., Takeuchi, T., Hirota, T. & Ishida, S. (2004). Effects of conjugated linolenic acid (*cis*-9, *trans*-11, *cis*-13-18:3) on growth performance and lipid composition of fingerling rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Sci.* 70, 1009–1018.
- Yıldız M., Sener E. & Timur M. (2006). The effects of seasons and different feeds on fatty acid composition in fillets of farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in Turkey. [*Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30:133-141.](#)
- Yıldız M., Sener E. & Timur M. (2006). The effects of seasons and different feeds on fatty acid composition in fillets of farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in Turkey. [*Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30:133-141.](#)

Ketamine-Ksilazin Anestezisi uygulanmış Bozova Tazılarında Oksidatif Stres Parametreleri

Oxidative Stress Parameters in Xylazine-Ketamine Administered Bozova Greyhounds

Özet

Bu çalışma; Ksilazin-ketamin anestezisinin Bozova tazılarında bazı iz element (Cu, Zn, Mn) ve oksidatif stres parametreleri (SOD, CAT, GPx, MDA) üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla yapıldı. Farklı yaş ve vücut ağırlığında toplam sekiz erkek tazi kullanıldı. Farklı şikâyetlerle gelen bu hayvanlara Ketamin (10mg/kg) ve ksilazin (1 mg / k g) kas içi enjekte edildi. Anestezi öncesi ve sırasında V.Cephalikadan kan örnekleri alındı. Eritrosit süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GPx), malondialdehit (MDA) ve plazma Katalaz (CAT) değerleri standart metotlarla, serum bakır, çinko, manganez düzeyleri ICP-OES ile belirlendi. Bu çalışmada; SOD aktivitesinin anestezi sonrasında düşük ($p<0,05$) olduğu belirlenirken GPx, MDA, CAT, Cu, Zn ve Mn seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir fark belirlenmedi ($p>0,05$). Sonuç olarak, ketamin ve ksilazin anestezisinin Bozova tazılarında serum Cu, Zn, Mn seviyeleri ve oksidatif stres yönünden güvenli ve kullanılabilir olduğu söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Bozova tazısı, oksidatif stres, SOD, CAT, GPx, MDA, Cu, Zn, Mn

Abstract

The present study was conducted to evaluate the effects of xylazine-ketamine anesthesia on some micro elements and oxidative stress parameters in Bozova greyhounds. In the study eight male greyhounds, which were in different age and body weight were used as the material. The animals, which were, came in clinic with different complaints injected with the ketamine (10 mg/kg) and xylazine (1 mg/kg) intramuscularly. The findings were recorded before and during anesthesia. Blood samples were collected from the vena cephalica. Serum copper, zinc, manganese levels were determined by an ICP-OES. Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), malondialdehyde (MDA) and catalase (CAT) were measured by validated standard methods. In this study, while SOD activity was lower ($p<0,05$) in the post-anesthesia; a statistically significant difference wasn't determined between the levels of Cu, Zn, Mn and, CAT, GPx, MDA ($p>0,05$). In conclusion, we regard to it was seen that sera copper, zinc, manganese levels and oxidative stress parameters, ketamine-xylazine anesthetics can be used safely in Bozova greyhounds.

Key words: Bozova Greyhounds, oxidative stress, SOD, CAT, GPx, MDA, Cu, Zn, Mn

Güzin CAMKERTEN^{1*}

İlker CAMKERTEN²,

Nihat ŞINDAK³,

Gaye BULUT⁴

¹Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu, Laborant ve Veteriner Sağlık Programı, Aksaray Üniversitesi, 68100, Aksaray, TÜRKİYE

²İç Hastalıkları AD, Veteriner Fakültesi, Aksaray Üniversitesi, 68100, Aksaray, TÜRKİYE

³Cerrahi AD, Veteriner Fakültesi, Siirt Üniversitesi, Siirt, TÜRKİYE

⁴Doğum ve Jinekoloji AD, Veteriner Fakültesi, Aksaray Üniversitesi, 68100, Aksaray, TÜRKİYE

***Sorumlu yazar**

Güzin CAMKERTEN

Teknik Bilimler MYO Hacılar Harmanı Mh. No:1 Otagar yanı Aksaray / TÜRKİYE

oguzalperen@hotmail.com

Copyright © 2016 JAVST

Giriş

Anestezi birçok cerrahi ve medikal işlemin etkili ve güvenilir bir şekilde yapılabilmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu amaçla ksilazin- ketamin kombinasyonu evcil hayvanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Her kimyasal madde gibi anestezi de organizmada birçok sistemik ve metabolik etkiye sahiptir ve bu etkiler 1970' li yıllardan itibaren birçok araştırmaya (Allen vd, 1986; Klide vd, 1975; Haskins vd, 1985, Haskins vd, 1986) konu olmuştur. Bununla birlikte xylazine ve ketamin kombinasyonu köpeklerde genelde güvenle kullanılabilir ve hematolojik verilerde önemli değişiklikler yapmaz. Örneğin Kurtde de vd (1994) sağlıklı köpeklerde xylazine veya xylazine + ketamine enjeksiyonları üzerine yaptıkları çalışmada bu uygulamanın kan gazları ve hematolojik değerlerde istatistik olarak önemli değişikliklere neden olmadığını bildirmiştir.

Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri (ROS) olan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri (OH), organizmanın DNA, lipid ve proteinlerinde hasar oluşturur. Ancak sağlıklı canlılarda ROS, enzimatik ve nonenzimatik antioksidatif mekanizmalar ile vücuttan uzaklaştırılabilir. Bununla birlikte insan ve hayvanlarda leishmaniosis, Behcet hastalığı, pnömoni gibi durumlarda oksidatif-antioksidatif denge organizmanın aleyhine bozulabilir (Camkerten vd, 2009). MDA, oksidatif stres sırasında oluşur ve proteinleri denatüre ederek sitokinler gibi proinflammatory mediatorlerin oluşmasına neden olur. SODs ve CAT gibi antioksidant molekülleri, deride ROS ya da onların ürünlerinin olumsuz etkilerini minimize edebilir (Bickers ve Athar, 2006). Yine kandaki Cu, Zn, Mn gibi iz elementlerin gerek hastalık durumlarında gerekse kimyasal kullanımında kandaki seviyeleri değişebilir (Camkerten vd, 2009).

“Bozova Tazıları” Şanlıurfa ili Bozova ilçesinde yetişmekte ve av amaçlı kullanılmaktadır (Şındak vd, 2010). Yaptığımız literatür taramalara göre, tazılarda ketamin-ksilazin anestezisinin klinik parametrelere etkileri üzerine az sayıda makale bulunmakta ayrıca oksidatif stres parametreleri konusunda makale bulunmamaktadır. Bozova tazılarında anestezi ile ilgili ise herhangi bir çalışma bildirilmemiştir. Bu çalışmada Ketamine – ksilazin anestezisi uygulanan Bozova tazılarında oksidatif stres parametrelerinin ve bazı minerallerin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmanın materyalini değişik yaş, vücut ağırlığında, erkek, sekiz adet Bozova tazısı oluşturdu. Farklı şikâyetlerle kliniğimize gelen tazılara kas içi ketamine (10 mg/kg) + ksilazin (1 mg/kg) kombinasyonu uygulandı. Anesteziden önce ve sırasında (anestezinin 30. dakikasında) usulüne uygun olarak Vena cephalica antebraçhii den antikoagulanlı ve antikoagulansız olmak üzere iki tüpe kan örnekleri alınmıştır. Eritrosit süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GPx), malondialdehit (MDA) ve plazma Katalaz (CAT) değerleri standart metotlarla, Serum bakır, çinko ve manganez seviyeleri ise Harran Üniversitesi Merkezi Araştırma laboratuvarında ICP-OES ile belirlendi.

Eritrosit Örneklerinin Enzim Analizine Hazırlanması:

Enzim analizi için kullanılan eritrositlerin hazırlanmasında Winterbourn (1975) tarafından belirtilen yöntemden yararlanıldı. Bunun için heparinli tüplere alınan kan örnekleri önce 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Üstteki plazma ve lökosit tabakası pipetle alınıp uzaklaştırıldıktan sonra, tüpün dibine çökmüş olan eritrositler pastör pipeti yardımıyla PBS (salin fosfat tampon çözeltisi) ile 3 kez yıkanarak

ve her seferinde 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek tüpün dibinde kalan eritrositlerden 0.4 ml alınıp üzerine 0.4 ml PBS ilave edilip endorf tüplere porsiyonlanarak kullanıldı.

Eritrosit Hemolizatında Hemoglobin Düzeyi Ölçümü:

Enzim aktivitelerinin hesaplanmasında kullanılan hemoglobin düzeyleri ferrosiyanomethemoglobin metoduyla ölçüldü (Tietz 1987). Hemoglobindeki Fe⁺², ferrisiyanür ile Fe⁺³'e oksitlenmekte olup potasyum siyanür eklenmesiyle stabil siyanmethemoglobine dönüşmektedir. Siyanmethemoglobinin 540 nm'de ölçülen absorbansı hemoglobin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Katalaz Aktivitesi Ölçümü: Eritrosit hemolizatında katalaz aktivitesi ölçümü için Aebi (1983) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı. H₂O₂, ışık spektrumunun UV alanında dalga boyunun azalmasıyla artan bir absorbans vermektedir. Uygun bir tampon içerisinde bulunan H₂O₂'in örnekteki katalaz enzimi etkisiyle yıkılması sonucunda bu maddenin 240 nm'de neden olduğu absorbansta azalma meydana gelir. Absorbansta meydana gelen bu azalma, hızı katalaz aktivitesi ile orantılıdır.

SOD Aktivitesi Ölçümü: Eritrosit hemolizatında SOD aktivitesi Sun vd (1988) tarafından geliştirilen bir yöntem ile ölçüldü.

GPX Aktivitesi Ölçümü: Glutasyon peroksidaz aktivitesi Paglia ve Valentine (1967) tarafından bildirilen yöntemle ölçüldü. Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi indirgenmiş nikotinamid dinükleotid fosfatın (NADPH+H⁺) glutasyon redüktaz aracılığı ile oksidasyona bağlıdır. Glutasyonun, terbutil hidroperoksit ile glutasyon peroksidaz katalizöründe reaksiyonu sonucunda okside glutasyon (GSSG) ve su açığa çıkar. Bu reaksiyonda oluşan okside glutasyon, glutasyon redüktaz tarafından NADPH+H⁺ varlığında

tekrar indirgenir. Bu reaksiyonda redükte glutasyon (GSH) miktarı sabit kalır. NADPH+H⁺ ise NADP⁺'a dönüşür.

Eritrosit MDA: Eritrosit MDA seviyesi Buege ve Aust (1978)'nin yöntemine göre belirlendi. Bunun için 250 µL eritrosit; 500 µL TBA ve 1.5 mL % 15 trichloroacetic acid (in 0.25 mol L µ HCl) kombine edildi, karıştırıldı ve kaynayan suda 30 dakika bekletildi. Buz banyosunda soğutulduktan sonra 14000 rpm/5 dakika santrifüje edildi. Süpernatant spektrofotometrik yöntemlerle araştırıldı.

İstatistiki analiz için SPSS 10.0 yazılımı (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanıldı. Elde edilen anestezi öncesi ve sonrası verilere "paired-t testi" uygulandı. Sonuçlar "mean ± SE" olarak tablo 1 de verildi. Veriler arasında farklar P<0.05 ise istatistiki olarak önemli kabul edildi.

Bulgular

Çalışmada anestezi sonrası ortalama SOD değerinin anestezi öncesi ortalama değere göre istatistiki açıdan önemli oranda düşük (p<0.05) olduğu belirlendi. CAT, GPx, MDA, Cu, Zn ve Mn değerlerinde ise istatistiki açıdan (p>0.05) fark olmadığı tespit edildi. Çalışma sonuçları Tablo 1' de verildi.

Tartışma

Anestezi süresince stresi tetikleyen ve serbest oksijen radikallerinin salınımını etkileyen faktörler minimize edilmelidir (Wagner vd, 1991). SOD, ROS karşısında ilk savunma çizgisidir ve süperoksit radikallerini detoksifiye etmede rol oynamaktadır. Alternatif olarak, CAT, peroksidaz reaksiyonunu katalize edebilir. Normal şartlarda CAT' in çoğu hücre tipi için büyük bir önemi yoktur ancak oksidatif stres durumunda hücre

savunmasında önemli rol oynar (Todorova vd, 2005). MDA, lipidlerin peroksidasyonu sırasındaki en önemli son üründür. MDA' nın serum/ plasma düzeyi lipid peroksidasyonunu ve serbest radikallerin hücre zararını anlamada en önemli belirteçtir (Abdel-Hafez vd, 2010).

Bu çalışmada, oksidan/antioksidan denge ile Cu, Zn ve Mn değerlerinde istatistiki önemde bir değişiklik tespit edilmemiştir. Yaptığımız literatür taramalarına göre, Ksilazın-ketamin anestezisi uygulanan Bozova tazılarında SOD, CAT aktivitesi ve MDA, Cu, Zn, Mn seviyeleri ilk kez bu çalışmada verilmiştir. SOD aktivitesi yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO₂ artışıyla artar (Altınışık, 2015). İnsanlarda laparoskopik kolesistektomi operasyonunda kullanılan desflurane'ın plasma SOD konsantrasyonunu artırdığı yine desflurane'ın karaciger CAT ve SOD seviyesini artırdığı bildirilmektedir (Altuğ vd, 2008).

Bu çalışmada SOD aktivitesindeki azalmanın anestezinin ilk 30 dakikasında PaO₂ düzeyindeki muhtemel düşüşe bağlı olabileceği şeklinde yorumlandı.

Oksidatif stres ve enzimatik antioksidan savunma biyobelirteçleri sağlık, hayati belirtiler ve performansın takibinde kullanılabilir (Andriichuk vd, 2015). Seçilen anestezige göre oksidatif stres parametrelerinde değişiklikler olabilir. Oksidatif stres açısından değerlendirildiğinde sevofluran desflurandan daha tercih edilebilir bir anesteziktir (Yalcin vd, 2013), Halothane ve Isoflurane anaestezinin oksidatif mekanizmaya olumsuz etkisi yoktur (Yarsan vd, 2010), propofol ise köpeklerde antioksidan etki göstermektedir (Lee ve Kim 2012). Bu çalışmalara benzer olarak ketamine/ksilazın anestezisinin oksidatif mekanizmaya olumsuz etkisinin olmadığı söylenebilir.

Tablo 1. Bozova Tazılarında Anestezi Öncesi ve Sonrası Oksidatif Stres Parametreleri.
Table 1: Oxidative Stress Parameters on Bozova Greyhounds Before and After Anesthesia

	Anestezi öncesi		Anestezi sonrası		P	n: 8
	Mean	SE	Mean	SE		
SOD	361,4	31,4	237,3	40,8	< 0.05	
CAT	245,4	27,2	276,9	31,8	-	
GPX	9561	2103	9676	1951	-	
MDA	8,02	2,20	3,67	0,16	-	
Cu (mg/L)	1,70	0,06	1,69	0,06	-	
Zn (mg/L)	2,70	0,90	5,79	1,42	-	
Mn (mg/L)	0,20	0,06	0,32	0,08	-	

Sonuç

Bozova tazılarından anestezi öncesi ve sonrası elde edilen SOD, CAT aktiviteleri ve MDA Cu, Zn, Mn seviyeleri ile ilgili veriler ışığında ketamin-ksilazın anestezisinin Bozova tazılarında Cu, Zn, Mn ve oksidatif stres yönünden güvenli ve kullanılabilir olduğu söylenebilir.

Kaynaklar

- Abdel-Hafez HZ, Mohamed EE, Abd-Elghany AA.** (2010): Tissue and blood superoxide dismutase activity and malondialdehyde level in leprosy. J Eur Acad Dermatol Venereol. 24(6):704-8.
- Aebi HE** (1983): Catalase in: H.U.Bermeyer (Hrsy). Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie; Weinheim, Bd. III, 273-286.

- Allen DG, Dyson DH, Pascoe PJ, O'Grady MR** (1986): Evaluation of a xylazine-ketamine hydrochloride combination in the cat. *Can J Vet Res.* Jan; 50(1): 23–26.
- Altınışık M** (2015) Serbest Radikaller. Erişim: <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01b.pdf>. Erişim Tarihi: 03.03.2015.
- Altuğ ME, Gönenci R, Yarsan E, Öztürk A** (2008): Effect of Induction Agents on the Antioxidative Activity of Desflurane in Dogs. *YYÜ VET FAK DERG* 19(1): 29-33.
- Andriichuk A, Tkachenko H, Tkachova I** (2015): Oxidative Stress Biomarkers and Erythrocytes Hemolysis in Well-Trained Equine Athletes before and after Exercise. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jjevs.2015.09.011> Published Online: October 08, 2015. Publication stage: In Press Accepted Manuscript.
- Buege AJ, Aust SD** (1978): Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology* 52:302-10.
- Bickers DR, Athar M** (2006): Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol* 126(12):2565-75.
- Camkerten I, Sahin T, Borazan G, Gökçen A, Erel O, Das A** (2009): Evaluation of blood oxidant/antioxidant balance in dogs with sarcoptic mange. *Veterinary Parasitology* 161: 106–109.
- Haskins SC, Farver TB, Patz JD** (1985): Ketamine in dogs. *Am J Vet Res* 46(9): 1855-60
- Haskins SC, Patz JD, Farver TB** (1986): Xylazine and xylazine-ketamine in dogs. *Am J Vet Res* 47, 636- 641
- Klide AM, Calderwood HW, Soma LR** (1975): Cardiopulmonary effects of xylazine in dogs. *Am J Vet Res* 36: 931-935.
- Kurtdede A, Börkük MK, Özlem MB, Kalınbacak A** (1994): Sağlıklı köpeklerde xylazine ve xylazine+ketamine 'nin kan gazları ve bazı hematolojik parametreler üzerindeki etkileri. *A.Ü. Vet. Fak. Derg* 41(3,4): 327-335.
- Lee JY, Kim MC** (2012): Effect of propofol on oxidative stress status in erythrocytes from dogs under general anaesthesia. *Acta Veterinaria Scandinavica* 54(1):76.
- Paglie DE, Valentine WN** (1967): Studies on Qualitative and Quantative Characterization of Eeythrocyte Glutathion Peroxidase. *J Lab Clin Met* 70: 158-169.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y** (1988): A simple for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34: 497-500.
- Şındak N, Camkerten İ, Ceylan C** (2010): Clinical Evaluation of Ketamine-Xylazine Anesthesia in Bozova Greyhounds. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9 (15): 2025-2029.
- Tietz WN** (1987): Measurement of plasma hemoglobin. *Fundamental of Clinical Chemistry.* Saunders Company. 805-806.
- Todorova I, Simeonova G, Kyuchukova D, Dinev D, Gadjeva V** (2005): Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats. *Comp Clin Path* 13: 190
- Yalcin S, Aydogan H, Yuce HH, Kucuk A, Karahan Mahmut Alp, Vural M, Camuzcuoglu A, Aksoy N** (2013): Effects of sevoflurane and desflurane on oxidative stress during general anesthesia for elective cesarean section. *Wien Klin Wochenschr* 125:467–473.
- Yarsan E, Gurkan M, Pekcan Z, Ince S, Kumandas A** (2010): Effects of Halothane and Isoflurane Anaesthesia on Antioxidant Enzymes in Dogs *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9 (19): 2513-2516.
- Wagner AE, Muir WW, Hinchdiff KW** (1991): Cardiovascular effects of xylazine and detomidine in horses. *Am J Vet Res* 52: 651-657.
- Winterbourn CC, Hawkins RE, Brain M, Carrel W** (1975): The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med*, 55, 337-341.

Hemotropik mikoplazmalar: *Haemobartonella*'dan *Mycoplasma*'ya

Hemotropic mycoplasmas: From *Haemobartonella* to *Mycoplasma*

Özet

Bu çalışmanın amacı, hemotropik mikoplazmalar ile ilgili son gelişmelerin özetlenmesidir. Hemotropik mikoplazmalar eritrosit yüzeyine yerleşen, kültürü yapılamayan, gram-negatif, obligat ve hücre zarı olmayan bakteriler olup pek çok memeli türünde infeksiyöz aneminin etkeni olarak bilinmektedir. Önceleri *Haemobartonella* ve *Eperythrozoon* olarak bilinen bu mikroorganizmalar, *Haemobartonella* ve *Eperythrozoon spp.* türlerinin 16S rRNA genlerinin sekans analizleri neticesinde riketsiyalardan çok farklı olarak *Mollicutes* üyesi olan hemotropik mikoplazma olduğu belirlenmiş ve *Mycoplasma* ailesi içinde tekrar sınıflandırılmıştır. Bu patojenler kan frotilerinin Giemsa, Wright Giemsa ya da DiffQuick gibi Romanowsky-tip boyanmasında, eritrosit yüzeylerinde mor-mavi renkli, kokoid, yuvarlak ya da kısa zincir formunda görüntülenmektedir. Fakat, 16S rRNA geninin temel alındığı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi sitolojiden çok daha spesifik ve duyarlı bir yöntemdir. Doksisisiklin, enrofloksasin ve oksitetrasiklin grubu antibiyotikler günümüzde tedavi için en yaygın kullanılan antibiyotiklerdir. Bununla birlikte, gelecekte hemotropik mikoplazmaların tedavisi, bulaşmada etkili vektörler, türler arası bulaşma ve zoonotik potansiyeli ile ilgili araştırmalar yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: *Haemobartonella*, hemoplazma, hemotropik mikoplazma, tedavi

Abstract

In the study, it was aimed to summarize recently gained insights into hemotropic mycoplasmas. Hemotropic mycoplasmas attaching to the host's erythrocytes surface are unculturable, gram-negative, obligate and wall-less bacteria which are known as the causative agents of infectious anemia in a wide variety of mammals. These organisms, previously known as *Haemobartonella* and *Eperythrozoon*, have been reclassified within the *Mycoplasma* genus while; sequence analysis of the 16S rRNA gene of *Haemobartonella* and *Eperythrozoon spp.* has shown that hemotropic mycoplasmas belong to members of the mollicutes rather than the rickettsiales. These pathogens can be visualized as dark purple-blue coccoids, rings or short chains on the erythrocyte surface, using Romanowsky-type stain such as Giemsa, Wright Giemsa or DiffQuick of blood smears. But it has to be taken account that the polymerase chain reaction assays, based on the 16S rRNA gene are more sensitive and specific methods than cytology. Doxycycline, enrofloxacin and oxytetracycline are the mostly used agents to cure hemotropic mycoplasmas nowadays. Furthermore, new research should likely be focused on treatment of hemotropic mycoplasmas with a potential vector-borne, interspecies transmission and a zoonotic potential.

Key words: *Haemobartonella*, hemoplazma, hemotropik mycoplasma, treatment

Öznur ASLAN *

Erciyes Üniversitesi, Veteriner
Fakültesi, İç Hastalıkları
Anabilim Dalı, Kayseri-Türkiye

*Sorumlu yazar

Öznur ASLAN

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

oznuratalay@gmail.com

Copyright © 2016 JAVST

Giriş

Mycoplasma genusu altında yer alan Mollicutes, hücre duvarı olmayan bakteriler olup kanatlılardan, bitkilere, insanlardan insektlere kadar değişen pekçok canlıda bulunmaktadır. Pekçok türü anemi, artrit, infertilite ve solunum sistemi hastalıkları gibi rahatsızlıklara neden olan patojeniteye sahiptir (Chalker, 2005). Hemotropik mikoplazmalar (hemoplazma) ise, kültürleri tam yapılamayan, gram negatif, obligat, daha çok alyuvarlarda hücre zarına yerleşen, başta insan olmak üzere pek çok hayvan türünde enfeksiyona neden olan bakterilerdir (Tasker ve Lappin 2002; Willi vd., 2005; Maggi vd., 2013). Genellikle bu bakteriler vahşi ve evcil hayvanlarda persiste asemptomatik intravasküler enfeksiyon şeklinde bulunmaktadır ve başka bir enfeksiyöz ya da enfeksiyöz olmayan etki ile birlikte değişen derecelerde hemolitik anemiye neden olmaktadır. Özellikle, ilaç ya da retrovirus enfeksiyonları nedeniyle oluşan immunsupresyon, beslenme yetersizliği, gebelik, laktasyon gibi stres faktörleri ya da çok virulent farklı bir enfeksiyonla eş zamanlı olarak gelişmesi hayvanlarda hastalığın oluşumuna neden olmaktadır (Maggi vd., 2013). Spesifik olmamakla birlikte hemotropik mikoplazmaların klinik bulguları ateş, mukozada solgunluk, kardiyak üfürüm, iştahsızlık, güçsüzlük, taşikardi, dispne, taşipne, hepato-splenomegali, lenfadenopati, depresyon, dehidrasyon, pika ve ağırlık kaybıdır. Sarılık şiddetli akut hemoliz gelişmediği sürece nadirdir. Hipotermi hayvanlar ölmek üzere olduklarında gelişebilmektedir (Fard vd., 2014).

Kedilerde ilk olarak 1942 yılında Güney Afrika'da anemiye yol açan *Eperythrozoon* enfeksiyonu tespit edilmiş ve etkene *Eperythrozoon felis* ismi verilmiştir (Tasker ve Lappin, 2002). Daha sonraları Flint ve Moss (1953) ABD'de kedilerde anemiye yol açan benzer bir organizma tanımlanmış, Flint ve McKelvie (1955) bu

organizmayı *Haemobartonella felis* olarak isimlendirmiştir. Etken ülkemizde ilk olarak 1993'de Tüzer vd., (1993) tarafından İstanbul'da bildirilmiştir.

dos Santos vd. (2008)'de immun yetmezlikli bir insanda *M. haemofelis* enfeksiyonunu PZR ile tespit etmesi ve son zamanlarda anemili insanlarda da hemotropik mikoplazma enfeksiyonlarının bildirilmiş olması (Sykes vd., 2010; Steer vd., 2011) hemoplazmaların zoonoz olma şüphesini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle hemotropik mikoplazmalar son dönemlerde oldukça önem kazanmıştır. Ayrıca invitro çalışmalarda mikoplazmaların normal hücreleri kanser hücrelerine dönüştürebildiği gösterilmiştir (Tsai vd., 1995). *M. genitalium* ve *M. hyorhina* enfeksiyonları insanların epitelyum hücrelerini malignan forma dönüştürebilmekte, ayrıca prostat kanseri ve gastrik karsinoma gibi çeşitli kanserlerin gelişiminde rol oynadığı da düşünülmektedir (Namiki vd., 2009; Yang vd., 2010). Bunun yanı sıra kedilerden immun yetmezlikli köpekler türler arası geçişin olduğuna dair bildiriler de mevcuttur (Obara vd., 2011).

Sunulan bu makale ile kedilerde eskiden *Haemobartonella* spp. olarak bilinen hemotropik mikoplazmalar hakkındaki bilgilerin özetlenmesi amaçlanmıştır.

Etiyoloji

Eskiden *Haemobartonella* olarak isimlendirilen hemotropik mikoplazmalar, kültürleri yapılamayan, gram negatif, obligat, daha çok alyuvarlarda hücre zarına yerleşen ve hemolitik anemiye yol açan bakterilerdir (Tasker ve Lappin, 2002; Willi vd., 2005).

Çoğu araştırmacı tarafından, etkenin hücre içine yerleşmemesi, hücre duvarları ve kamçılarının olmayışı, boyutlarının küçük oluşu, penisilin ile

türevlerine direnç gösterişi, tetrasiklinlere duyarlı oluşu ve son zamanlarda bazı *H. felis* izolatlarının 16S rRNA geninin incelenmesi ile bu mikroorganizmanın Mollicutes sınıfından *Mycoplasma* genusu altında yer almasına karar verilmiştir (Messick, 2004).

Kedilerde; *Mycoplasma haemofelis*, “Candidatus *Mycoplasma haemominutum*” (CMhm) ve “Candidatus *Mycoplasma turicensis*” (CMt) olmak üzere üç hemotropik mikoplazma bildirilmiştir (Foley ve Pedersen 2001; Willi vd., 2006). Son zamanlarda kedilerde dördüncü bir etken olarak “Candidatus *M. haematoparvum*” da belirlenmiştir (Sykes vd., 2007).

Prevalans

Japonya’da yapılan bir çalışmada dışarıyla ilişkisi olan kedilerin %26,4’ünde (468) tekli veya çoklu enfeksiyon tespit edilmiş olup, klinik olarak sağlıklı görünen kedilerde de pozitif sonuçlarla karşılaşmıştır (Tanahara vd., 2010). İspanyada ise, 30 semptomatik kediden 9 (%30)’unda *Mycoplasma* spp. tespit edilmiş, bu izolatlardan %66,6’sının *Mycoplasma haemofelis*, %33,3’ünün ise *Mycoplasma haemominutum* olduğu belirtilmiştir (Criado-Fornelio vd., 2003). Peters vd. (2008), PZR ile yaptıkları çalışmada incelenen numunelerde en çok CMhm etkenin tespit edildiğini, CMt enfeksiyonunun genelde diğer hemoplazma türleriyle, özellikle CMhm ile birlikte seyrettiğini tespit etmiştir. Jensen vd. (2001), PZR ile kedilerde *H. felis* prevalansını %19,5 olarak bildirmiştir. Bobade vd. (1988), frotilerin çeşitli boyama yöntemleri ile incelenmesinde *H. felis* etkeninin prevalansının % 0,9 civarında olduğunu bildirmiştir.

Ülkemizde Ural vd. (2009), yaptıkları çalışmada (Bursa, İzmir, Ankara, Antalya) PZR ile hastalığın prevalansını %18,9 olarak tespit etmişlerdir. Aynı

yazarlar sadece “Candidatus *Mycoplasma haemominutum*” tipinin bu dört bölgenin hepsinde de mevcut olduğunu bildirmiştir. Sitolojik teşhise göre hemotropik mikoplazma prevalansı Van’da %14,87 olarak tespit edilmiştir (Akkan vd., 2005).

Atalay vd. (2015), Kayseri’de yaptıkları çalışmada hemotropik mikoplazma prevalansını %9,52 olarak belirlerken, *M. haemofelis* ile enfeksiyon oranı % 4,76, *Candidatus M. haemominutum* ile enfeksiyon oranını % 3,57 ve her iki etken ile enfekte olma oranını %1,19 olarak bildirmiştir.

Bulaşma

Yapılan çalışmalar hemoplazmaların erkek, yaşlı ve dışarıya çıkan kedilerde daha sık görüldüğünü göstermiştir. Özellikle erkek kedilerde bulaşmanın kavga sırasında oluşan ısırıkların bulaşmada etkili olduğu düşünülmüştür. Bu düşünceyi, CMt ve CMhm’nin DNA’larının enfekte kedilerin salyalarında tespit edilmesi desteklemiştir (Willi vd., 2006; Dean vd., 2008). Ancak CMt ile enfekte kedilerden alınan aynı miktarda salya ve kan ile yapılan denemelerde salya ile oral ve subkutan bulaşma gerçekleşmezken, kan ile subkutan bulaşma gerçekleştirilmiştir (Museux vd., 2009). Henüz PZR gibi yöntemler geliştirilmeden yapılan denemelerde, hasta kedilerden alınan kanın oral (Splitter vd., 1956; Harvey ve Gaskin, 1977), intraperitoneal ve intravenöz inokülasyonunda da enfeksiyon oluşturulabildiği (Flint vd., 1959) bildirilmiştir. Bazı yazarlar deneysel olarak oral yoldan etkenle muamele edilen kedilerden hiçbirinin kanında PZR pozitif sonuç elde edilemediği de belirtmiştir (Museux vd., 2009).

Perinatal enfeksiyonun şekillenebileceği düşünülse de bugüne kadar transplasental bulaşma konusunda bir bildirim rastlanmamıştır (Hayes vd., 1973). Etkenin

taşınmasında kan nakilleri, kan emen artropodların rol alabileceği bildirilmektedir (Willi vd., 2006; Museux vd., 2009). Yapılan çalışmalarda bazı kenelerde (*Ixodes* spp. ve *Rhipicephalus* spp) ve kedilerden toplanan pirelerde feline haemoplazma bulunmuş olmasına rağmen bulaşmadaki yeri tam olarak kanıtlanmamıştır (Taroura vd., 2005; Lappin vd., 2006; Willi vd., 2007).

Patogenez

Hemotropik mikoplazma enfeksiyonlarında, hemolizin şekillenme mekanizması dejenere olmuş eritrositlerin dalakta fagositozudur (Zulty ve Kociba, 1990). Hemotropik mikoplazmalar, eritrosit membran yüzeyine değişik noktalardan yapışır. Yapışma noktasındaki membranda yırtılmalara neden olur, membran dejenerasyonunu takiben hemogloblin kaybı ve ozmotik frajilitede artış meydana gelir. Eritrosit yüzeyindeki yapısal değişiklikler antijen olarak görev yaparak komplementin aktive olmasına ve komplementin bu yapılara bağlanarak hemolizin başlamasına neden olur. Etkene karşı antikorlar üretilir ve bu otoantikorlar enfekte eritrositleri aglutine ederek parçalanmalarını sağlar (Maede ve Hata, 1975; Carney ve England, 1993). Dalak, karaciğer, akciğer ve genel dolaşımdaki makrofajlar enfekte eritrositleri fagosit eder (Maede ve Hata, 1975).

Organizmada hangi hücrelerde yerleştiklerine dair in situ hibridizasyon çalışmasında, *M. haemofelis* organizmalarının bademcik, çene altı tükürük bezlerinde, kemik iliğinde, akciğer, karaciğer, dalak, böbrek, ince bağırsak, kalın bağırsak, mezenterik lenf yumrusu, kalın bağırsak lenf yumrusundaki kırmızı kan hücrelerinde yerleştikleri tespit edilmiştir (Peters vd., 2011).

Hemoplazma 16S rDNA bazı hemoplazma türleriyle enfekte olan kedilerin salya, dışkı ve idrarında tespit

edilmiştir (Museux vd., 2009). Ancak Peters vd. (2011), etkenlerin böbrek, tükürük bezi veya bağırsak gibi dokulardaki kan hücreleri dışındaki hücrelerde yerleştiklerine dair bir bulguya rastlamamış, salya, idrar ve dışkıda etkenin DNA'sının bulunmasını enfekte eritrositlerin transferine veya bu organizmaların bu sıvılara translokasyonuna bağlamışlardır.

Risk Faktörleri

Zayıf, anemik, kavga yaralanması ve/veya apsesi olan, rota virüs enfeksiyonlu, immün supresyonu bulunan, FeLV pozitif veya FeLV'e karşı aşılammış ve dışarıyla temas halinde olan kedilerde hemoplazmaya yakalanma riski yüksektir. Ayrıca dışarıda yaşayan erkek kedilerde enfeksiyona yakalanma riskinin çiftleşme dönemi olan ilkbahar aylarında arttığı öne sürülmektedir (Grindem vd., 1990; Carney ve England 1993; Tanahara vd., 2010). Hooper vd. (1989), FIV ile enfekte ve şiddetli anemi semptomu gösteren kedilerin % 40'ının *H. felis* pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca çeşitli araştırmacılar FeLV pozitif hemoplazmalı kedilerde hematopoietik tümörlerin görülme sıklığının arttığını bildirmişlerdir (Grindem vd., 1990; Carney ve England 1993).

Klinik Belirtiler

Kedi hemoplazmalarından, *Mycoplasma haemofelis* en patojen olandır, "Candidatus *Mycoplasma haemominutum*" ve "Candidatus *Mycoplasma turicensis*" daha az patojendirler (Barker vd., 2010). Candidatus *Mycoplasma haemominutum* ve *M. haemofelis* virülensliklerinin karşılaştırıldığı bazı deneysel enfeksiyon çalışmalarında her iki türün de patojenlik bakımından farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur: Candidatus *Mycoplasma haemominutum* ile

enfekte edilen kedilerde klinik belirtiler asgari düzeyde ve genelde anemi meydana getirmezken, *M. haemofelis* enfeksiyonunda şiddetli hemolitik anemi meydana geldiği gösterilmiştir (Foley vd., 1998).

Deneysel hemoplazmoziste hastalığın 4 aşamada seyrettiği ifade edilmiştir: a) kedilerin herhangi bir klinik bulgu ya da parazitemi göstermediği 2- 21 gün süren preparazitik dönem, b) klinik bulguların ve paraziteminin aralıklı olarak ortaya çıktığı 2-4 ay süren akut dönem, c) klinik bulguların belirsiz olduğu sadece hafif derecede anemi belirtisi olan minimal parazitemili iyileşme dönemi ve d) klinik olarak sağlıklı görünen ve paraziteminin nadiren görüldüğü 2 yıla kadar uzayabilen taşıyıcı dönem, doğal enfeksiyonlarda söz konusu dönem sürelerinin daha uzun veya farklı olabileceği belirtilmiştir (Harvey ve Gaskin, 1977; Carney ve England 1993).

Enfekte kediler inkübasyon döneminde ve bazen akut fazın iyileşme döneminde klinik olarak sağlıklı görünebilirler. Hastalığın klinik bulgularındaki farklılıkta FeLV veya FIV gibi viral enfeksiyonların birlikte bulunmasının rolü olduğu bildirilmektedir (Carney ve England 1993).

Klinik bulguların şiddeti, enfeksiyon dönemine, organizmanın virülensliğine ve aneminin şiddetine göre değişir. Deneysel enfeksiyonlarda 2-3 hafta süren inkübasyon dönemden sonra bazı hastalarda klinik bulgu ortaya çıkmazken bazı hastalarda anemi, depresyon, kilo kaybı, ikterus, yüksek ateş ve dalak büyümesi belirlenmiştir. Ölüm çoğunlukla akut dönemde gerçekleşmekte, bu dönemde uygun tedavi yapılmazsa mortalite %33 civarındadır (Harvey ve Gaskin, 1977).

Komplikasyon gelişmeyen hastaların çoğu uygun antibiyotik sağaltımı ile iyileşir, ancak taşıyıcı olarak kalırlar (Tasker, 2010).

Tanı

Kedilerin hemotropik mikoplazma enfeksiyonlarında etkenin mikroskopik olarak teşhisi sınırlı olup, son zamanlarda geliştirilen PZR yöntemleri tüm feline hemoplazma türlerinin tespit edilmesinde ve ayırt edilmesinde oldukça başarılı olmuştur (Tasker ve Lappin 2002). Tasker vd. (2010), real-time PZR deneyinin, kedi kanındaki hemoplazma DNA miktarının ölçümü açısından güvenilir bir metot olduğunu bildirmiştir. Aynı yazarlar PZR testinin tedaviye verilen yanıtın ölçülmesi için de kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Laboratuvar Bulguları

Histoloji

PZR testi geliştirilene kadar teşhiste en sık kullanılan yöntem kan sürme preparatlarının Romanowsky-tip (Giemsa, May-Grunwald-Giemsa, Wright ve Wright-Giemsa) boyamalarıdır (Carney ve England 1993; Tasker ve Lappin 2002). Romanowsky boyama yönteminde, *H. felis* mikroorganizmaları eritrositlerin periferinde üniform, küçük, kahverengi-mavi-mor renge kadar değişen renkte, yüzük, kokoid ve çubuk şeklinde gözlenir (Tasker, 2010).

Patoloji

Aneminin derecesine göre dokularda solgunluk gözlenir. Olguların %50'sinde şipenomegali tespit edilmiş olup, bunun FeLV enfeksiyonu ile ilişkisi olduğu öne sürülmüştür. Karaciğer konjesyonedir ve değişken bir ikterus tablosu görülür. Lenf yumruları büyümüş, hemorajik ve ödemli olabilir. Dalak, karaciğer ve kemik iliği preparatlarında eritrositleri fagosite etmiş makrofajlar görülür. Kemik iliğinde hastalığın akut döneminde hiperplazi ve kronik dönemde kemik iliği depresyonu gözlemlenmiştir

(Splitter vd., 1956; Bobade vd., 1988; Foley ve Pedersen, 2001).

Biyokimya

Kan serumunda hepatik enzimlerde hafif ve total serum proteininde artış görülebilir (Carney ve England, 1993). Ural (2006) kedilerin sağaltım öncesi ortalama ALT, total bilirubin, total protein, değeri ile sağaltım sonrası ALT, total bilirubin, total protein değeri arasındaki farkı istatistiksel olarak önemli bulmuştur. Hiperbilirubinemi, eritrosit bağlayan antikorlar ortaya çıktığında idrar analizinde hemoglobüri ve bilirubinüri hemolizi düşündürür. Tasker vd. (2009), yaptıkları çalışmalarda; Cmt ile enfekte kedilerin kan glukoz seviyelerinin Mhf ve Cmhf, ile enfekte gruba göre daha düşük olduğunu, ancak hipoglisemi belirlenmediğini bildirmişlerdir. Akut faz proteinler yangı ve enfeksiyonların nonspesifik indikatörü olmakla birlikte, hemoplazma enfeksiyonlarında akut/klinikten kronik/subklinik formun ayırt edilmesinde önemli olabilir. Serum amiloid A seviyesi, Mhf enfeksiyonlarında CMhm enfeksiyonlarına göre hızla artmakta ve enfeksiyonun akut fazından kısa süre sonra bazal değere geri dönmektedir (Korman vd., 2012).

Hematoloji

Hastalığın başlangıcında dolaşımda fazla miktarda parazitli eritrositin bulunduğu olgularda hematokrit değerinin düştüğü gözlenir. Enfeksiyon kronikleştikçe kandaki organizma sayısı azalır, iyileşme döneminde ve taşıyıcı kedilerde hematokrit değeri %25-35 arasında seyrederek (Tasker ve Lappin, 2002). Vücut sıcaklığının düştüğü durumlarda eritrositlerde otoaglutinasyon belirlenir (Werner, 1980). Hastalarda genellikle makrositik-normokromik anemi saptanır (Carney ve England 1993). Mhf ile enfekte kedilerde rejeneratif makrositik hipokromik hemolitik anemi gözlenmektedir

(Korman vd., 2012). Kronik olgularda normositik-normokromik anemi belirlenir. Hastada *H. felis* ile birlikte FeLV varsa anemi makrositik-hipokromik özellik kazanabilir (Bobade ve Nash 1987).

Tedavi

H. felis sağaltımında genellikle tetrasiklin ve fluoroquinolon türevleri kullanılmaktadır (Tasker, 2010). Kedilerde yan etkisinin az olması nedeniyle doksisisiklin tercih edilmektedir (Lappin, 2004). Doksisisiklin tabletlerin 21 gün süresince 1-3 mg/kg (Carney ve England 1993) veya 14 gün süresince 24 saatte bir 10 mg/kg dozunda kullanılması önerilmektedir (Lappin, 2004). Oksitetrasiklin ve tetrasiklin ilaç kaynaklı beden ısısı artışına neden olabilir. Antirikestiyal ilaçlar organizmanın eritrositlerden uzaklaştırılmasını ve klinik bulguların hafifletilmesini sağlar ancak organizmaları tamamen yok etmez (Carney ve England 1993).

Doksisisikline toleransı olmayan kedilerin sağaltımında enrofloksasinin 5-10 mg/kg dozunda oral olarak 24 saate bir 14 gün süreyle kullanıldığında etkili olduğunu bildirmiştir (Lappin, 2004). Tasker vd. (2006), deneysel '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' enfeksiyonunda marbofloksasinin kısmen etkili olduğunu saptamışlardır.

H. felis ile enfekte şiddetli rejeneratif hemolitik anemili kedilerin sağaltımında antibiyotik ile birlikte glukokortikoid kullanılması faydalı olabileceği önerilmektedir (Tasker ve Lappin, 2002). Ayrıca glukokortikoidlerin hastalarda olası bir otoaglutinasyon durumuna karşı da endike oldukları ifade edilmektedir (Zulty ve Kociba, 1990; Lappin, 2004). Ancak yapılan çalışmalar glukokortikoid uygulamalarının enfeksiyonu daha da arttırdığını göstermiştir. Hematokrit ve hemoglobin düzeyinin oldukça olumsuz olduğu vakalar

dikkate alınarak kan transfüzyonunun yapılması da düşünülebilir. Kan transfüzyonunun yapılamadığı durumlarda oksijen taşıyan hemoglobin (Oxyglobin, OPK Biotech) kullanılmalıdır (Tasker, 2010).

Hemoplazma ile enfekte kedilerde dehidrasyon sıklıkla karşılaşılan bir durumdur ve intravenöz sıvı tedavisi destekleyici sağaltım için önemlidir. Hemoplazmada aneminin derecesi hemokonsantrasyon nedeniyle oluşan dehidrasyon tarafından maskelenebilmektedir. Ayrıca anoreksi görülen kedilerde gıda alımının desteklenmesi (elle besleme, sıkı sık ılık gıda alımının sağlanması gibi) önemlidir (Tasker, 2010).

Korunma

Kedileri hastalıktan korumak için artropod vektörlerle mücadele edilmesi, aşılamaların düzenli yapılması, risk faktörlerinde belirtilen hastalıklar için düzenli olarak tarama testlerinin yapılması, bu hastalıkların zamanında tedavi edilmesi, kavga yaralanmalarının önlenmesi için kedilerin dışarıyla temasının kısıtlanması, kedi bakım evlerinde rutin taranması ve olası taşıyıcıların tespit edilmesi önemlidir (Lappin, 2004).

Kaynaklar

Akkan HA, Karaca M, Tutuncu M, Ozdal N, Yuksek N, Agaoglu Z, Deger S (2005): Haemobartonellosis in Van cats. Turk J Vet Anim Sci 29: 709-712.

Atalay T, Aslan O, Bekdik İK (2015): Diagnosis of mycoplasma haemofelis and candidatus mycoplasma haemominutum using PCR assay in cats. Journal of Health Sciences 24 (1): 1-6.

Barker EN, Helps CR, Heesom KJ, Arthur CJ, Peters IR, Hofmann-Lehmann R, Tasker S (2010): Detection of humoral response using a recombinant heat shock protein 70, DnaK, of Mycoplasma haemofelis in experimentally and naturally hemoplasma-infected cats. Clin Vaccine Immunol 17(12): 1926-32.

Bobade P, Nash AS, Rogerson P (1988): Feline hemobartonellosis: Clinical, haematological and pathological studies in natural infections and the relationship to infection with feline leukaemia virus. Vet Rec 122: 32-36.

Bobade P, Nash AS (1987): A comparative study of the efficiency of acridine orange and some Romanowsky staining procedures in the demonstration of *Haemobartonella felis* in feline blood. Vet Parasitol 26: 169-172

Carney HC, England JJ (1993): Feline hemobartonellosis. Vet Clin North Am Small Anim Pract 23: 79-90.

Chalker VJ (2005): Canine mycoplasmas. Res Vet Sci 79: 1-8.

Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Saraña A, Barba-Carretero JC (2003): Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. Vet Microbiol 93: 307-317.

Dean RS, Helps CR, Gruffydd Jones TJ (2008): Use of real-time PZR to detect *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in the saliva and salivary glands of hemoplasma-infected cats. J Feline Med Surg 10(4): 413-7.

dos Santos AP, dos Santos RP, Biondo AW, Dora JM, Goldani LZ, de Oliveira ST, de Sá Guimarães AM, Timenetsky J, de Moraes HA, González FH, Messick JB (2008): Hemoplasma infection in an HIV-positive patient, Brazil. Emerg Infect Dis 14: 1922-4.

Fard RMN, Vahedi SM, Mohammadkhan F (2014): Haemotropic mycoplasmas (haemoplasmas): a review. Int J Adv Biol Biom Res 2: 1484-1503.

Flint JC, McKelvie DH (1955): Feline Infectious Anaemia, Diagnosis and Treatment. In 92nd Annual Meeting of the American Veterinary Medical Association, Minneapolis, 1955, 240-242.

Flint JC, Moss LC (1953): Infectious anaemia in cats. J Am Vet Med Assoc 122: 45-48.

- Flint JC, Roepke MH, Jensen R (1959):** Feline infectious anemia. II. Experimental cases. *Am J Vet Res* 20: 33-40.
- Foley JE, Harrus S, Poland A (1998):** Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. *Am J Vet Res* 59: 1581-8
- Foley JE, Pedersen NC (2001):** *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, a low-virulence epierythrocytic parasite of cats. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 815-7.
- Grindem CB, Corbett WT, Tomkins MT (1990):** Risk factors for *Haemobartonella felis* infection in cats. *J Am Vet Med Assoc* 196: 96-99.
- Harvey JW, Gaskin JM (1977):** Experimental feline haemobartonellosis. *J Am Anim Hosp Assoc* 13: 28-38
- Hayes HM, Priester WA (1973):** Feline infectious anaemia. Risk by age, sex, and breed; prior disease, seasonal occurrence; mortality. *J Small Anim Pract* 14: 797-804.
- Hooper CD, Sparkes AH, Gruffydd-Jones TJ, Crispin SM, Muir P, Harbour DA, Stokes CR (1989):** Clinical and laboratory findings in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Vet Rec* 125: 341-6.
- Jensen WA, Lappin MR, Kamkar S, Reagan WJ (2001):** Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. *Am J Vet Res* 62: 604-608.
- Korman RM, Ceron JJ, Knowles TG, Barker EN, Eckersall PD, Tasker S (2012):** Acute phase response to *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus mycoplasma haemominutum* infection in FIV-infected and non-FIV-infected cats. *Vet J* 193: 433-438.
- Lappin MR (2004):** Haemobartonellosis. Scientific Proceedings of the 29th World Small Animal Congress-WSAVA meeting, Rhodes, 2004.
- Lappin MR, Griffin B, Brunt J, Burney D, Hawley J, Brewer MM, Jensen WA (2006):** Prevalence of Bartonella species, haemoplasma species, Ehrlichia species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. *J Feline Med Surg* 8: 85-90.
- Maede Y, Hata R (1975):** Studies on feline haemobartonellosis. II. The mechanism of anemia produced by infection with *Haemobartonella felis*. *Jpn J Vet Sci* 37: 49-54.
- Maggi RG, Compton SM, Trull CL, Mascarelli PE, Mozayani BR, Breitschwerdt EB (2013):** Infection with hemotropic Mycoplasma species in patients with or without extensive arthropod or animal contact. *J Clin Microbiol* 51: 3237-3241.
- Messick JB (2004):** Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet Clin Pathol* 33(1): 2-13.
- Museux K, Boretti FS, Willi B, Riond B, Hoelzle K, Hoelzle LE, Wittenbrink MM, Tasker S, Wengi N, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R (2009):** In vivo transmission studies of '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' in the domestic cat. *Vet Res* 40(5): 45.
- Namiki K, Goodison S, Porvasnik S, Allan RW, Iczkowski KA, Urbanek C, Reyes L, Sakamoto N, Rosser CJ (2009):** Persistent exposure to *Mycoplasma* induces malignant transformation of human prostate cells. *PLoS ONE* 4: 68-72.
- Obara H, Fujihara M, Watanabe Y, Ono HK, Harasawa R (2011):** A feline hemoplasma, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, detected in dog in Japan. *J Vet Med Sci* 73(6): 841-3.
- Peters IR, Helps CR, Willi B, Hofmann-Lehmann R, Tasker S (2008):** The prevalence of three species of feline hemoplasmas in samples submitted to a diagnostics service as determined by three novel real-time duplex PCR assays. *Vet Microbiol* 126: 142-150.
- Peters IR, Helps CR, Willi B (2011):** Detection of feline hemoplasma species in experimental infections by *in-situ* hybridisation. *Microb Pathog* 50(2): 94.
- Splitter E, Castro E, Kanawyer W (1956):** Feline infectious anemia. *Vet Med* 51:17-22.

- Steer JA, Tasker S, Barker EN, Jensen J, Mitchell J, Stocki T, Chalker VJ, Hamon M (2011):** A novel hemotropic *Mycoplasma* (hemoplasma) in a patient with hemolytic anemia and pyrexia. *Clin Infect Dis* 53: 147-151.
- Sykes JE, Drazenovich NL, Ball LM, Leutenegger CM (2007):** Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats. *J Vet Intern Med* 21:685-693.
- Sykes JE, Lindsay LL, Maggi RG, Breitschwerdt EB (2010):** Human coinfection with *Bartonella henselae* and two hemotropic *Mycoplasma* variants resembling *Mycoplasma ovis*. *J Clin Microbiol* 48: 3782-5.
- Tanahara M, Mi Yamato S, Nishio T, Yoshii Y, Sakuma M, Sakata Y, Nishigaki K, Tsujimoto H, Setoguchi A, Endo Y (2010):** An epidemiological survey of feline hemoplasma infection in Japan. *J Vet Med Sci* 72(12): 1575-81.
- Taroura S, Shimada Y, Sakata Y, Miyama T, Hiraoka H, Watanabe M, Itamoto K, Okuda M, Inokuma H (2005):** Detection of DNA of *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Spiroplasma* sp. in unfed ticks collected from vegetation in Japan. *J Vet Med Sci* 67: 1277-9.
- Tasker S. (2010):** Haemotropic *Mycoplasma*: What's their real significance in cats? *J Feline Med Surg* 12(5): 369-81.
- Tasker S, Binns SH, Day MJ, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA, Helps CR, Jensen WA, Olver CS, Lappin MR. (2010):** Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and "Candidatus *M. haemominutum*" in cats in the United Kingdom. *Vet Rec* 152 (7): 193-8.
- Tasker S, Carney SM, Day MJ (2006):** Effect of chronic feline immunodeficiency infection and efficacy of marbofloxacin treatment on 'Candidatus *Mycoplasma Haemominutum*' infection. *Microbes Infect* 8(3): 653-61.
- Tasker S, Lappin MR (2002):** *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment *J Feline Med Surg* 4: 3-11.
- Tasker S, Peters IR, Papasouliotis K, Cue SM, Willi B, Hofmann-Lehmann R, Gruffydd-Jones TJ, Knowles TG, Day MJ, Helps CR (2009):** Description of outcomes of experimental infection with feline haemoplasmas: copy numbers haematology Coombs' testing and blood glucose concentrations. *Vet Microbiol* 139(3-4): 323-32.
- Tsai S, Wear DJ, Shih JW, Lo SC (1995):** *Mycoplasmas* and oncogenesis: Persistent infection and multistage malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10197-201.
- Tüzzer E, Göksu K, Bilal T, Yeşildere T (1993):** A case of *Haemobartonellosis* in a cat in Istanbul. *The J Protozool Res* 3:69-70.
- Ural K, Kurtdele A, Ulutaş B (2009):** Prevalence of haemoplasma infection in pet cats from 4 different provinces in Turkey. *Revue Méd Vét* 5: 226-30.
- Ural K (2006):** İç Hastalıkları Anabilim Dalı Doktora Tezi. Hemobartonellozisli Kedilerde Klinik Hematolojik Bulgular FIV/FeLV Enfeksiyonları ile Sağaltımda enrofloksasin uygulamaları. Ankara.
- Werner LL (1980):** Coombs positive anemias in the dog and cat. *Compend Contin Educ Pract Vet* 2: 96-101.
- Willi B, Boretti FS, Cattori V, Tasker S, Meli ML, Reusch C, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. (2005):** Identification molecular characterization and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. *J Clin Microb* 43(6): 2581-5.
- Willi B, Tasker S, Boretti FS, Doherr MG, Cattori V, Meli ML, Lobetti RG, Malik R, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R (2006):** Phylogenetic analysis of 'Candidatus *Mycoplasma turicensis*' isolates from pet cats in the United Kingdom Australia and South Africa with analysis of risk factors for infection. *J Clin Microbiol* 44:4430-5.
- Willi B, Boretti FS, Meli ML, Bernasconi MV, Casati S, Hegglin D, Puorger M, Neimark H, Cattori V, Wengi N, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R (2007):** Real-time PZR investigation of potential vectors reservoirs and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. *Appl Environ Microbiol* 73: 3798-802.

Yang H, Qu L, Ma H, Chen L, Liu W, Liu C, Meng L, Wu J, Shou C (2010): Mycoplasma hyorhinis infection in gastric carcinoma and its effects on the malignant phenotypes of gastric cancer cells. BMC Gastroenterol 10: 132.

Zulty JC, Kociba GJ (1990): Cold agglutinins in cats with haemobartonellosis. J Am Vet Med Assoc 196: 907-10.