



Official Publication of  
The Afyon Kocatepe University  
Faculty of Veterinary Medicine

# K o c a t e p e Veterinary Journal

2019, 12(3), September



ISSN: 1308-1594  
e-ISSN: 2147-6853

<http://www.kvj.aku.edu.tr>

**DergiPark**  
AKADEMİK

**ADVISORY BOARDS**

**Publisher**

Prof. Dr. Turan CİVELEK  
Dean  
On behalf of Afyon Kocatepe University  
Faculty of Veterinary Medicine  
Afyonkarahisar - TURKEY

**Editor in Chief**

Assoc. Prof. Dr. Zeki GÜRLER

**Editors**

Assoc. Prof. Dr. Recep KARA  
Assoc. Prof. Dr. Deniz YENİ

**Section Editors**

Prof. Dr. Alpaslan YILDIRIM  
Prof. Dr. Kerem URAL  
Prof. Dr. Sadullah BAHAR  
Prof. Dr. Akın YAKAN  
Prof. Dr. Kemal Kaan TEKİNŞEN

**Foreing Language Editor**

Prof. Dr. İbrahim DEMİRKAN  
Assist. Prof. Dr. Ulaş ACARÖZ

**Statistics Editors**

Assoc. Prof. Dr. İbrahim KILIÇ  
Assist. Prof. Dr. İlky DOĞAN

**Organising Committee**

Prof. Dr. Fatih FİDAN  
Assoc. Prof. Dr. Metin ERDOĞAN  
Assoc. Prof. Dr. Mustafa KABU  
Assoc. Prof. Dr. Fatih AVDATEK  
Dr. Eyüp Eren GÜLTEPE  
Dr. Barış DENK

Prof. Dr. Arif Altuntaş

Prof. Dr. Atilla Şimşek

Prof. Dr. Cevdet Uğuz

Prof. Dr. Yavuz O. Birdane

Prof. Dr. İbrahim Demirkan

Prof. Dr. İlhami Çelik

Prof. Dr. İsmail Bayram

Prof. Dr. Abdullah Kaya

Prof. Dr. Mustafa Alisharlı

Prof. Dr. Nalan Baysu Sözbilir

Prof. Dr. Recep Aslan

Prof. Dr. Seyfullah Haliloğlu

Prof. Dr. Zafer Karaer

Prof. Dr. Zehra Bozkurt

Prof. Dr. İbrahim Taşal

Prof. Dr. Şule Kaya

Prof. Dr. Korhan Altunbaş

Prof. Dr. Aysun Demirkan

Prof. Dr. Hasan Çiçek

Prof. Dr. Fatih M. Birdane

Assoc. Prof. Dr. Süleyman Aypak

Assoc. Prof. Dr. Oktay Yılmaz

Assoc. Prof. Dr. İbrahim Kılıç

Assist. Prof. Dr. M. Fatih Bozkurt

Ankara University -Turkey

Selçuk University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Selçuk University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Selçuk University-Turkey

Ondokuz Mayıs University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Selçuk University-Turkey

Ankara University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Mehmet Akif Ersoy University-Turkey

Mehmet Akif Ersoy University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Adnan Menderes University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

*Kocatepe Veterinary Journal is International an Peer-Reviewed Journal and published four times a year.*

*Kocatepe Veterinary Journal;*

*indexed in TUBİTAK-ULAKBİM TR-Dizin, Turkey Citation Index, CAB Abstract, ResearchBib, SIS (Scientific Indexing Services), CiteFactor, CrossRef, Index Copernicus, Google Scholar, SJIFactor*

*Addressed:*

*Kocatepe Veterinary Journal, Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, 03200, Afyonkarahisar, TURKEY.*

*Tel: +90 272 214 9309 Fax: +90 272 214 9309 E-mail: kvj@aku.edu.tr*

[www.kvj.aku.edu.tr](http://www.kvj.aku.edu.tr)

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

**\*Only accepts online submission\***

**RESEARCH ARTICLES**

<p><b>Investigation of Antibacterial Activities of Ethanol and Methanol Extracts of Some Marine Algae Species on <i>Yersinia ruckeri</i></b> (<i>Bazı Deniz Alg Türlerinin Etanol ve Metanol Ekstraktlarının Antibakteriyel Aktivitelerinin <i>Yersinia ruckeri</i> Üzerinde Araştırılması</i>)</p> <p><b>Jale KORUN, Emine Şükran OKUDAN, Remziye Eda YARDIMCI, Gülşen TİMUR, Aycan ULUTAŞ, Mehmet GÖKOĞLU, Yağmur Saadet ÇELİK, Beytullah Ahmet BALCI</b></p>	226-234
<p><b>Investigation of Some Physicochemical and Microbiological Quality Parameters of Toast Cheese Sold Retail in Afyonkarahisar Province</b> (<i>Afyonkarahisar İlinde Satışa Sunulan Tost Peynirlerinin Bazı Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Kalite Kriterlerinin İncelenmesi</i>)</p> <p><b>Gökhan AKARCA, Oktay TOMAR</b></p>	235-241
<p><b>Detection of Normal Renal and Liver Resistive and Pulsative Index Measurements in Kangal Dogs</b> (<i>Kangal Köpeklerinde Normal İntrarenal ve İntrabepatik Doppler Parametrelerinin Tespiti</i>)</p> <p><b>Lora KOENHEMSİ, Remzi GÖNÜL, Alper BAYRAKAL, Sinem ÜLGEN SAKA, Mehmet Erman OR</b></p>	242-245
<p><b>Investigation of The Interaction Between Milk Urea Nitrogen (MUN) and Some Parameters in Determining The Level of Nutrition in Dairy Cows</b> (<i>Sütcü İneklerde Beslenme Seviyesinin Belirlenmesinde, Sütte Üre Azotu (MUN) ile Bazı Parametreler Arasındaki Etkileşiminin Araştırılması</i>)</p> <p><b>Mehmet TAYTAK, İsmail BAYRAM</b></p>	246-253
<p><b>Investigation of Epidermal Growth Factor (EGF) Levels in Milk of Anatolian Buffaloes with Subclinical Mastitis</b> (<i>Subklinik Mastitisi Anadolu Mandalarında Epidermal Büyüme Faktörü Değerlerinin (EGF) Araştırılması</i>)</p> <p><b>Hande GÜRLER, Gül Fatma YARIM, Seçkin SALAR, Arzu FINDIK, Ayris GÖKÇEOĞLU, Aytaç AKÇAY, Ayhan BAŞTAN</b></p>	254-257
<p><b>Protective Effect of N-Acetylcysteine on The Kidney and Liver Pathology Induced by NMDA Receptor Antagonist Mk-801 in Mice</b> (<i>Farelerde NMDA Reseptör Antagonisti Mk-801 ile Böbrek ve Karaciğerde Oluşan Patolojik Değişikliklere Karşı N-Asetilsisteinin Korumucu Etkisi</i>)</p> <p><b>Murat Sırrı AKOSMAN, Hasan Hüseyin DEMİREL, Ruhi TÜRKMEN</b></p>	258-263
<p><b>Anti-Proliferative Effect of Melamine on Human Colon Adenocarcinoma Cells</b> (<i>Melaminin İnsan Kolon Adenokarsinom Hücreleri Üzerindeki Anti-Proliferatif Etkisi</i>)</p> <p><b>Hidayet TUTUN</b></p>	264-267
<p><b>Evaluation of 25 (OH) D3 Concentrations in Neonatal Calves with Diarrhea</b> (<i>Neonatal İsbilli Buzağularda 25 (OH) D3 Konsantrasyonlarının Araştırılması</i>)</p> <p><b>Tahir ÖZALP, Hasan ERDOĞAN</b></p>	268-276
<p><b>Determination of Risk Factors Associated with Subclinical Mastitis as Detected by California Mastitis Test in Smallholder Dairy Farms in Afyonkarahisar</b> (<i>Afyonkarahisar'da Aile Tipi İşletmelerde California Mastitis Test ile Saptanan Subklinik Mastitis Olguları ile İlişkili Risk Faktörlerinin Belirlenmesi</i>)</p> <p><b>Erhan ÖZENÇ</b></p>	277-283
<p><b>Determination of The Feedlot Performance and Ration Cost in Charolais Breed Heifers Before Insemination</b> (<i>Şarole Irkız Diğerlerinde Tobumlama Öncesi Beslenme Performansını ve Rasyon Maliyetlerinin Belirlenmesi</i>)</p> <p><b>Hıdır GÜMÜŞ, Ahmet Cumhuri AKIN</b></p>	284-291
<p><b>The Comparison of Milking Hygiene with Bulk Tank Somatic Cell Count and Total Bacterial Count in Dairy Herds in Tekirdag Province</b> (<i>Tekirdağ İlinde Bulunan Süt Sığırılığ İşletmelerinde Sağım Hijyeni Uygulamaları ile Tank Sütü Somatik Hücre ve Toplam Bakteri Sayılarının Karşılaştırılması</i>)</p> <p><b>Sıla TOSUN, Duygu BAKI ACAR</b></p>	292-299
<p><b>Research on Occurrence of Mites in Cheese Consumed in Mamak District of Ankara Province</b> (<i>Ankara'nın Mamak İlçesinde Tüketime Sunulan Peynirlerde Akar Varlığının Araştırılması</i>)</p> <p><b>Ayda KARADERE, Bilge KARATEPE</b></p>	300-304

<b>Could Antiparasitic Cure with Clinoptilolite be Achieved in Dogs Naturally Infected with Giardia Duodenalis?</b> ( <i>Giardia Duodenalis ile Doğal Enfekte Köpeklerde Klinoptilolit ile Antiparaziter Kür Sağlanabilir mi?</i> ) Adnan AYAN, Songül ERDOĞAN	305-309
<b>Evaluation of Calf Management and Livability in Dairy Farms in Afyonkarahisar</b> ( <i>Afyonkarahisar Damızlık Süt Sığırcılığında Buzağı Bakımı ve Yaşama Gücünün Değerlendirilmesi</i> ) Kemal YILDIRIM, Serdar KOÇAK	310-316
<b>Incidence of Fascioliasis Invasion and The Effect of The Disease on Some Hematological and Blood Biochemical Parameters in Sheep Breeding in Afyonkarahisar Province</b> ( <i>Afyonkarahisar İlinde Yetiştirilen Koyunlarda Fascioliasis İnvazyonunun Görülme Sıklığı ile Enfeksiyonun Bazı Hematolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi</i> ) Bülent ELİTOK	317-321
<b>Effects of Prepartally Supplements of Vitamins and Trace Elements on Total Antioxidant and Oxidant Status and Udder Health Parameters on Day 14 Postpartum in Holstein-Friesian Cows</b> ( <i>Holstein-Friesian İneklerde Prepartal Vitamin ve İz Element Takviyelerinin Postpartum 14. Günde Toplam Antioksidan ve Oksidan Durumları ve Meme Sağlığı Parametreleri Üzerine Etkileri</i> ) Serdal KURT, Seçkin SALAR, Şükrü KÜPLÜLÜ, Ayhan BAŞTAN	322-328
<b>The Effect of Different Additives on Semen Freezing of Aksaray Malaklı Shepherd Dog</b> ( <i>Farklı Katkı Maddelerinin Aksaray Malaklı Çoban Köpeği Spermalarının Dondurulmasına Etkisi</i> ) Caner ÖZTÜRK, Şükrü GÜNGÖR, Halit Furkan DEMİR	329-335
<b>Investigation of Sox2, <math>\beta</math>-III Tubulin and Nestin Expressions in Neuropsheres Differentiated from Bovine Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells by Immunofluorescence Staining</b> ( <i>Sığırcılık Yağ Dokusundan İzole Edilen Mezenchimal Kök Hücrelerden Farklılaştırılan Nörosferlerde Sox2, <math>\beta</math>-III Tubulin ve Nestin Ekspresyonlarının İmmüno Floresan Boyama Yöntemi ile İncelenmesi</i> ) Özlem ÖZDEN AKKAYA, Tayfun DİKMEN, Shah NAWAZ	336-342
<b>Determination of Helminths of Red Fox (<i>Vulpes vulpes</i>) by Fecal Examination in Middle Anatolia and Thrace</b> ( <i>Orta Anadolu ve Trakya'da Kırmızı Tilki'de (<i>Vulpes vulpes</i>) Dışkı Muayenesine Göre Bulunan Helmint Türleri</i> ) Ali Tümay GÜRLER, Cenk Soner BÖLÜKBAŞ, Mustafa AÇICI, Şinasi UMUR	343-350
<b>Investigation of Cytotoxic Effects of Curcuma Longa, Zingiberaceae and Dianthus Caryophyllus, Which are Commonly Used as Food Supplements in Daily Life</b> ( <i>Günlük Yaşamda Gıda Takviyesi Olarak Kullanılan Zencefil, Zerdeçal ve Karanfilin Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması</i> ) Özgür ALBUZ	351-356
<b>Cervical Insemination with Frozen Thawed Semen in Goats at Different Breeding Age</b> ( <i>Farklı Üreme Yaşındaki Keçilerde Dondurulmuş Sperma ile Servikal Tohumlama</i> ) Koray TEKİN	357-362
<b>Influence of Trolox and Alpha-Lipoic Acid on Post-Thawed Pırlak Ram Sperm Parameters, Oxidative Stress and DNA Damage in Non-Breeding Season</b> ( <i>Sezon Dışı Koç Sperma Sulandırıcısına İlave Edilen Lipoik Asit ve Trolox'un Dondurma ve Çözündürme Sonrası Spermatojik Parametreler, Oksidatif Stres ve DNA Hasarı Üzerine</i> ) Fatih AVDATEK, Deniz YENİ, Muhammed Kürşad BİRDANE, Mustafa GÜNDOĞAN	363-369

## Investigation of Antibacterial Activities of Ethanol and Methanol Extracts of Some Marine Algae Species on *Yersinia ruckeri*

Jale KORUN<sup>1\*</sup>, Emine Şükran OKUDAN<sup>1</sup>, Remziye Eda YARDIMCI<sup>2</sup>, Gülşen TİMUR<sup>2</sup>, Aycan ULUTAŞ<sup>1</sup>, Mehmet GÖKOĞLU<sup>1</sup>, Yağmur Saadet ÇELİK<sup>1</sup>, Beytullah Ahmet BALCI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Akdeniz University, Faculty of Fisheries Campus, Antalya, Turkey

<sup>2</sup>Istanbul University, Faculty of Fisheries Laleli, İstanbul, Turkey

### ABSTRACT

In this study, antibacterial activities of extracts of *Liagora ceranoides* (Rhodophyta), *Halopteris scoparia* (Ocrophyta), *Padina pavonica* (Ocrophyta) and *Sargassum vulgare* (Ocrophyta) on *Yersinia ruckeri* strains isolated from sick rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were evaluated. Also, susceptibilities of the strains against various antibiotics were studied. The strains isolated from the sick fish were identified as *Yersinia ruckeri* according to the results of the phenotypic tests, the API 20E rapid diagnostic kit and PCR. In the study, it was found that the methanol extracts of *L. ceranoides*, *H. scoparia*, *P. pavonica* and *S. vulgare* did not show antibacterial activity against *Y. ruckeri*. The ethanol extract of *P. pavonica* showed low antibacterial activity against *Y. ruckeri*. The ethanol extracts of *L. ceranoides*, *H. scoparia* and *S. vulgare* macroalgae did not show antibacterial activity against the bacterium. According to the results of the antibiogram test, it was found that the strains were sensitive against ampicillin, flumequine, oxytetracycline and trimethoprim. The strains showed intermediate resistance against erythromycine. In conclusion, although it was reported that algae had antibacterial activities, it was understood that every algae species could not exhibit antibacterial activity.

**Keywords:** Rainbow trout, *Yersinia ruckeri*, marine algae, antibacterial activity

\*\*\*

### Bazı Deniz Alg Türlerinin Etanol ve Metanol Ekstraktlarının Antibakteriyel Aktivitelerinin *Yersinia ruckeri* Üzerinde Araştırılması

#### ÖZ

Bu çalışmada *Liagora ceranoides* (Rhodophyta), *Halopteris scoparia* (Ocrophyta), *Padina pavonica* (Ocrophyta) ve *Sargassum vulgare* (Ocrophyta) alglerinin etanol ve metanol ekstraktlarının hasta gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'ndan izole edilen *Yersinia ruckeri* suşları üzerine antibakteriyel aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ayrıca, suşların çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları da çalışılmıştır. Balıklardan izole edilen suşlar fenotipik testler, API 20E hızlı tanı kiti ve PZR sonuçlarına göre *Yersinia ruckeri* olarak tanımlanmıştır. Çalışmada *L. ceranoides*, *H. scoparia*, *P. pavonica* ve *S. vulgare* makroalglerinin metanol ekstraktlarının *Y. ruckeri*'ye karşı antibakteriyel etki göstermediği bulunmuştur. *P. pavonica*'nın etanol ekstraktı *Y. ruckeri*'ye karşı düşük antibakteriyel aktivite göstermiştir. *L. ceranoides*, *H. scoparia* ve *S. vulgare* makroalglerinin etanol ekstraktlarının bakteriye karşı antibakteriyel aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Antibiogram test sonuçlarına göre suşların ampisilin, flumequin, oksitetrasiklin ve trimetoprim duyarlı oldukları bulunmuştur. Suşlar eritromisine karşı orta derecede direnç göstermiştir. Sonuç olarak, alglerin antibakteriyel aktiviteye sahip olduklarının bildirilmesine karşın her alg türünün antibakteriyel aktivite gösteremeyeceği anlaşılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Gökkuşuğu alabalığı, *Yersinia ruckeri*, deniz algleri, antibakteriyel aktivite

To cite this article: Korun J, Okudan E.Ş, Yardımcı R.E, Timur G, Ulutaş A, Gököğlü M, Çelik Y.S, Balcı B.A. Investigation of Antibacterial Activities of Ethanol and Methanol Extracts of Some Marine Algae Species on *Yersinia ruckeri*. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):226-234

Submission: 06.02.2019 Accepted: 09.06.2019 Published Online: 20.07.2019

ORCID ID; JK: 0000-0002-1930-9978, EŞO: 0000-0001-5309-7238, REY: 0000-0001-7737-8739,

AU: 0000-0002-4892-6326, MG: 0000-0001-9723-8581, YSC: 0000-0003-2877-0915, BAB: 0000-0002-6762-3259

\*Corresponding author e-mail: jalekorun@akdeniz.edu.tr

## GİRİŞ

Su ürünleri yetiştiriciliği hızlı gelişme gösteren gıda sektörleri arasında yer almakta olup, dünya genelinde tüketilen balığın yaklaşık olarak %50'si yetiştiricilik yolu ile sağlanmaktadır. Kültür koşullarında görülen bulaşıcı hastalıklar ise sektörün gelişmesine engel olmakla birlikte, birçok ülkenin ekonomik gelişimi üzerinde önemli bir etki yapmaktadır (Kumar ve ark 2015). Bakteriyel enfeksiyonlar ciddi epidemiyolojik faktör olup, gökkuşağı alabalığı kültüründe önemli balık kayıplarına sebep olur (Gohari ve ark 2010, Orozova ve ark 2014). Enterik kızılgağz hastalığı (ERM) ya da diğer ismi ile yersiniozis balıkların sistemik bakteriyel bir enfeksiyonudur. Hastalık etkeni *Yersinia ruckeri*'dir. Etken, ilk olarak 1950'li yılların başında ABD Idaho Hagerman Vadisi'nde yer alan bir alabalık kuluçkahanesindeki hasta balıklardan izole edilmiştir (Horne ve Barnes 1999, Orozova ve ark 2014). *Y. ruckeri*'nin bu ilk izolasyonundan sonra, bakteri başta Alaska olmak üzere ABD'nin batı bölgesi ile Kanada'dan bildirilmiştir. Avrupa da ise *Y. ruckeri* ilk kez 1983 yılında bildirilmiş, daha sonraları Danimarka, Fransa, Almanya, İtalya, Norveç, Birleşik Krallık, Yeni Zelanda ve Afrika olmak üzere birçok ülkeye yayılmış ve salmonid balık türlerinin yanı sıra Nil tilapyası (*Oreochromis niloticus*), kalkan (*Scophthalmus maximus*), sazan (*Cyprinus carpio*), Avrupa yılan balığı (*Anguilla anguilla*) ve Avrupa deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*) dahil doğal ve kültürü yapılan çeşitli balık türlerinden de izole edilmiştir (Huang ve ark 2013, Zorriehzahra ve ark 2017). Ülkemizde ise ilk *Y. ruckeri* kaynaklı hastalık vakası 1991 yılında bildirilmiştir (Timur ve Timur 1991). Alabalık kültürünün yaygınlaşması ile birlikte, hastalık çıkışlarında da artış yaşanmıştır (Şeker ve ark 2011, Öztürk ve Altınok 2014). *Y. ruckeri* Gram-negatif, çomak şekilli, sitokrom oksidaz negatif, katalaz pozitif, fermentatif bir bakteri türüdür. Tür çoğunlukla hareketli olmakla birlikte, hareketlilik özelliği suşlara bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Fouz ve ark 2006, Zorriehzahra ve ark 2017). ERM tüm yaş gruplarındaki balıkları etkilemekle birlikte, hastalığın akut formu çoğunlukla yavru balıklarda gözlenirken, kronik formu ise daha büyük balıklarda gözlenir. Hastalıktan etkilenen balıklar iştahsız, durgun ve su yüzeyine yakın bir şekilde yüzer. Balıkların vücut yüzeyinde kanamalar mevcut ve yaygın olup, bu kanamalara yüzgeçlerin taban kısımlarında, baş bölgesinde ve yan çizgi boyunca rastlanır (Tobback 2009). Nekropside karaciğer, pilorik seka ve hava kesesi ile lateral vücut kaslarında peteşiyel kanamalar, ascites, dalakta büyüme ve renginde koyulaşma gözlenir. Bağırsak yangılı olup, opak ve pürürent bir sıvı ile doludur (Tobback 2009). Hastalığın tedavisinde genel olarak amoksisilin, okzalinik asit, oksitetrasiklin, kuvvetlendirilmiş sülfonamidler ve florfenikolün kullanıldığı bildirilmesine karşın, *Y. ruckeri* de okzalinik asit, oksitetrasiklin ve sülfonamidlere karşı direnç geliştirdiği

yapılan *in vitro* çalışmalar ile ortaya koyulmuştur (Strand 2017, Zorriehzahra ve ark 2017). *Y. ruckeri* de gözlenen antibiyotik direnç, araştırmacıları probiyotik, aşılama ve faj tedavisi gibi koruyucu önlemleri araştırmaya yönlendirmiştir (Strand 2017, Zorriehzahra ve ark 2017). Ayrıca, İran, Hindistan ve Çin gibi birçok ülkede balık patojenlerine karşı bitkilerde kullanılmaya başlanmış ve *Nigella sativa*, *Olea europea* ve *Melissa officinalis* gibi bitkilerin *in vitro* koşullarda antibakteriyel etkileri araştırılmıştır (Zorriehzahra ve ark 2017). Deniz fauna ve florası içerisinde yer alan algler çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir (Kavsalya ve Narasimha, 2015). Alglerin zengin biyoaktif kaynaklar olarak kabul edilmeleri sebebi ile son yıllarda farmasötik ajan kaynakları şeklinde kullanımları yaygınlaşmıştır (Kavsalya ve Narasimha 2015). Birçok deniz alginin bazı Gram-pozitif ve Gram-negatif patojenlerin gelişmesini engellediği bildirilmiştir (Kalanjinathan ve ark 2009). Ülkemizde ise çeşitli alg türlerinin *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Enterococcus* türleri üzerine antibakteriyel aktiviteleri farklı araştırmacılar tarafından çalışılmıştır (Tüney ve ark 2006, Taşkın ve ark 2007). Bu çalışmanın amacı *Liagora ceranoides*, *Halopectis scoparia*, *Padina pavonica* ve *Sargassum vulgare* alg türlerinin metanol ve etanol ekstraktlarının *Y. ruckeri* suşları üzerine antibakteriyel aktivitelerini ayrıca çeşitli antibiyotiklere olan duyarlılıklarını da araştırmaktır.

## MATERYAL ve METOT

### Balık materyali

Çalışma Akdeniz Üniversitesi BAP 201101.0111.001 proje kodu ile desteklenip, 2011.10.01 sayı ile A.Ü. Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurul onayı alınmıştır. Hasta gökkuşağı alabalıkları Antalya civarındaki ticari bir işletmeden temin edilmiştir. İşletmede balıkların bulunduğu havuzların su sıcaklığı 15 °C olarak ölçülmüştür. Çalışmada vücut ağırlıkları 82.9 g'dan 253.44 g'a kadar değişen 10 balıktan örnekleme yapılmıştır. Balıklarda gözlenen dış bulgular kaydedildikten sonra balıklara nekropsi uygulanarak iç bulgular kaydedilmiştir. Bakteriyolojik çalışmalar için balıkların karaciğer, dalak ve ön böbreklerinden beyin kalp infüzyon (BHI) agar'lı besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Ekimli besiyerleri 24 ± 2 °C de 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda besiyerinde gelişme gösteren yuvarlak, krem-beyaz renkli bakteri kolonilerinden altkültürler hazırlanmıştır.

### Bakteri suşlarının fenotipik özelliklerinin tespiti

İzole edilen bakteri suşlarının fenotipik özelliklerinin tespiti için bir dizi test uygulanmıştır (Roberts 2012). Ayrıca, API 20E (BioMerieux, Fransa) hızlı tanı kiti de kullanılmıştır. Kit üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanarak, sonuçlar 24-48 saat sonra okunmuştur. Çalışmalara Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı/Ankara'dan temin edilen ATCC

19570 kodlu *Aeromonas hydrophila* suşu da dahil edilmiştir.

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Fenotipik tanı test sonuçlarına göre *Yersinia ruckeri* şüpheli suşların konfirmasyonunda PZR tekniğinden de yararlanılmıştır. Bu amaçla suşlardan DNA izolasyonu InstaGene Matrix (BioRad) marka ticari kit kullanılarak yapılmıştır. İleri ve geri primerler, YER8 (5'-GCGAGGAGGAAGGGTTAAGTG-3') ve YER10 (5'-GAAGGCACCAAGGCATCTCTG-3') (Gibello ve ark 1999) ticari bir firmaya sentezletirilmiştir. İlk denatürasyon 94 °C de 2 dakika, diğerleri ise 94 °C de 1 dakika, primer bağlanması 55 °C de 1 dakika ve uzama (polimerizasyon) 72 °C de 8 dakika olacak şekilde toplam 35 PZR döngüsü gerçekleştirilmiştir (Şeker ve ark 2012). PZR ürünleri 100 V da 45 dakika yürütülmüş ve yürütme sonrası ürünler görüntülenmiştir. Ürünler 50 ng/ml yoğunluk ve minimum 20 µl olacak şekilde hazırlanmış ve dizi analizi için özel bir laboratuvara gönderilmiştir. Her ürün için DNA saflaştırması ve çift yönlü okuma işlemi yapılarak ham dizi verileri Chromas-Pro 1.7,5 programı ile FASTA formatına çevrilerek temizlenmiş ve tek bir dizi haline getirilmiştir. BLAST analizi uygulaması ile en yakın türler ve benzerlik oranları her bir suş için tespit edilmiştir.

### Bakteri suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının tespiti

Suşların antimikrobiyal duyarlılıkları Mueller-Hinton Agar (MHA)'lı besiyerleri kullanılarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile tespit edilmiştir. İnokulum öncesi sıvı kültürün bulanıklığı McFarland No 0.5 (1-2x10<sup>8</sup>) standardı ile standardize edilerek, MHA'lı petri kutularına inoküle edilmiştir. Petri kutuları oda sıcaklığında 15-20 dakika bekletildikten sonra besiyeri yüzeyine test edilecek olan ticari diskler yerleştirilmiş ve 24 ± 2 °C de 24 ila 28 saat süre ile inkübe edilmiştir. Test sonuçlarına göre suşların çeşitli antibiyotiklere (ampisilin, eritromisin, flumekuin, oksitetrasiklin ve trimetoprim) duyarlılıkları Balta ve ark (2010), CLSI (2006a) ve NCCLS (2003)'e göre belirlenmiştir.

### Deniz makroalglerinin antibakteriyel duyarlılıklarının tespiti

*Liagora ceranoides* J. V. Lamouroux 1816, *Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau 1904, *Padina pavonica* (Linnaeus) Thivy in Taylor 1960 ve *Sargossum vulgare* C. Agardh 1820 makroalg türlerinin (Tablo 1) etanol ve metanol ekstraktlarının *Y. ruckeri* suşları üzerine antibakteriyel aktiviteleri agar difüzyon yöntemi kullanılarak *in vitro* koşullarda çalışılmıştır. Algler Antalya ve Çanakkale kıyılarından SCUBA dalışları ve plankton bezlerinden yapılmış ağzı büzgülü torbalar (70x50 cm) ile toplanmıştır (Şekil 1). Toplanan alg örnekleri epifitlerinden, içlerinde bulunabilecek kaya, kum ve çamurdan arındırılmak amacı ile ayıklanıp tatlı

su ile yıkanmıştır. Ayıklanan alg örnekleri direkt güneş ışığına maruz bırakılmadan gölge bir alanda kurutulmuştur (Şekil 2). Toplanan alg örneklerinin bir kısmı tayin ve tanımları laboratuvarında yapılmak üzere deniz suyu ile hazırlanmış %4-6'lık formaldehit solüsyonunda tespit edilmiştir. Alg materyallerinin tanımlanma çalışması Olympus marka SZX16 model stereo zoom ve BX51 model ışık mikroskopları kullanılarak yapılmıştır. Alglerin etanol ve metanol ekstraktları filtre edilerek örnekler kullanılabildiği kadar +4 °C de muhafaza edilmiştir (Akraiy 2012). Alglerin etanol ve metanol ekstraktları Akraiy (2012)'ye göre hazırlanmıştır. Kısaca, alg örnekleri kurutulduktan sonra öğütücü kullanılarak toz haline getirilmiştir. Öğütme işlemi, her alg örneği için ayrı ayrı yapılmıştır. Toz haline getirilen örneklerin etanol ekstraktlarını elde edebilmek için 150 ml etanol 15 gram toz haldeki alg örneğine ilave edilerek, kaynama noktasına kadar karıştırılarak ısıtılmıştır. Daha sonra solüsyon Whatman No 1 filtre kağıdı kullanılarak filtre edilmiştir. Aynı yöntem alglerin metanol ekstraktlarının eldesi için tekrarlanmıştır. 11 *Y. ruckeri* suşunun 24 saatlik kültüründen 2-3 koloni alınarak 5 ml'lik nutrient buyyona ekimleri yapılarak 24 ± 2°C de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bakteriyel süspansiyonun bulanıklığı 1x10<sup>6</sup> olacak şekilde ayarlanmıştır (Akraiy 2012). Süspansiyondan 0.1 ml alınarak nutrient agarlı petri kutularının yüzeyine aşılacaktır. Daha sonra besiyeri yüzeyine 8 mm çapında delik açılarak içerisine alglerin etanol ve metanol ekstraktlarından 100 µl aktarılacak 24 ± 2°C de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda inhibisyon zon çapları ölçülerek sonuçlar Tuney ve ark (2006) ve Akraiy (2012)'ye göre değerlendirilmiştir. Çalışmada kontrol amaçlı olarak toz haldeki trimetoprim CLSI (M49-A) (2006b) önerileri doğrultusunda çözücü olarak hidroklorik asit kullanılarak stok antibiyotik solüsyonu hazırlanmıştır. Stok antibiyotik solüsyonundan 2 ml alınarak 2 ml sulandırıcı (steril distile su) kullanılarak dilue edilmiştir. Bu solüsyondan 100 µl alınarak ekimli besiyeri yüzeyine açılan 8 mm çapındaki deliklere aktarılacak 24 ± 2°C de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda inhibisyon zon çapı ölçülerek sonuçlar değerlendirilmiştir (NCCLS 2003).

## BULGULAR

### Klinik bulgular

Hastalıktan etkilenen balıklarda durgunluk, yem alımında azalma, pul kaybı, deri renginde koyulaşma, solungaçlarda solgunluk, gözde, çenelerde, ağızda, yutak ve dilde hemorajiler (Şekil 3), anüs etrafında hemoraji ve abdominal dropsi tespit edilmiştir. Nekropsi de vücut kasında, hava kesesi cidarında, pilorik seka ve karaciğerde hemoraji, karaciğerde büyüme ile dalak renginde koyulaşma gözlenmiştir. Hasta balıklarda mide bağırsak içeriği gıda yönünden boş olup, sarımsı renkli asidik sıvı içerdiği tespit edilmiştir.

### ***Yersinia ruckeri* suşunun bakteriyolojik ve moleküler tanımlanması**

Çalışmada izole edilen 11 suşun Gram-negatif, sitokrom oksidaz negatif, katalaz pozitif, 24 °C de hareketli iken 37 °C de hareketsiz olduğu, non-hemolitik, fruktoz, galaktoz, glukoz, mannitol ve mannozdan asit üretirken, arabinoz, inositol ve ksilozdan asit üretmediği tespit edilmiştir. Suşlar *Yersinia* selektif besiyerinde pembe-kırmızı renkli koloniler meydana getirirken, Shotts Waltman (SW) besiyerinde ise etrafında buzlu cam görünümünde olan yeşil renkli kolonileri oluşturdukları saptanmıştır (Tablo 2). Çalışmada suşların API 20E profilleri 5104100/77 olarak bulunmuştur. Bu profilin *Y. ruckeri* için bildirilen profil ile uyumlu olduğu anlaşılmıştır. PZR çalışması sonrası oluşan ürünler %1'lik agaroz jele yüklenerek elektroforez ile yürütülmüş ve UV altında görüntülenen jelde suşların 589 bç'lik ampikon çoğaltımları tespit edilmiştir (Şekil 4). BLAST analizi uygulaması ile en yakın türler ve benzerlik oranları her bir suş için tespit edilmiş ve suşların *Y. ruckeri* ile olan dizi benzerliği %100 olarak bulunmuştur.

### **Suşların antimikrobiyal duyarlılıkları**

Antibiyogram test sonuçlarına göre, 11 suşun Ampisilin'e (inhibisyon zon çapı 20 mm'den 26 mm'e

kadar değişmiştir), Trimetoprim'e (inhibisyon zon çapı 16 mm'den 20 mm'e kadar değişmiştir), Flumekuın (inhibisyon zon çapı 30 mm'den 40 mm'ye kadar değişmiştir) ve Oksitetrasiklin'e (inhibisyon zon çapı 29 mm'den 34 mm'ye kadar değişmiştir) duyarlı oldukları, Eritromisin'e ise (inhibisyon zon çapı 17 mm'den 20 mm'e kadar değişmiştir) orta derecede dirençli oldukları bulunmuştur (Tablo 3).

### **Deniz makroalglerinin antibakteriyel aktiviteleri**

*L. ceranoides* (Rhodophyta), *H. scoparia* (Ocrophyta), *P. pavonica* (Ocrophyta) ve *S. vulgare* (Ocrophyta) alglerinin etanol ve metanol ekstraktlarının *Y. ruckeri* suşları üzerine antibakteriyel aktiviteleri değerlendirildiğinde, yukarıda belirtilen dört alge ait metanol ekstraktlarının suşlar üzerine etkili olmadığı anlaşılmıştır. *P. pavonica*'nın etanol ekstraktının ise düşük inhibitör aktiviteye (10 mm) sahip olduğu ancak *L. ceranoides*, *H. scoparia* ve *S. vulgare*'nin etanol ekstraktlarının ise bakteri üzerinde etkili olmadığı tespit edilmiştir. Suşlar kontrol amaçlı olarak çalışmaya dahil edilen Trimetoprim'in %1'lik konsantrasyonuna karşı hassasiyet gösterdiği (inhibisyon zon çapı 20 mm'den 32 mm'ye kadar değişmiştir) bulunmuştur (Tablo 4).



**Şekil 1.** Makroalglerin SCUBA dalışı ile toplanması

**Figure 1.** Collection of macroalgae by using SCUBA diving



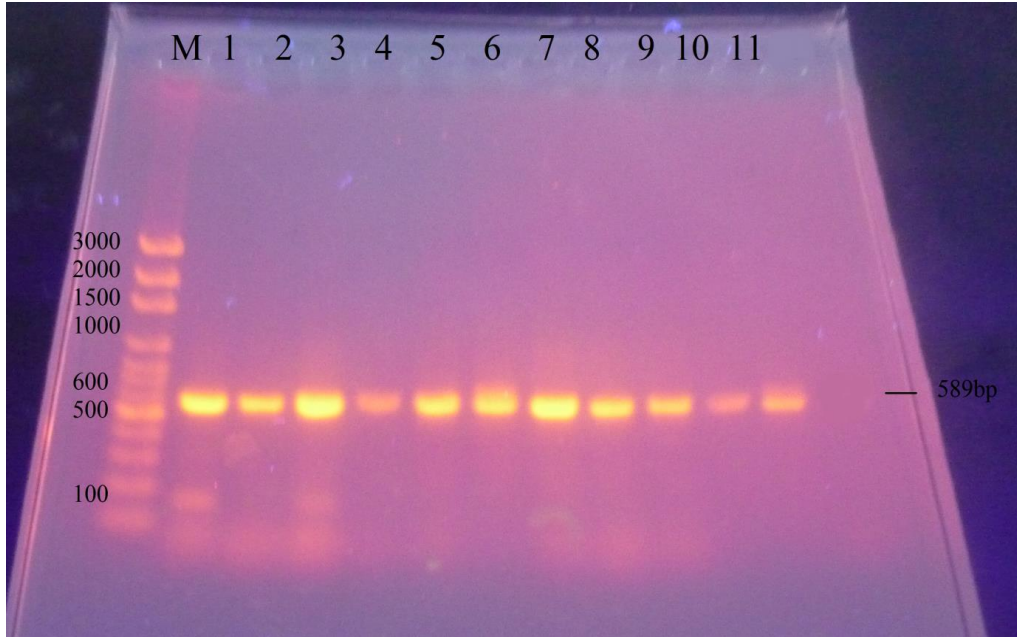
**Şekil 2.** Makroalglerin kurutulma işlemi

**Figure 2.** Drying process of macroalgae





**Şekil 3.** *Y. ruckeri* ile enfekte balıklarda ağızda ve dil üzerinde hemoraji  
**Figure 3.** Hemorrhages on the tongue and mouth of the fish infected with *Y. ruckeri*



**Şekil 4.** 11 *Y. ruckeri* suşunda gözlenen 589 bp'lik bant oluşumu. M: marker.  
**Figure 4.** 589 bp band formation observed in 11 *Y. ruckeri* strains. M: marker.

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan makroalgler.  
**Table 1.** Macroalgae used in the study.

Tür adı	Şehir	Koordinat	Derinlik (m)
<b>Rhodophyta</b>			
<i>Liagora ceranoides</i>	Antalya	36°52'57.15''K 30°40'40.36''D	0-5
<b>Ocrophyta</b>			
<i>Halopteris scoparia</i>	Çanakkale	40°7'34.96''K 26°20'49.84''D	0-1
<i>Padina pavonica</i>	Antalya		5-20
<i>Sargassum vulgare</i>	Antalya	36°49'59.84''K 31°7'28.67''D	

**Tablo 2.** Hasta balıklardan izole edilen *Yersinia ruckeri* suşlarının fenotipik özellikleri  
**Table 2.** Phenotypic characteristics of the *Yersinia ruckeri* strains isolated from diseased fish

Testler	<i>Y. ruckeri</i> suşları (11 suş)	<i>Y. ruckeri</i> (Austin ve Austin, 2012)	<i>A. hydrophila</i> (ATCC 19570)
Gram boyama	-	-	-
<b>Hareket</b>			
24°C	+	+	+
30°C	+		+
37°C	-		-
Sitokrom oksidaz	-	-	+
Katalaz	+	+	+
O/F	F	F	F
H <sub>2</sub> S	-	-	-
Sitrat	D	+	-
onpg*	D	+	+
İndol	+	-	+
MR	+	+	+
VP	-	-	-
Arjinin dihidrolaz	+		-
Lizin dekarboksilaz	+	+	-
Ornitin dekarboksilaz	+	+	-
<b>Şekerlerden asit üretimi</b>			
Arabinoz	-		+
Fruktoz	+	+	-
Galaktoz	+		-
Glukoz	+	+	+
İnositol	-	-	-
Ksiloz	-		-
Mannitol	+	+	-
Mannoz	+		+
Sorbitol	D	-	-
Sukroz	-	-	-
Tween80 hidrolizi	+	-	
Jelatin indirgeme	+	+	+
Nişasta indirgeme	D		+
<b>Farklı tuzluluklarda gelişme</b>			
%0 NaCl	+	+	+
%2 NaCl	+	+	+
%4 NaCl	+		+
%6 NaCl	+		+
%8 NaCl	-		+
<b>Farklı sıcaklıklarda gelişme</b>			
24 °C	+		+
30 °C	+		+
37 °C	+		+
Nitratı indirgeme	+	+	+

+: pozitif, -: negatif, F: fermentatif, onpg: Orto-Nitrofenil-β-Galaktozid

**Tablo 3.** Çalışmada izole edilen 11 *Y. ruckeri* suşunun standart disk difüzyon testine göre antibiyotik duyarlılık sonuçları

**Table 3.** Antibiotic sensitivity results of 11 *Y. ruckeri* strains isolated in the study according to the standard disk diffusion test.

Antibiyotikler	Zon çapı*			Suşlar (11 suş)
	D	I	H	
Ampisilin (10 µg) <sup>a</sup>	≤13	14-16	≥17	H
Eritromisin (15 µg) <sup>b</sup>	≤13	14-22	≥23	I
Flumekuın (30 µg)	d			
Oksitetrasiklin (30 µg) <sup>b</sup>	≤14	15-18	≥19	H
Trimetoprim (5 µg) <sup>c</sup>	≤13	14-16	≥17	H

\* Enterobacteriaceae ve *Y. ruckeri* için bildirilen zon çapları, <sup>a</sup>(Balta ve ark. 2010), <sup>b</sup>(Balta ve ark. 2016), <sup>c</sup>(NCCLS, 2003), H: Hassas, I: Orta derecede dirençli, D: Dirençli, d: *Y. ruckeri* için bildirilmemiştir.

**Tablo 4.** Rhodophyta ve Ocrophyta üyesi alglerin *Y. ruckeri* üzerine antibakteriyel aktiviteleri

**Table 4.** Antibacterial activities of algae of members of Rhodophyta and Ocrophyta on *Y. ruckeri*

Rhodophyta	Çözücü	11 <i>Y. ruckeri</i> suşu
<i>L. ceronoides</i>	metanol	-
<i>H. scoparia</i>	metanol	-
<i>S. vulgare</i>	metanol	-
<b>Ocrophyta</b>		
<i>P. pavonica</i>	metanol	-
<b>Rhodophyta</b>		
<i>L. ceronoides</i>	etanol	-
<i>H. scoparia</i>	etanol	-
<i>S. vulgare</i>	etanol	-
<b>Ocrophyta</b>		
<i>P. pavonica</i>	etanol	+ (10mm)

-: aktivite tespit edilmemiştir; +: düşük aktivite (10 mm zon çapı)

## TARTIŞMA

Algler polisakkarit, tannin, flavoidler, fenolik asit, bromfenoller ve karetonoidler gibi bileşiklerin önemli kaynakları olmakla birlikte, bu bileşiklerin farklı çözücüler ile eriyebilme özelliklerine ve polaritelerine göre farklı antimikrobiyal aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Kausalya ve Narasimha, 2015). Bu nedenle, mevcut çalışmada *L. ceronoides* (Rhodophyta), *H. scoparia* (Ocrophyta), *P. pavonica* (Ocrophyta) ve *S. vulgare* (Ocrophyta) makroalglerinin etanol ve metanol ekstraktlarının hasta gökkuşağı alabalıklarından izole edilen *Y. ruckeri* suşları üzerine antibakteriyel aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca, suşların çeşitli antibiyotiklere olan duyarlılıkları da incelenmiştir.

Çalışmada yersiniozisten etkilenen balıklarda iştahsızlık, deri renginde koyulaşma, solgun solungaçlar, alt ve üst çenelerde, dilde, yüzgeçlerin taban kısımlarında, gözde ve anüs etrafında ve iç organlarda hemorajiler, karaciğerde büyüme ve dalak renginde koyulaşma tespit edilerek, bu bulguların diğer araştırmacıların (Mahjoor ve Akhlaghi 2012, Orozova ve ark 2014) bulguları ile benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır.

Yapılan çalışmada suşların Gram-negatif, fermentatif, sitokrom oksidaz negatif ve katalaz pozitif olduğu,

Tween 80'i hidrolize ettikleri, *Yersinia* selektif besiyerinde pembe kırmızı renkli koloni oluştururken, SW besiyerinde ise etrafında buzlu cam görünümü olan yeşil renkli kolonileri oluşturdukları tespit edilmiştir.

Altun ve ark (2010) izole ettikleri *Y. ruckeri* suşlarının sitokrom oksidaz negatif, katalaz pozitif, fermentatif olduğunu, SW besiyerinde yeşil renkli kolonileri oluşturduğunu ve bu kolonilerin etrafında buzlu cam görünümünde zon geliştiğini ve suşların Tween 80'i hidrolize ettiğini bildirmiştir.

Çalışmada uygulanan PZR tekniği sonrası ürünler %1'lik agaroz jele yüklenerek elektroforez de yürütülmüştür. Görüntüleme 11 *Y. ruckeri* suşunun tümünde 598 bç'lik amplikon çoğaltımının yapıldığı gözlenmiştir. Elde edilen bu bulguların, Şeker ve ark (2012) tarafından *Y. ruckeri* için bildirilen 589 bç'lik moleküler büyüklüğe sahip pozitif örnekler ile uyumlu olduğu anlaşılmıştır.

*Yersinia* cinsi üyeleri için eritromisine karşı doğal direnç bildirilmekle birlikte, *Y. ruckeri*'nin genellikle ampisilin, flumekuın, oksitetrasiklin ve trimetoprime duyarlı olduğu bildirilmiştir (Calvez ve ark. 2014). Orozova ve ark (2014) Bulgaristan da yersiniozisten etkilenen balıklardan izole ettikleri suşların eritromisin

dışında ampisilin, flumekuın, oksitetrasiklin ve trimetoprime duyarlı, eritromisine ise orta derecede dirençli olduğunu tespit etmiştir. Ülkemiz de ise Balta ve ark (2010) çalışmalarında *Y. ruckeri* suşlarının oksitetrasikline en yüksek direnci gösterdiğini, bu direnci sırası ile ampisilin ile okzalınik asidin izlediğini, suşların en düşük direnci ise enroflaksozine gösterdiğini bildirmiştir. Mevcut çalışmada Balta ve ark (2010) ile Orozova ve ark (2014) tarafından *Y. ruckeri* için bildirilen eritromisine direnç, orta direnç şeklinde tespit edilirken, suşların Calvez ve ark (2014) tarafından bildirildiği gibi ampisilin, flumekuın, oksitetrasiklin ve trimetoprime duyarlı olduğu bulunmuştur.

*L. ceranoides* (Rhodophyta), *H. scoparia* (Ocrophyta), *P. pavonica* (Ocrophyta) ve *S. vulgare* (Ocrophyta) makroalglerinin etanol ve metanol ekstraktlarının *Y. ruckeri* üzerine antibakteriyel aktiviteleri değerlendirildiğinde, yukarıda bahsedilen dört alge ait metanol ekstraktlarının *Y. ruckeri* üzerine antibakteriyel yönden etkili olmadığı anlaşılmıştır. *P. pavonica*'nın etanol ekstraktının *Y. ruckeri* üzerinde düşük inhibitör aktiviteye (10 mm) sahip olduğu ancak *L. ceranoides*, *H. scoparia* ve *S. vulgare*'nin etanol ekstraktlarının ise bakteri üzerinde antibakteriyel yönden etkili olmadığı görülmüştür. Çalışmada suşların kontrol amaçlı trimetoprim'in %1'lik konsantrasyonuna karşı duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir (inhibisyon zon çapı 20 mm'den 32 mm'ye kadar değişmiştir). Taşkın ve ark (2007) çalışmalarında Rhodophyta (*Corallina officinalis* Linnaeus 1758), Ocrophyta (*Cystoseira barbata* (Stackhouse) C.Agardh 1820, *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V.Lamouroux 1809, *Halopteris filicina* (Grateloup) Kützting 1843, *Cladostephus spongiosum* f. *verticillatum* (Lightfoot) Prud'homme van Reine 1972) ve Chlorophyta (*Ulva rigida* C.Agardh 1823)'ye ait deniz alglerinin metanol ekstraktlarının *in vitro* olarak Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteri türleri üzerine antibakteriyel etkileri çalışmışlardır. Çalışma sonuçlarına göre, *C. officinalis* dışında diğer alg türlerinin *Staphylococcus aureus* üzerine inhibisyon aktivite göstermiştir. Tüney ve ark (2006) çalışmalarında *P. pavonica*'nın etanol ekstraktlarının *Candida* sp., *Enterococcus faecalis*, *S. aureus* ve *Escherichia coli*'ye karşı zayıf aktivite gösterdiğini bildirirken, *P. pavonica*'nın metanol ekstraktlarının ise antibakteriyel veya antifungal aktivite göstermediğini bildirmiştir. Gonzalez del Val ve ark (2001) 82 deniz alginin antimikrobiyal aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında, Ocrophyta üyelerinin %84'ünün, Rhodophyta üyelerinin %67'sinin ve Chlorophyta üyelerinin %44'ünün üç gram-pozitif, iki gram-negatif ve bir maya türü üzerine etkili olduğunu, *P. pavonica*'nın sadece metanol ekstraktının *B. subtilis* üzerine etkili olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda Gonzalez del Val ve ark (2001)'nin bildirdiğine benzer olarak Ocrophyta üyesi *P. pavonica*'nın etanol ekstraktı *Y. ruckeri*'ye karşı düşük aktiviteye sahip iken, aynı aktivite Rhodophyta üyesi *L. ceranoides*'in etanol

ekstraktında tespit edilememiştir. Çalışmamızda *P. pavonica*'nın etanol ekstraktının *Y. ruckeri*'ye karşı düşük aktivite göstermesi yönünden Tüney ve ark (2006)'nın sonuçları ile benzerlik gösterdiği ancak Gonzalez del Val ve ark (2001)'nin sonuçları ile farklılık gösterdiği anlaşılmıştır.

Sonuç olarak, alglerin antibakteriyel aktivitelerinin bulunduğu bildirilmesine karşın, mevcut çalışmada ve diğer çalışmalarda da olduğu gibi her alg türünün antibakteriyel aktivite gösteremeyeceği, bu durumun ise kullanılan çözücü ve alg türüne göre değişiklik gösterebileceği anlaşılmıştır.

## TEŞEKKÜR

Çalışma Akdeniz Üniversitesi BAP 201101.0111.001 proje kodu ile desteklenmiş, çalışmanın bir kısmı Doğu Anadolu Bölgesi 5. Su Ürünleri Sempozyumu'nda sunulmuş, Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 2011. 10.01. protokol numarası ile Etik Kurul onayı alınarak gerçekleştirilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Akroyi HFS.** Effect of some plant extracts on isolated bacteria from eyelids of natural eye liner users and eye cosmetics users. JAPS. 2012; 2(11): 003-008.
- Altun S, Kubilay A, Diler Ö.** *Yersinia ruckeri* suşlarının fenotipik ve serolojik özelliklerinin incelenmesi. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2010. 16; Suppl-B: 223-229.
- Austin B, Austin DA.** Bacterial fish pathogens; diseases of farmed and wild fish. Springer, 2012, New York, London.
- Balta F, Sandallı C, Kayış S, Özgümüş OB.** Molecular analysis of antimicrobial resistance in *Yersinia ruckeri* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) grown in commercial fish farms in Turkey. Bull Eur Ass Fish Pathol. 2010; 30(16): 211-219.
- Balta F, Balta ZD, Özgümüş OB, Çağırğan H.** Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinde *Yersinia ruckeri*'nin portörlük yönünden tetkiki ve antimikrobiyal direncin tespiti. Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi. 2016; 1(3): 72-76.
- Calvez S, Gantelet H, Blanc G, Dovet DG, Daniel P.** *Yersinia ruckeri* biotypes 1 and 2 in France: presence and antibiotic susceptibility. Dis Aquat Org. 2014; 109: 117-126.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).** Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; Approved Guideline. CLSI Document M42-A. 2006a, USA.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).** Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; Approved Guideline. CLSI document M49-A. 2006b, USA.
- Fouz B, Zarza C, Amaro C.** First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. Journal of Fish Diseases. 2006; 29: 339-346.
- Gibello A, Blanco MM, Moreno MA, Cutuli MT, Domenech A, Domínguez L, Fernández-Garazabal JF.** Development of a PCR assay for detection of *Yersinia*

*ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout. Appl Environ Microbiol. 1999; 65: 346-350.

- Gohari M, Sharifiyazdi H, Akhlaghi M.** Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry tissues, using bacterial culture, simple PCR and nested PCR. Bull Eur Assoc Fish Pathol. 2010; 30(5): 177-184.
- Gonzalez del Val A, Platas G, Basilic A, Cabello A, Garrochategui J, Suay I, Vicente F, Portillo E, Jimenez Del Rio M, Reina GG, Peleaz F.** Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macro algae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). Int Microbiol. 2001; 4: 35-40.
- Horne MT, Barnes AC.** Enteric red mouth disease (*Yersinia ruckeri*). In: Fish Diseases and Disorders-Viral, Bacterial and Fungal Infections, Ed: Woo PTK, Bruno DW., CABI Publishing, UK. 1999; pp. 455-477.
- Huang Y, Runge M, Michael GB, Schwarz S, Jung A, Steinhagen D.** Biochemical and molecular heterogeneity among isolates of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) in north west Germany. BMC Vet Res. 2013; 9: 215-224.
- Kausalya M, Narasimha Rao GM.** Antimicrobial activity of marine algae. J Algal Biomass Utiln. 2015; 6(1): 78-87.
- Kolanjinathan K, Ganesh P, Govindarajan M.** Antibacterial activity of ethanol extracts of seaweeds against fish bacterial pathogens. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2009; 13: 173-177.
- Kumar G, Menanteau-Ledouble S, Saleh M, El-Matbouli M.** *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. Vet Res. 2015;46: 103-113.
- Mahjoor AA, Akhlaghi M.** A pathological study of rainbow trout organs naturally infected with enteric red mouth. Asian J Anim Sci. 2012; 6(3): 147-153.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).** Disk Difüzyon Ek Tablolar. M100-S13 (M2), Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, İstanbul.
- Orozova P, Chikova V, Sirakov I.** Diagnostics and antibiotic resistance of *Yersinia ruckeri* strains isolated from trout fish farms in Bulgaria. IJDR. 2014; 4(12): 2727-2733.
- Öztürk RÇ, Altınok İ.** Bacterial and viral fish diseases in Turkey. Turk J Fish Aquat Sci. 2014; 14: 275-297.
- Roberts RJ.** The Bacteriology of Teleosts, In: Fish pathology, Ed: Roberts RJ, 4th Ed., Blackwell Publishing Ltd, UK. 2012; pp. 339-382.
- Strand A.** Analyses of bacteriophages to *Yersinia ruckeri* and the salmon (*Salmo salar* L.) antibody response to the bacteriophages. MSc. Thesis, Master of Science in Aquamedicine. University of Bergen, Norway, 2017.
- Şeker E, Karahan M, Sarıyüpeoğlu M, Çetinkaya B.** Detection of *Yersinia ruckeri* by polymerase chain reaction (PCR) in infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792). J Anim Plant Sci. 2011; 21(8): 570-574.
- Şeker E, Karahan M, İspir Ü, Çetinkaya B, Sarıyüpeoğlu M.** Investigation of *Y. ruckeri* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) farms by polymerase chain reaction (PCR) and bacteriological culture. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2012; 18(6): 913-916.
- Taşkın E, Öztürk M, Taşkın E, Kurt O.** Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). Afr J Biotechnol. 2007; 6(24): 2746-2751.
- Timur G, Timur M.** An outbreak of enteric red mouth disease in farmed rainbow trout (*O. mykiss*) in Turkey. Bull Eur Assoc Fish Pathol. 1991; 11(5): 182-183.
- Tobback E.** Early pathogenesis of *Yersinia ruckeri* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Ph. Thesis, Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Ghent, 2009.
- Tüney İ, Çadırcı BH, Ünal D, Sukatar A.** Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (İzmir, Turkey). Turk J Biol. 2006; 30: 171-175.
- Zorriehzahra MJ, Adel M, Tarabi Delshad S.** Enteric redmouth disease: past, present and future: a review. IJFS. 2017; 16(4): 1135-1156.

## Investigation of Some Physicochemical and Microbiological Quality Parameters of Toast Cheese Sold Retail in Afyonkarahisar Province

Gökhan AKARCA<sup>1\*</sup>, Oktay TOMAR<sup>1</sup>

Afyon Kocatepe University, Engineering Faculty, Department of Food Engineering, Afyon.

### ABSTRACT

In this study, the physicochemical and microbiological quality of toast cheese offered for sale in markets in the center of Afyonkarahisar province was examined. The acidity (pH) and water activity ( $a_w$ ) values of the samples were determined to be 4.89 and 0.932 on average, respectively. As a result of microbiological analyses, the total aerobic bacteria, total aerobic psychrophilic bacteria, yeast and mold, total coliform group bacteria, lactic acid bacteria counts, *Lactococcus/Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* average counts were determined to be 5.81, 3.30, 4.14, 2.89, 4.69, 4.93, 4.74, 2.42 and <2.00 log CFU/g, respectively. Furthermore, the samples were contaminated in percentages as follows: *Escherichia coli* 24%, *Clostridium perfringens* 8%, *Salmonella* spp. 18%, and *Listeria* spp. 12%, while *Brucella* spp. growth did not occur in the samples.

**Keywords:** Toast cheese, Afyonkarahisar, microbiological quality.

\*\*\*

### Afyonkarahisar İlinde Satışa Sunulan Tost Peynirlerinin Bazı Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Kalite Kriterlerinin İncelenmesi

#### ÖZ

Bu çalışmada Afyonkarahisar il merkezinde marketlerde satışa sunulan tost peynirlerinin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik kaliteleri incelenmiştir. Örneklerin asitlik (pH) ve su aktivitesi ( $a_w$ ) değerleri ortalama olarak, sırasıyla 4.89 ve 0.932 olarak belirlenmiştir. Yapılan mikrobiyolojik analizler sonucunda; toplam aerobik bakteri, toplam aerobik psikrofilik bakteri, Maya Küf, toplam koliform grubu bakteri, laktik asit bakteri sayıları, *Lactococcus/Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ortalama sayıları ise sırasıyla; 5.81, 3.30, 4.14, 2.89, 4.69, 4.93, 4.74, 2.42 ve <2.00 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Ayrıca örneklerin %24'ünde *Escherichia coli*, %8'inde *Clostridium perfringens*, %18'inde *Salmonella* spp. cinsi, %12'sinde *Listeria* spp.cinsi bakteri varlığı belirlenmesine karşın örneklerin hiçbirisinde *Brucella* spp. cinsi bakteri gelişimi tespit edilmemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Tost peyniri, Afyonkarahisar; mikrobiyolojik kalite.

To cite this article: Akarca G, Tomar O. Investigation of Some Physicochemical and Microbiological Quality Parameters of Toast Cheese Sold Retail in Afyonkarahisar Province. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):235-241.

Submission: 24.04.2019 Accepted: 09.06.2019 Published Online: 20.07.2019

ORCID ID; GA: 0000-0002-5055-2722, OT: 0000-0001-5761-7157

\*Corresponding author e-mail: gakarca@aku.edu.tr

## INTRODUCTION

It is stated that cheese with the highest number of types among dairy products has now more than 4000 types in the world (Akin 2010), whereas this accounts for 200 in Turkey (Çetinkaya 2008). Kashar cheese, which is one of the three most produced types of cheese in Turkey and is the most consumed type of cheese following white cheese, can be produced using different processes (Tekinsen 2000). Traditional or ripened (aged) kashar cheese is usually produced artisan ally without machine and is subjected to the ripening process for at least four months at  $18 \pm 2$  °C, before being offered for sale. Nevertheless, the type, which is known as fresh kashar or kashar cheese, is produced with the help of machines and offered for sale without being subjected to the ripening process (Aran 1998).

A kind of processed cheese, which has been called fresh kashar in recent years but has no similarity in the appearance to original fresh kashar, has been offered for sale under the name of fresh kashar. A serious price difference between the two products and the same name of both products have led to confusion among consumers and the emergence of an unfair competition. This cheese has been named “Toast Cheese” by the cheese communicate which was issued in the Turkish Codex (2015), so this confusion has been eliminated (Anonymous 2015).

However, there are no standards for the production of toast cheese in the communiqué. Ingredients which can be added and/or cannot participate in the cheese are not mentioned. This may lead to unfair competition in terms of the producer and health risks (foodborne infections, food poisoning, etc.) for the consumer.

Toast cheese is eventually a kind of processed cheese. And any processed cheese is defined as obtained by heat treatment and deicing salt (such as citrates and phosphates) with the use of hard and semi-hard, or sometimes soft types of cheese (Uçuncu 2004).

In this study, it was aimed to examine some physicochemical and microbiological quality parameters of toast cheeses, offered for sale in markets across Afyonkarahisar province.

## MATERIAL and METHOD

### 2.1. Material

In the study, 50 toast cheese samples were purchased from markets across Afyonkarahisar province, and some physicochemical and microbiological quality parameters were examined. The samples were taken in the containers in which they were offered for sale, and they were transferred to the laboratory under cold conditions ( $4 \pm 0.1$ °C). The samples were stored at  $4 \pm 0.1$ °C until further analyses.

### 2.2. Physicochemical Properties

The water activity of the samples was measured using a Novasina (Lab Touch aw-Switzerland) device (AOAC, 2005a). The pH value of the samples was measured using the Ohaus (ST 5000) device (AOAC, 2005b).

### 2.3. Microbiological Analyses

Total aerobic mesophilic bacteria (TAMB), total aerobic psychrophilic bacteria (TAPB), yeast/mold, total coliform group bacteria (TCGB), Lactic acid bacteria (LAB), *Lactococcus/Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* counts, and the presence of *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *Brucella* spp. were investigated using the spread plate technique on appropriate media (Halkman and Sagdas 2011).

Ten grams of the samples were taken into Stomacher bags (Lp Italiana Spa-174538) under aseptic conditions, and decimal serial dilutions were prepared until  $10^{-7}$  (Anonymous 2001, Sekin and Karagozlu 2004).

The total aerobic mesophilic bacteria (TAMB) and total aerobic psychrophilic bacteria (TAPB) count analysis were performed by the spread plate technique using Plate Count Agar (PCA) (Merck 1.05463). Spread petri plates were incubated at 30°C for 48-72 hours for TAMB count under aerobic conditions (ISO 2013a, ISO 2013b), where TAPB plates were incubated at 4°C for 5-7 days (Halkman and Sagdas 2011).

Rose Bengal Chloramphenicol Agar (Merck 1.00467) (RBC) was used for yeast/mold analysis, and the petri plates were incubated at 22°C for 5-7 days under aerobic conditions (ISO 2008).

Violet Red Bile Agar (Merck 1.01406), de Man Rogosa and Sharpe Agar (MRS) (Merck 1.10661), M-17 Agar (Merck 1.15108) and *Pseudomonas* Selective Agar Base (PSA) (Merck 1.07620) were used for the following analysis: Total coliform group bacteria (TCGB), Lactic acid bacteria (LAB), *Lactococcus/Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp. All petri plates were incubated at 30°C for 24-48 hours under aerobic conditions (ISO 1991, Kneifel and Berger 1994, Corroler et al. 1998, ISO 2010).

The analysis of *Staphylococcus aureus* was performed by the spread plate method using Baird Parker Agar (Merck 1.05406). Plates were incubated at 30-35°C for 24-48 hours under aerobic conditions (ISO 1999). The analysis of *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* were performed by the spread plate method using Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP) (Merck 1.05267) and Chromocult TBX Agar (Merck 1.16122), respectively. The cultivated petri plates were incubated at 37 °C for 24 hours under aerobic

conditions. The colonies growing in the petri dishes were checked under a UV (366 nm) lamp (ISO 2004a, ISO 2001, ISO 2015).

The analysis of *Clostridium perfringens* was performed by the spread plate method using Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) Agar (Merck 1.11972). The petri plates were incubated at 35-37°C for 20-24 hours under anaerobic conditions in the anaerobic jar (Merck 1.16387) (ISO 2004b).

The analysis of *Salmonella* spp. was performed by the spread plate method using Nutrient Broth (NB) (Merck 1.05443), Rappaport Vassiliadis *Salmonella* Enrichment Broth (RVS) (Merck 1.07700), Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose Agar (BPLS) (Merck 1.10747) and Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) (Merck 1.105287). The plates were incubated at 37°C for 24-48 hours under aerobic conditions (Greenwood et al. 1984, Flowers et al. 1992, ISO 2017a).

The analysis of *Listeria* spp. was performed by the spread plate method using Fraser broth (Merck 1.10398) and Oxford Agar (Merck 1.07004). The plates were incubated at 37°C for 24-48 hours under aerobic conditions (ISO 2017b, ISO 2017c).

The analysis of *Brucella* spp. was performed by the spread plate method using Brucella selective supplement (Oxoid SR 83) and Farrell's Agar (Oxoid CM 169). To prevent drying of the medium, the petri dishes were wrapped around with parafilm (3M). The plates were incubated at 37°C for 21 days under conditions with 6% CO<sub>2</sub> (Kara 2011).

## RESULTS

### 3.1. Physicochemical Properties

The aw and pH values of the toast cheese samples are presented in Table 1.

### 3.2. Microbiological Analyses

The microbial load of the samples is shown in Table 2. The presence of some pathogenic bacteria in toast cheese samples is shown in Table 3.

## DISCUSSION

### 4.1. Physicochemical Properties

The aw values of the samples (n=50) were presented in Table 1. It was determined that the aw values of the samples varied between 0.899 and 0.962 and were 0.932 on average (Table 1).

Topal (1987) determined that the aw values of ripened kashar cheese varied between 0.850 and 0.970. Hence, our samples' aw values were lower compared to Topal's (1987) findings. It is thought

that low aw values were caused by various ingredients, which bound water molecules in cheese production.

The pH values of the samples varied between 4.64 and 5.11 (Table 1). Oksuztepe et al. (2009) reported that the pH values of fifty fresh kashar cheese samples, offered for sale in Elazığ, were found to be from 5.01 to 5.92, and the average was  $5.49 \pm 0.32$ . The pH values in our study were lower than those results (Oksuztepe et al., 2009). The difference is caused by the production methods and the selection of additives (e.g. emulsifying salts).

It has been indicated that the properties of raw materials used in toast cheese production, the amount of emulsifying salts used, type, pH value, buffering capacity, calcium chelating properties, etc. are effective on the pH value in the last product (Shirashoji et al. 2006). The results obtained in the present study revealed that the pH of the samples varied between 5.4-5.9 as a result of the hydrolysis, dissolution and some interactions of emulsifying salts used in the production of toast cheese, and the best pH value in the end product is 5.7 (Guinee et al. 2004, Lu et al. 2007).

### 4.2. Microbiological Analyses

Aerobic-mesophilic bacteria constitute the great majority of microorganisms found in foodstuffs. These bacteria do not need specific nutrients, and they can easily grow under neutral and mild acidic conditions (Dogan and Tukul 2000).

It was determined that the TAMB counts of the samples varied between 3.59 and 7.36 log CFU/g, and their average was 5.81 log CFU/g, while TAPB counts varied between 2.30 and 3.90 log CFU/g, and their average was 3.30 log CFU/g (Table 2).

According to a survey held in Elazığ, the microbiological load (TAMB) of fresh kashar cheese samples was as follows: 6.59 log CFU/g (min) and 7.43 log CFU/g (max), and the average was 7.021 log CFU/g (Oksuztepe et al. 2009). At the same time, Cetinkaya and Soyutemiz (2006) investigated the microbiological quality of traditional kashar cheese during the ripening process and reported that the TAPB count varied between 5.04-5.59 log CFU/g.

The results obtained by the researchers were higher than the results obtained in our study. The main reason for the difference may be variation in pH and aw values.

As a result of the yeast-mold count analysis, it was determined that the yeast-mold counts of the samples varied between 2.58 log CFU/g and 7.78 log CFU/g and the average was 4.14 log CFU/g (Table 2). Gulmez et al. (2004) reported that they determined the yeast-mold count to be 8.59 log CFU/g on average in fifty Kars kashar cheese samples marketed



for consumption in Kars province. They found quite higher values when compared to our data. The difference is thought to be due to the processing methods, the additives used in the production and the

physicochemical values (aw, pH, etc.) of the end product.

**Table 1.** aw and pH values of the samples.

Parameter	Samples (n: 50)		
	Minimum	Maximum	Average
aw	0.899	0.962	0.932±0.04
pH	4.64	5.11	4.89±0.29

**Table 2.** Microbial load of the samples (Log CFU/g).

Parameters	Samples (n: 50)		
	Minimum	Maximum	Average
TAMB	3.59	7.36	5.81±0.18
TABP	2.30	3.90	3.30±0.62
Yeast/Mold	2.58	7.78	4.14±0.42
TCGB	NG	3.64	2.89±0.06
LAB	4.06	6.08	4.69±0.36
<i>Lactococcus/Streptococcus</i> spp.	3.88	5.75	4.93±0.14
<i>Pseudomonas</i> spp.	2.65	5.48	4.74±0.71
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 0.1	5.07	2.42±0.12
<i>Bacillus cereus</i>	< 0.1	3.86	1.08±0.02

NG: No Growth, TAMB: Total aerobic bacteria count, TABP: Total aerobic psychrophilic bacteria count, TCGB: Total coliform group bacteria count, LAB: Lactic acid bacteria count.

**Table 3.** The Presence of Some Bacteria in the Samples

Bacteria	Samples (n: 50)	
	Number	%
<i>Escherichia coli</i>	12	24
<i>Clostridium perfringens</i>	4	8
<i>Salmonella</i> spp.	9	18
<i>Listeria</i> spp.	6	12
<i>Brucella</i> spp.	0	0

It was determined that the TCGB counts of toast cheese samples offered for sale across Afyonkarahisar province varied between NG (No Growth) and 3.64 log CFU/g and that the average was 2.89 log CFU/g. Ozdemir and Demirci (2006) investigated the microbiological properties of kashar cheese stored with the addition of potassium sorbate and reported

that they determined the TCGB counts of kashar cheese samples to be 2.54 log CFU/g on average. The results obtained by the researchers are similar to the data obtained in our study.

It was determined that the LAB counts of 50 toast cheese samples, the microbiological quality of which

we examined, varied between 4.06 and 6.08 log CFU/g and that *Lactococcus/Streptococcus* bacteria counts varied between 3.88 and 5.75 log CFU/g. Yilmaz and Dagdemir (2012) indicated that the LAB counts of kashar cheese, ripened for 120 days by being covered with beeswax, on the 5th day of ripening varied between 6.77 and 7.20 log CFU/g and that *Lactococcus/Streptococcus* bacteria counts varied between 6.73 and 7.09 log CFU/g.

The researchers obtained higher data compared to the results of our study. It is thought that this difference is due to the production methods, the presence and number of starter bacteria used in production and the ripening process applied to cheese after production. *Pseudomonas* bacteria are among the most common microorganisms that cause degradation in raw and pasteurized milk and dairy products (Mc Guiggan et al. 1994) and constitute the most important and the most diverse group of bacteria in the world ecologically.

Furthermore, they have the ability to physiologically and genetically adapt to different environmental conditions. Most of these bacteria (58-91%) also have the ability to exhibit enzymatic extracellular proteolytic, lipolytic and phospholipolytic activity (Wijman et al. 2007). The duration of development of *Pseudomonas* is reported to be quite short compared to other psychrotrophic bacteria, and a surviving cell in milk at 4°C would reach 106 CFU/mL within 8 days (Larsen and Jorgensen 1997).

As a result of microbiological analyses, it was determined that *Pseudomonas* spp. counts of toast cheese samples varied between 2.65 and 5.48 log CFU/g and that their average was 4.74 log CFU/g. As a result of *Staphylococcus aureus* analysis performed in 50 toast cheese samples offered for sale in Afyonkarahisar province, it was determined that counts varied between <0.1 and 5.07 CFU/g.

Kocak (2014) investigated the microbiological quality of kashar cheese produced and offered for sale in the dairies in Aydın province and determined the *Staphylococcus aureus* bacteria count to be  $4.14 \pm 0.36$  log CFU/g on average. The values obtained in the study are higher than the values obtained in our study. It is thought that this difference is caused by the differences in the production process steps of cheese, the additives used in production, the differences in physicochemical values of the end product, and the failure to adequately comply with the hygiene and sanitation rules.

*Bacillus cereus* is a Gram (+) spore-forming and enterotoxin (spores are resistant to heat treatment at 63 °C for 30 min) producing bacterium that causes two types of food poisoning (diarrheal and emetic) in humans (Ray and Bhunia 2013, Karagozlu 2017,

Aytac and Taban 2017). It was determined that *Bacillus cereus* bacteria count in toast cheese samples varied between <0.1 and 3.86 log CFU/g and that the average was 1.08 log CFU/g. Piatkiewicz and Fabijanska (1992) reported that they determined *Bacillus cereus* average count to be 2.75 log CFU/g, as a result of the analysis performed in Fromage Fin type cheese.

The analysis results of the presence of *Escherichia coli* in the samples are presented in Table 3. Accordingly, *Escherichia coli* bacterial growth was detected in 12 (24%) of 50 toast cheese samples offered for sale in Afyonkarahisar province. Kocak (2014) reported the presence of *Escherichia coli* in 4 (13.3%) of kashar cheese samples offered for sale in Aydın province. Similarly, Oksuztepe et al. (2009) determined the presence of *Escherichia coli* in 4 (8%) of fresh kashar cheese offered for sale in Elazığ.

The presence of *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. was found in 4 (8%), 9 (18%) and 6 (12%), respectively, of 50 toast cheese samples examined in terms of their microbiological qualities. Nevertheless, *Brucella* spp. growth was not detected in the samples. (Table 3). Turantas et al. (1989) reported that they did not observe *Clostridium perfringens* growth in 38 white cheese samples offered for sale in Izmir province. Similarly, Cetin et al. (2015) reported that they did not find the presence of *Salmonella* spp. in 17 kashar cheese samples offered for sale in Kırklareli province, and *Listeria monocytogenes* grown was reported in one sample.

It is thought that the differences among the relevant studies are various heat treatment norms applied in cheese production, processing differences, and the failure to adequately comply with the hygiene and sanitation rules in the production and packaging stages.

## CONCLUSION

The reasons such as the lack of a certain standard in the production of toast cheese, inadequate or no heat treatment applied to the milk used in the production of cheese, the use of too many additives, relatively low temperature applied to curdling, the failure to pay adequate attention to hygiene and sanitation rules in the process stages, and the microbial contaminations resulting from misapplications in storage, transportation and sales conditions may negatively affect the microbiological quality of cheese.

Many numbers and types of pathogenic bacteria, such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria*, and *Brucella*, could be present in the milk to be processed into cheese. These bacteria can change the characteristic features of cheese and may also cause poisoning and diseases as a result of their consumption. Therefore, since the consumption of cheese made with raw milk or insufficient heat

treatment may be risky, the milk to be processed into cheese should be pasteurized at the appropriate temperature and time.

As a result of the microbiological analyses performed, it was determined that especially the microbiological quality of toast cheese samples offered for sale in Afyonkarahisar province was generally low and was not in conformity with the criteria specified in the Turkish food codex communique on microbiological criteria and that the consumption of these cheeses could pose a risk for public health.

## REFERENCES

- Akin N.** Basic Cheese Science-1: Basic Topics. Damla Ofset Publications, Konya, Turkey. 2010. (In Turkish).
- Anonymous.** Turkish Standards Institute. TS 6235 EN ISO 6887-1. Microbiology of Food and Animal Feed General Rules of The Initial Suspension and Decimal Dilutions of Test Samples Preparation. 2001.
- Anonymous.** Turkish Food Codex. Cheese Communiqué, Communiqué No: 2015/6. 2015.
- AOAC.** Official methods of analysis of the AOAC. (18th ed.). 978.18. Washington: Association of Official Analytical Chemists. 2005a.
- AOAC.** Official methods of analysis of the AOAC. (18th ed.). 981.12. Washington: Association of Official Analytical Chemists. 2005b.
- Aran N.** A microbial study of Kashar cheese. *Milchwissenschaft*. 1998; 53: 565–567.
- Aytac SA, Taban BM.** Food-Borne Intoxications, In: Food Microbiology, Ed; Erkmén O. 5th Ed., Efil Publishing House, Ankara, Turkey. 2017; pp.155-156. (In Turkish).
- Cetin B, Karasu S, Atik A, Durak MZ.** Investigation of microbiological quality of some dairy products in Kırklareli: Detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* by Real Time PCR. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*. 2015; 12(1): 74-80.
- Cetinkaya A.** Our Traditional Chesses. Abp Press, İstanbul, Turkey. 2008. (In Turkish).
- Cetinkaya F, Soyutemiz GE.** Microbiological and chemical changes throughout the manufacture and ripening of Kashar: a traditional Turkish cheese. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2006; 30: 397-404.
- Corroler D, Mangin I, Desmasure N, Gueguen M.** An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese registered designation of origin area. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64(12): 4729–4735.
- Dogan HB, Tukul Cİ.** Total (aerobic mesophilic) bacteria. *Food Microbiology and applications*, 2nd Ed., Sim Printing Co, Ankara, Turkey. 2000; pp. 323-328. (In Turkish).
- Flowers RS, D'aust JY, Andrews WH, Bailey JS.** *Salmonella* In: Compendium of the Methods for the Microbiological Examinations of Foods. Eds; Vanderzant C, Spiltstoesser DF. American Public Health Association. 1992; pp. 371-422.
- Greenwood MH, Coetzee EF, Ford BM, Gill P, Hooper WL, Matthews SCV, Patrick S.** The microbiology of selected retail food products with an evolution of vialable counting methods. *Journal of Hygiene*. 1984; 92: 67-77.
- Guinee TP, Caric M, Kalab M.** Pasteurized Processed Cheese and Substitute/Imitation Cheese Products, In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Major Cheese Groups. Fox PF. Elsevier Applied Science, London, U.K. 2004; pp. 349-394.
- Gulmez M, Oral N, Guven A, Baz E, Sezer C, Duman B.** Some microbiological and chemical properties of kashar cheese sold in Kars. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University*. 2004; 10 (2): 183-188.
- Halkman K, Sagdas OE.** Food Microbiology Applications. Prosigma Printing and Promotional Services, Ankara, Turkey. 2011. (In Turkish).
- ISO.** International Standard Organization. 4832, General guidance for the enumeration of coliforms colony count technique. Geneva, Switzerland. 1991.
- ISO.** International Standard Organization. 6888-1, Horizontal method for the enumeration of coagulase- positive staphylococci technique using Baird Parker agar medium. Geneva, Switzerland. 1999.
- ISO.** International Standard Organization. 16649-1:2001, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli*, Part 1: Colony count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. Geneva, Switzerland. 2001.
- ISO.** International Standard Organization. 7932:2004, Microbiology of food and animal feeding stuffs, Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*, Colony count technique at 30 degrees C. Geneva, Switzerland. 2004a.
- ISO.** International Standard Organization. 7937:2004, Microbiology of food and animal feeding stuffs, Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens*, Colony count technique. Geneva, Switzerland. 2004b.
- ISO.** International Standard Organization. 21527-1:2008, Microbiology of food and animal feeding stuffs, Horizontal method for the enumeration of yeasts and molds, Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95. Geneva, Switzerland. 2008.
- ISO.** International Standard Organization. 13720:2010, specifies a method for the enumeration of presumptive *Pseudomonas* spp. present in meat and meat products, including poultry. Geneva, Switzerland. 2010.
- ISO.** International Standard Organization. 4833-1:2013, Microbiology of the food chain, Horizontal method for the enumeration of microorganisms, Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. Geneva, Switzerland. 2013a.
- ISO.** International Standard Organization. 4833-2:2013, Horizontal method for the enumeration of microorganisms, Part 2: Colony count at 30 degrees C by the surface plating technique. Geneva, Switzerland. 2013b.
- ISO.** International Standard Organization. 16649-3:2015, Microbiology of the food chain, Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli*, Part 3: Detection and most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide. Geneva, Switzerland. 2015.
- ISO.** International Standard Organization. 6579-1:2017, Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*. Geneva, Switzerland. 2017a.

- ISO.** International Standard Organization. 11290-1:2017, Microbiology of the food chain, Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. Part 1: Detection method. Geneva, Switzerland. 2017b.
- ISO.** International Standard Organization. 11290-2:2017, Microbiology of the food chain, Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. , Part 2: Enumeration method. Geneva, Switzerland. 2017c.
- Kara R.** A traditional cheese: characterization of Afyon Tulum cheese and investigation of reproduction and viability of empirically inoculated *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* strains. PhD thesis, Afyon Kocatepe University Health Sciences Institute, Afyonkarahisar, 2011.
- Karagozlu N.** Food Borne Toxi infections. In: Food Microbiology, Ed; Erkmn O. 5th Ed., Efil Publishing House, Ankara, Turkey. 2017; pp.155-156. (In Turkish).
- Kneifel W, Berger E.** Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian market. J Food Protection. 1994; 57(10): 893-901.
- Kocak P.** Investigation of microbiological quality of White, Tulum, Kashar and Lor cheeses produced in dairy factories and sold in Aydin province. Msc. Thesis, Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Aydin. 2014.
- Larsen HD, Jørgensen K.** The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. International Journal of Food Microbiology. 1997; 34: 179- 186.
- Lu Y, Shirashoji N, Lucey JA.** Rheological, textural and melting properties of commercial samples of some of the different types of pasteurized processed cheese. International Journal of Dairy Technology, 2007; 60: 74-80.
- McGuiggan JM, Gilmour A, Lawrence ML.** Factors influencing the recovery of psychotropic, mesophilic and thermophilic *Bacillus* spp. from bulk raw milk. Journal of the Society of Dairy Technology. 1994; 47: 111- 116.
- Oksuztepe G, Patir B, Dikici A, Ilhak OI.** Microbiological and chemical quality of vacuum packaged fresh Kashar cheese in Elazığ. Fırat University Medical Journal of Health Sciences. 2009; 23(2): 89 – 94.
- Ozdemir C, Demirci M.** Selected microbiological properties of Kashar cheese samples preserved with potassium sorbate. International Journal of Food Properties. 2006; 9: 515–521.
- Piatkiewicz A, Fabijanska E.** Microbial contamination of Fromaje Fin type cheese. 3rd world congress. Foodborne infection and intoxications. Vol. 2. 16-19 june, Berlin.1992. pp. 1028- 1030.
- Ray B, Rhunia A.** Basic Food Microbiology. 5th edition CRC. press. Boca Raton, London, New York. 2013.
- Sekin Y, Karagozlu N.** Food Microbiology. Basic Principles and Applications for Food. Industry Literature Publication, İstanbul, Turkey. 2004.
- Shirashoji N, Abe T, Takahashi K, Iwatsuki K.** 2006. Influence of emulsifying salts on functionality of sliced process cheese. Journal of Dairy Science. 2006; 89 (1): 423.
- Tekinsen OC.** Dairy Technology. Selçuk University Veterinary Faculty Publication. Konya, Turkey. 2000. (In Turkish).
- Topal Ş.** Risks of surface molds and mycotoxins in Kashar at the cheese ripening stage. Food. 1987; 12(3): 199-207.
- Turantas F, Unluturk A, Goktan D.** Microbiological and compositional status of Turkish White cheese. International Journal of Food Microbiology. 1989; 8(1): 19-24.
- Uçuncu M.** A to Z Cheese Technology. Volume I. Ege University Meta Printing House, Izmir, Turkey. 2004. (in Turkish).
- Wijman JGE, de Leeuw PPLA, Moezelaar R, Zwietering MH, Abbe T.** Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation and dispersion. Applied and Environmental Microbiology. 2007; 73: 1481-1488.
- Yilmaz F, Dagdemir E.** The effects of beeswax coating on quality of Kashar cheese during ripening. international Journal of Food Science and Technology. 2012; 47: 2582–2589.

## Detection of Normal Renal and Liver Resistive and Pulsative Index Measurements in Kangal Dogs

Lora KOENHEMSİ\*, Remzi GÖNÜL<sup>1</sup>, Alper BAYRAKAL<sup>1</sup>, Sinem ÜLGEN SAKA<sup>1</sup>,  
Mehmet Erman OR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istanbul University-Cerrahpaşa, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, 34000, Istanbul - Turkey

### ABSTRACT

Doppler ultrasonography is one of the tools that started to use recently in human and veterinary medicine for this purpose. Currently, there are many studies to investigate methods of earlier diagnosis of prognosis of renal and hepatic diseases. However there is stil no consensus among researchers about the normal values. To our knowledge no systematical research exits revealing the normal values of Kangal breed dogs. Our purpose in this research is to determine the normal renal and hepatic doppler values of Kangal breed. For this purpose, 30 Turkish Kangal dogs and 20 healty dogs from several breeds were included to the study. The mean value of renal resistive index (RI) and pulsative index (PI) were  $0,65 \pm 0,04$  and  $1.13 \pm 0,05$  for Turkish Kangal dogs;  $0,64 \pm 0,08$  and  $1.12 \pm 0,05$  for different breed dogs. For the hepatic RI and PI values  $0,65 \pm 0,04$  and  $1.16 \pm 0,03$  for Turkish Kangal dogs;  $0.63 \pm 0,04$  and  $1.15 \pm 0.04$  for different breed dogs respectively. The hepatic and renal PI and RI values of Kangal dogs were found to be compatible with other breeds.

**Keywords:** hepatic doppler, renal doppler, Kangal Dogs

\*\*\*

### Kangal Köpeklerinde Normal İntrarenal ve İntrahepatik Doppler Parametrelerinin Tespiti

#### ÖZ

Doppler ultrasonografi son zamanlarda insan hekimliği ve veteriner hekimlikte bu amaçla kullanılmaya başlanan araçlardan biridir. Halen, böbrek ve karaciğer hastalıklarının prognozunun erken teşhisi yöntemlerini araştıran birçok çalışma vardır. Ancak, araştırmacılar arasında normal değerler hakkında hala bir fikir birliği yoktur. Bildiğimiz kadarıyla Kangal cinsi köpeklerin normal değerlerini ortaya koyan hiçbir sistematik araştırma yapılmamıştır. Bu araştırmadaki amacımız Kangal ırkının normal böbrek ve karaciğer doppler değerlerini belirlemektir. Bu amaçla 30 Türk Kangal köpeği ve çeşitli ırklardan 20 sağlıklı köpek çalışmaya dahil edildi. Türk Kangal köpekleri için renal RI (rezistif indeks) ve PI (pulzatif indeks) ortalama değeri  $0,65 \pm 0,04$  ve  $1,13 \pm 0,05$ ; farklı cins köpekler için ise  $0,64 \pm 0,08$  ve  $1,12 \pm 0,05$  olarak belirlendi. Karaciğer için RI ve PI değerleri Türk kangal köpeklerinde  $0,65 \pm 0,04$  ve  $1.16 \pm 0,03$  olarak belirlenirken diğer köpeklerde ;  $0.63 \pm 0,04$  ve  $1.15 \pm 0.04$  olarak saptandı. Kangal köpeklerinin hepatic ve renal PI ve RI değerleri diğer ırklarla uyumlu bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** hepatic doppler, renal doppler, Kangal Köpekleri

To cite this article: Koenbemsı L, Gönül R, Bayrakal A, Ülgen Saka S, Or M.E. Detection of Normal Renal and Liver Resistive and Pulsative Index Measurements in Kangal Dogs. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):242-245.

Submission: 29.01.2019

Accepted: 17.07.2019

Published Online: 16.08.2019

ORCID ID; LR: 0000-0002-4979-170X, RG: 0000-0001-9425-0964, AB: 0000-0003-4002-435X,

SÜS: 0000-0002-2198-6396, MEO: 0000-0002-8764-1956

\*Corresponding author e-mail: lomekh@istanbul.edu.tr

## INTRODUCTION

Hepatic and renal diseases are one of the important causes of death in small animals. Early detection of renal or hepatic disease has an important role in the prognosis and treatment. There were too many diagnostic tools including function tests, serum electrolyte concentrations and acid-base status, urinalysis, and imaging studies used for this reason. Eventhough these tools were the hints of the disease may be present, they do not necessarily confirm the presence of the diseases (Brown et al. 1997, Polzin 2011).

Grey-scale ultrasonography (US) is one of the sensitive method for non-invasive morphologic evaluation of organs, however in many cases differential diagnosis can't be done alone with US findings (Rivers et al. 1997, Tipisca et al. 2015). Duplex Doppler US is an ancillary diagnostic technique that adds determination of the blood flow to this evaluations. Disease alter the blood flow may detected via this method (Rivers et al. 1997).

A number of studies have demonstrated the use of Doppler US in kidney and hepatic diseases in animals recently. Resistive index (RI) and Pulsatility index (PI) values that estimate the vascular resistance within an artery were calculated by many researchers (Lamb et al. 1990, Novellas et al. 2007). The RI and PI have been used to evaluate changes in vascular resistance due to urinary obstruction, acute and chronic renal failure, congenital dysplasia and hepatic disease (Novellas et al. 2007, Tipisca et al.2015). Additionally renal doppler changes investigated in dogs with pyometra and hepatic disease (Koenhemi et al. 2016, Novellas et al. 2008). However sedation, anesthesia or hypertension may change this values (Novellas et al. 2007).

Knowledge of the normal values is important to recognize and diagnose alterations that may occur in renal and liver disease. Since sizes and weights are changing occurring to the different breeds in dogs, it is important to know whether these normal values differ between dogs according to weight (Sartor et al. 2010). Kangal dog is a special breed of shephard dogs originating from Sivas. They are one of the largest dogs weighting 50-63 kg. No studies could be found in literature with regard to normal values of renal and hepatic doppler measurements in Kangal dog breeds. The purpose of this study is to determine the normal values of intrarenal and intrahepatic doppler measurements in non-sedated clinically normal Kangal dogs.

## MATERIALS and METHODS

### Animals

30 Kangal dogs and 20 healthy dogs from several breeds were included to the study. Dogs aging under

1 yearold were excluded from the study. Dogs with conditions that may affect hemodynamic measurements, such as heart failure, hypertension, liver and renal disease were not included in the study. All animals were healthy according to physical examination, routine blood works , (including complete blood cell count, glucose, Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALKP), total protein, albumin, blood urea nitrogen (BUN), and Creatinine) and urianalysis. All dogs were from different age and sex. Dogs were fasted before the examinations; water was present during this time.

### Doppler Ultrasonography

Dogs were not sedated for ultrasonography (US) examination. Doppler US was performed with a SIUI Apogee 3500V doppler ultrasound machine. Different transducers and frequencies (4-10 mHz) were used depending on animal weight. Hair was clipped and acoustic gel was applied to the skin. US performed with the dogs in dorsal or lateral recumbency. After color doppler was used to visualize the vasculature, skipped to Pulsed Doppler US. Doppler waveforms obtained in renal artery, interlobar or arcuate arteries for renal doppler measurements and right hepatic arterial intrahepatic branch for hepatic doppler measurements. The smallest scale that displayed the flow without overlap was selected. The sample gate was adjusted individually for insonation of the whole vessel. The angle between the Doppler beam and the blood flow was below 60°. The resistive index (RI) and pulsative index (PI) were calculated automatically by the software of the ultrasound machine. Three arterial waves were measured and the values averaged to produce the result for each dog. All US examinations were performed by the same person.

Results were compared using Students t test. A commercial software package (SPSS 10.0) was used to analyze data. Differences of  $p < 0.5$  were considered significant.

## RESULTS

The group of dogs from several breeds comprised 20 animals (12 males, eight females); seven Golden Retriever, five German Shepherd, five mixed breed, 2 Chow chow, 1 pekingese. The mean age of the healthy group was 7 years (range 1-16 years-old). The mean weight of the dogs were 20 kg. The group of Kangal Dogs comprised 30 dogs (24 males, 6 females). The mean age of Kangal Dogs was 6 years (range 1-13 years-old). The mean weight of the dogs were 52 kg.

All dogs were clinically normal and had normal routine blood work (RBCand urinalysis results. In

addition to this ultrasonographic examinations were normal.

Intrarenal and intrahepatic RI and PI values were obtained from all animals. The mean value of renal RI and PI were  $0,65\pm0,04$  and  $1.13\pm0,05$  for Kangal dogs;  $0,64\pm0,08$  and  $1.12\pm0,05$  for mixed-breed dogs.

For the hepatic RI and PI values  $0,65\pm0,04$  and  $1.16\pm0,03$  for Kangal dogs;  $0.63\pm0,04$  and  $1.15\pm0.04$  respectively. The results are summarized in Table 1-2. No significant differences were found between Kangal dogs and mixed breed dogs.

**Table 1.** Routine blood work of Kangal and Mixed breed dogs

	Kangal	Mixed Breed	Normal Values
RBC (X 10 <sup>6</sup> µL)	7,2	7	5,65-8,87
HGB (g/dl)	15,2	17,5	13,1-20,5
HCT (%)	34,2	38,9	37,3-61,7
WBC (X10 <sup>3</sup> µL)	11,45	13,2	5,05-16,76
PLT (X10 <sup>3</sup> µL)	252	320	148-484
MCV	65,3	66,2	61,6-73,5
MCH (pg)	24,2	22,2	21,2-25,9
MCHC (%)	34,2	35,2	32-37,9
ALT (IU/L)	45	39	10-125
AST (IU/L)	26	29	5-50
ALP (U/L)	107	98	23-212
BUN (mg/dl)	9	8,4	7-27
CREATİNİN (mg/dl)	1	0,9	0,5-1,8
GLUCOSE (mg/dl)	95	90	70-143

**Table 2.** Intrarenal and intrahepatic RI and PI values in Kangal and mixed breed dogs.

	Kangal Dogs (n=30)	Mixed-Breed Dogs (n=20)
Renal RI	$0,65\pm0,04$	$0,64\pm0,08$
Renal PI	$1.13\pm0,05$	$1.12\pm0,05$
Hepatic RI	$0,65\pm0,04$	$0.63\pm0,04$
Hepatic PI	$1.16\pm0,03$	$1.15\pm0.04$

## DISCUSSION

RI and PI are unitless ratio, but critical for accurate velocity measurements. There are a few studies related with the normal values of hepatic arteries of dogs. Proposed upper limits differ from 0.70 to 0.73 in previous studies for renal RI in dogs [Novellas et al. 2007, Rivers et al. 1997]. Novellas et al. (2007) concluded that baseline values for intrarenal PI was 1.52 in healthy dogs. Lamb et al. (1999) have been reported the normal values of RI within hepatic artery in fasted dogs and found 0.68 (range 0.62-0.74). However normal hepatic PI values did not calculated in this study (Lamb et al. 1999). The intrarenal RI and PI values obtained in this study are similar to those

obtained by Novellas et al. (Novellas et al. 2007). Furthermore hepatic RI values were within the normal range given by Lamb et al. (1999).

A study have been reported of 60 obese and 20 healthy adults, a statistically significant reduction in mean flow velocity, peak velocity, minimum velocity and pulsatility was found in the portal vein of the patients (Erdoğan et al. 2008). Erdoğan et al. (2008), concluded that this was due to reduction of vascular compliance as a result of fat infiltration into the liver. Similar results were concluded in another study made by Sartor et al. (2010). Right portal vein of the healthy dogs of different body weights were evaluated in this study and mean flow velocity,

volume, and congestion index were influenced by body weight. RI and PI from hepatic arteries were measured in our study and there was no association between body weight and this parameters.

Lubomirova et al. (2007), evaluated the patients with hypertension and obesity with renal doppler USG. RI levels was within the normal limits and there was no significant differences between groups (Lubomirova et al. 2007). Also Ostrowska et al. (2016), concluded that no statistically significant relationship between renal RI and body weight of the healthy dogs. In our study, we compared large breed Kangal dogs with several breeds, and no statistically significant difference was observed. Additionally, all renal and hepatic doppler measurements were within normal limits.

Although Lamb et al. (1999) concluded that hepatic arterial and portal blood flow occur normally in dogs after feeding, all dogs were fasted because hepatic RI increases markedly after feeding in human studies. The main reason is hepatic arterial vasoconstriction occurs to decrease portal flow that stimulated by feeding (Lamb et al. 1999). Furthermore hypertension, sedation/anesthesia and heart rate problems can change the RI results (Novellas et al. 2007). So that dogs with hypertension or heart rate problems were excluded from this study.

## CONCLUSIONS

Duplex Doppler ultrasonography is a quick and noninvasive method for examination of the liver and kidneys. In this study, normal values for intrarenal and intrahepatic RI and PI in non-sedated clinically healthy Kangal Dogs were determined. As a result, we determined that, they were in similar limits as previously described by other researchers. Further studies are warrant for better understanding the usage of these parameters in animals.

## REFERENCES

- Brown SA, Crowell WA, Brown CA, Barsanti JA, Finco DR.** Pathophysiology and management of progressive renal disease. *Vet J.* 1997; 154: 93-109.
- Chang YJ, Chan IP, Cheng FP, Wang WS, Liu PC, Lin SH.** Relationship between age, plasma renin activity, and renal resistive index in dogs. *Vet Rad & Ultrasound.* 2010; 51: 335-337.
- Erdoğan B, Tamer A, Büyükkaya R, Yazıcı B, Büyükkaya A, Korkut E, Alçelik A, Korkmaz U.** Portal vein hemodynamics in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Tohoku J Exp Med.* 2008; 215: 89-93.
- Gonul R, Koenhemi L, Bayrakal A, Bahceci T, Or ME, Uysal A.** Renal Pulsed-wave doppler ultrasonographic findings of normal Turkish Angora cats. *Pak Vet J.* 2011; 31(4): 369-370.
- Koenhemi L, Toydemir S, Uçmak M, Gönül R, Or ME.** Evaluation of early renal disease in bitches with pyometra

based on renal doppler measurements. *VETMED.* 2016; 61(6): 344-347.

- Lamb CR, Burton CA, Carlisle CH.** Doppler measurements of hepatic arterial flow in dogs: technique and preliminary findings. *Vet Rad & Ultrasound.* 1999; 40(1): 77-81.
- Lubomirova M., Djerassi R., Kiperova B., Boyanov M., Christov V.** Renal doppler ultrasound in patients with hypertension and metabolic syndrom. *Meg Pregl.* 2007; 60(2): 84-86.
- Novellas R, Espada Y, Ruiz De Gopegui R.** Doppler ultrasonographic estimation of renal and ocular resistive and pulsatility indices in normal dogs and cats. *Vet Rad & Ultrasound.* 2007; 48(1): 69-73.
- Novellas R, Gopegui RR, Espada Y.** Increased renal vascular resistance in dogs with hepatic disease. *Vet J.* 2008; 178: 255-260.
- Osrowska J, Kielbowicz Z, Zaleska-Dorobisz U, Atamaniuk W, Pietsch-Fulbiszewka A, Kinda W.** Resistive index (RI) obtained in renal interlobar arteries of normal dogs and cats by means of doppler ultrasonography. *Pak Vet J.* 2016; 36(1): 45-48.
- Polzin DJ.** Chronic kidney disease in small animals. *Vet Clinics of North America Small Anim Clin.* 2011; 41(1): 15-30.
- Pontremoli R, Viazzi F, Martinoli C, Ravera M, Nicoletta C, Berruti V, Leoncini G, Ruello N, Zagami P, Bezante GP, Derchi LE, Deferrari G.** Increased renal resistive index in patients with essential hypertension: a marker of target organ damage. *Nephrol Dial Transplant.* 1999; 14: 360-365.
- Rivers BJ, Walter PA, Polzin DJ, King VL.** Duplex doppler estimation of intrarenal pourcelot resistive index in dogs and cats with renal disease. *JVIM.* 1997; 11(4): 250-260.
- Sartor R, Mamprim MJ, Takahira RF, De Almeida M.** Hemodynamic evaluation of the right portal vein in healthy dogs of different body weights. *Acta Vet Scan.* 2010; 52: 36-50.
- Tipisca V, Murino C, Cortese L, Mennonna G, Auletta L, Vulpe V, Meomartino L.** Resistive index for kidney evaluation in normal and diseased cats. *J Feline Med Surg.* 2015; 1-5.



## Investigation of The Interaction Between Milk Urea Nitrogen (MUN) and Some Parameters in Determining The Level of Nutrition in Dairy Cows

Mehmet TAYTAK<sup>1</sup>, Ismail BAYRAM<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Agriculture Engineer, Kamer Feed Production, Afyonkarabisar - Turkey

<sup>2</sup>Dep. Of Animal Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarabisar - Turkey

### ABSTRACT

This study was carried out to determine the relationship between the amount of Milk Urea Nitrogen (MUN) and nutritional level in dairy cows. The research material was milk samples which were collected from 100 different commercial dairy farms. Three groups were assigned according to the milk analysis in the experiment. Group A, those having normal MUN values between 12-16 mg / dl in milk samples, group B, those having less MUN value and group C, those having high MUN value. Apart from this acetone, Beta hydroxy butyric acid (BHBA), total solid matter, fat, fat-free dry matter, crude protein (CP), true protein (TP), lactose, saturated fatty acids (SFA), total unsaturated fatty acids (TUFA), Polyunsaturated fatty acid (PUFA), Monounsaturated fatty acid (MUFA) and aflatoxin M1 values measured in milk and these were compared with low, normal and high MUN levels. In the study the MUN values of the groups were 14.46, 10.05 and 20.15 mg / dl respectively. At the end of the study, although the differences between the groups' acetone values were statistically significant ( $P < 0.05$ ), the values of all three groups were among the normal acetone values determined for dairy cows. Moreover, there were differences in milk regarding BHBA, fat, CP, TP, SFA, MUFA and AFM1 values ( $P < 0.01$ ) between the groups. As a concluded that some further detailed studies are required to get to know a deeper understanding of MUN levels in milk cows between acetone, BHBA and other parameters and metabolic diseases.

**Keywords:** Dairy cow, MUN, Nutritional level

\*\*\*

### Sütçü İneklerde Beslenme Seviyesinin Belirlenmesinde, Sütte Üre Azotu (MUN) ile Bazı Parametreler Arasındaki Etkileşimin Araştırılması

#### ÖZ

Bu araştırma, süt ineklerinde süt üre azotu miktarı ile beslenme düzeyi arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Araştırmanın materyalini 100 farklı süt ineği işletmesinden toplanan süt numuneleri oluşturmuştur. Araştırmada sütte yapılan analizlere göre 3 grup oluşturulmuştur. Alınan süt numunelerinde MUN değerleri 12-16 mg/dl arasında olanlar normal (grup A) bu değerlerin altında olanlar düşük (grup B) üzerinde olanlar ise yüksek (grup C) olarak kabul edilmiştir. Ayrıca sütte ölçülen aseton ve beta hidroksi bütirik asit (BHBA) değerlerinin yanı sıra toplam katı madde, yağ, yağsız kuru madde, ham protein, gerçek protein, laktoz, doymuş yağ asidi, toplam doymamış yağ asitleri (TUS), çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA), tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) ve aflatoxin M1 seviyelerine göre düşük, normal ve yüksek üre azotu değerleri ile karşılaştırılmıştır. Araştırmada, grupların MUN değerleri sırasıyla: 14.46, 10.05 ve 20.15 mg/dl'dir. Araştırma sonunda grupların aseton değerleri arasındaki farklılıklar istatistik olarak anlamlı olmasına ( $P < 0.05$ ) rağmen her üç grubun değerleri de süt inekleri için belirlenen normal aseton değerleri arasındadır. Benzer şekilde sütte BHBA, yağ, ham protein, gerçek protein, doymuş yağ asitleri, MUFA ve AFM1 değerleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunmaktadır ( $P < 0.01$ ). Sonuç olarak süt ineklerinde MUN değeri, aseton, BHBA ve diğer parametreler ile metabolik hastalıklar arasındaki ilişkileri anlamak için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Süt ineği, MUN, Beslenme düzeyi

To cite this article: Taytak M, Bayram İ. Investigation of The Interaction Between Milk Urea Nitrogen (MUN) and Some Parameters in Determining The Level of Nutrition in Dairy Cows. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):246-253.

Submission: 01.02.2019 Accepted: 07.08.2019 Published Online: 16.08.2019

ORCID ID; MT: 0000-0002-5090-7474 İB: 0000-0002-9993-7092

\*Corresponding author e-mail: ibayram1965@gmail.com

## INTRODUCTION

Urea (Latin: Urea, Pura) is an organic compound having formula  $H_2N-CO-NH_2$  (Barros et al. 2019). Urea contains carbon, nitrogen, oxygen and hydrogen, it is a common of blood and other body fluids (Ferguson 2000). Urea is a final product of protein metabolism and is synthesized from ammonia in the liver. Animals convert excessive ammonia to urea because ammonia is toxic while urea is non-toxic. The concentration of urea in milk is called Milk Urea Nitrogen (MUN) whereas the concentration of urea nitrogen in the blood is called Blood Urea Nitrogen (BUN) since the urea is readily distributed from the blood in the mammary gland passing to the milk, changes in BUN are also reflected in MUN (Powell et al. 2011).

There is limited information about the factors affecting the MUN level in dairy cows. Some researchers have found that the difference between breed, fat and protein levels of milk (Bruhn and Franke 1977), milk NPN level (Cerbulis and Farrell 1975), plasma urea nitrogen (Barton et al. 1996), but some researchers (Carlsson and Pehrson 1993) reported that breed has no effect on mentioned properties. The cows in their first lactation have relatively lower MUN values than the second or subsequent lactations (Carroll et al. 1988, Barton et al. 1996). However MUN was reported to be lower in heifers as compared to that in older cows (Canfield et al. 1990, Grexton 1999), some investigators reported that age had no effects on MUN level (Hof et al. 1997, Eicher et al. 1999). A negative correlation was found between MUN level and high somatic cell count (SCC) and NPN (Ng-Kwai-Hang et al. 1985). The MUN level can be affected by rumen degradable protein (RDP) or rumen undegradable protein (RUP) intake, water consumption, non-structural carbohydrate content of diet, dry matter intake, feeding time, feeding method (Total mixture ration, TMR or free choice feeding), liver and kidney function of animal (Amaral-Phillips 2009). Season also affects the MUN level. Abdouli et al. (2008) reported that highest MUN levels were determined in spring (between April and June) (17.13 mg / dl) whereas the lowest MUN value was reported in winter (January-March) (12.82 mg / dl). Analyze method may affect the level of MUN (Arunvipas et al. 2003). Number of Daily milking (Hutjens and Chase 2004) and milking time also affects MUN levels (Gustafsson and Palmquist 1993). Some researchers observed that supplemental glycerol decreased MUN (Sederevicius et al. 2008).

There is a negative relationship between energy level of diet and MUN as it was found by Kirchgessner et al. (1986) that a decreasing on diet energy was a limitation in the energy level of the ration increases the MUN level. Energy / protein level of diet is

another factor that affects MUN as it was reported by Depatie (2000), that the energy / protein ratio affected the MUN value more than the total dry matter, crude protein, RDP and RUP or even energy in the rumen. The normal MUN value varies between 12-16 mg/dl, depending on plenty of factors. Abdouli et al. (2008) reported that the cows kept in the Mediterranean conditions, their MUN level was found to be 30.39 mg / dl. On the other hand, different amounts of MUN have been reported eg: 15-17 mg/dl (Wambugu et al. 1998), 20.43-32.49 mg/dl (Frank and Swensson 2002), 11.15 mg/dl (Arunvipas et al. 2008) and 12.7-13.9 mg/dl (Meeske et al. 2009).

A study was conducted to determine the effect of different factors on milk components in the dairy cows of 3219 Holstein in Korea. MUN concentration in dairy cows in Korea was found to be between  $16.68 \pm 5.87$  mg/dl. In addition, milk yield, milk fat content, milk protein content and SCC were found negatively correlated (Yoon et al. 2004).

In the light of this information, the aim of this study was to investigate the interaction between milk urea nitrogen and some other milk parameters such as BHBA, acetone, fat, protein, lactose SFA, MUFA, PUFA and AFM1 in dairy cows.

## MATERIAL and METHODS

A total of 400 milk samples were collected for four times from 100 different dairy farms in Afyonkarahisar, Turkey. The collected milk was placed in 50 ml sterile tubes and milk sample protection tablets (Broad Spectrum Microtabs, Bentley Mercer) were added to each sample to prevent spoilage. These tablets allowed the column to remain intact at +4 °C until analysis was performed.

Milk Urea Nitrogen (MUN), Beta Hydroxy Butyric Acid (BHBA), acetone, total solids, fat, fat-free dry matter, crude protein, true protein, lactose, saturated fatty acid (SFA), Total unsaturated fatty acids (TUS), MUFA, PUFA and Aflatoxin M1 (AFM1) values were analyzed by using infrared spectrophotometry device (Milkoscan FT 120 FOSS lab., Denmark). Three groups were assigned according to the milk analysis in the experiment. Group A, those having normal MUN values between 12-16 mg / dl in milk samples, group B, those having less MUN value and group C, those having high MUN value. The measured parameters were compared with low, normal and high MUN values. Ingredients and composition of diets used according to the experimental groups are shown in Table 1.

Shapiro-Wilk test was used to determine whether the model data were distributed normally. The homogeneity of variance was determined by the Levene test. Logarithmic transformation was applied

to data not showing normal distribution. Data analysis was performed in SPSS package program. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the differences between the groups. Tukey-Kramer test was used as a post-hoc test to determine the difference between the groups. Research data were evaluated with SPSS version 6 (SPSS 1993). The significance level was assumed as ( $P < 0.05$ ). It is expressed as mean  $\pm$  SEM in the tables.

## RESULTS

In this study, total solids matter levels of the groups were found as 11.76%, 11.53% and 11.49% respectively. These results were statistically significant ( $P < 0.001$ ). Total solids matter level of group A were found to be higher than the other groups. Group A (4.07%) had higher fat levels than the other groups (3.88% and 3.75%). This result was statistically significant ( $P < 0.001$ ). The fat-free dry matter levels in

groups were 7.58%, 7.50% and 7.60% respectively. These results were not statistically significant. Crude protein and true protein levels of groups were 3.09%, 3.01%, 3.11% and 2.92%, 2.84%, 2.93%, respectively. These results are statistically significant ( $P < 0.001$ ) and ( $P < 0.001$ ). There is no differences on milk lactose levels between the groups. Lactose values of the groups were determined as 4.38%, 4.39% and 4.41% respectively. The acetone values of the experiment groups were 0.282, 0.276 and 0.256 mmol/L respectively. These results were statistically different ( $P < 0.05$ ) and also are within normal range for healthy dairy cows. The other parameters in milk were statistically significant ( $P < 0.001$ ) such as BHBA, SFA, TUS, MUFA and AFM1. No difference was found between the groups for the PUFA value. The parameters of the experimental groups in milk are shown in Table 2 and Table 3.

**Table 1.** Ingredients compositions of the experimental diets.

Feedstuffs (DM%)	EXPERIMENTAL GROUPS		
	A	B	C
Corn silage	34	33,5	35
Alfalfa hay	13,5	17	20
Barley straw	9	4,5	5
Sugar beet pulp	2,5	2,5	2,5
Barley grain	7	11	0
Concentrate feed (21% CP)	34	31,5	37,5
<b>Calculated values (DM %)</b>			
Crude Protein	14,45	14,36	14,91
Energy, ME (Mcal/kg)*	2,75	2,82	2,69
Ether extract	3,18	3,20	3,17
Starch	27,18	29,58	21,44
NFC	38,49	42,64	33,65
NDF	36,35	34,56	38,35
ADF	22,45	21,05	23,63
ADL	2,92	2,72	2,84

NFC: Non Fiber Carbohydrates, NDF: Notr detergent fiber, ADF: Acid detergent fiber, ADL: Acid detergent lignin,

\* Metabolisable energy (ME) are calculated from NRC (2001).

**Table 2.** Interaction between MUN and Total Solid Matter, Fat, - Free Matter, Crude Protein, True Protein and Lactose of milk in dairy cows (Mean  $\pm$  SEM; n = 400)

Group	Total Solid Matter,%	Fat,%	Fat Free Dry Matter,%	Crude Protein,%	True Protein,%	Lactose,%	Urea, mg/dl
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
A	11,76 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	4,07 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	7,58 $\pm$ 0,02	3,09 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	2,92 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	4,38 $\pm$ 0,02	14,46 $\pm$ 0,19 <sup>c</sup>
B	11,53 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	3,88 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	7,50 $\pm$ 0,03	3,01 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	2,84 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	4,39 $\pm$ 0,03	10,05 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>
C	11,49 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	3,75 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	7,60 $\pm$ 0,03	3,11 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	2,93 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	4,41 $\pm$ 0,02	20,15 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>
<b>P</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,087</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,646</b>	<b>0,001</b>

**Table 3.** Interaction between MUN and Aceton, BHBA, SFA, TUS, MUFA, PUFA and AFM1 of milk in dairy cows (Mean±SEM; n = 400)

Group	Aceton	BHBA	Saturated Fatty	TUS	MUFA	PUFA	AFM1, ppt
	mmol/L		Acids				
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
A	0,282±0,005 <sup>a</sup>	0,120±0,004 <sup>a</sup>	3,048±0,004 <sup>b</sup>	1,336±0,013 <sup>a</sup>	1,26±0,01 <sup>a</sup>	0,254±0,003	31,68±1,35 <sup>c</sup>
B	0,276±0,010 <sup>ab</sup>	0,086±0,005 <sup>b</sup>	2,890±0,013 <sup>a</sup>	1,348±0,018 <sup>a</sup>	1,24±0,02 <sup>a</sup>	0,250±0,005	19,43±0,96 <sup>b</sup>
C	0,256±0,006 <sup>b</sup>	0,080±0,004 <sup>b</sup>	2,790±0,011 <sup>c</sup>	1,179±0,009 <sup>b</sup>	1,09±0,01 <sup>b</sup>	0,246±0,004	42,16±0,91 <sup>a</sup>
<b>P</b>	<b>0,021</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,368</b>	<b>0,001</b>

SFA: Saturated fatty acids, BHBA: Betahydroxi bütyric acid, TUS: Total unsaturated fatty acids, MUFA: Mono unsaturated fatty acids: PUFA: Poly unsaturated fatty acids, AFM1: Aflatoxin M<sub>1</sub>

## DISCUSSION

The interaction between the nutrient levels in milk (fat, protein, lactose) and metabolic parameters (urea nitrogen, BHBA, acetone) were investigated in this study. In fact, these two concepts are very irrational and metabolic parameters are mostly secondary. As is the case in many regions of the world, milk is the only nutrient parameter to be determined. However, metabolic parameters give important information about the overall health status of the herd as well as reflects the herd health.

MUN, being of very much importance in metabolism, is an important parameter especially for protein metabolism and it gives very accurate information about the protein contents in nutrition of an animal. (Jonker et al. 1998). If the energy level of the ration is sufficient, the MUN level would be a reliable indicator of whether the dairy cattle are balanced in terms of protein or not, and they are a reliable indicator in revealing the excess or deficit (Ide et al. 1966, Roseler et al. 1993, Broderick and Clayton 1997, Hof et al. 1997, Jonker et al. 1998). In addition, BUN and MUN are highly correlated each other (Thorton,1970; Ciszuk and Gebregziabher,1994). Jonker et al. (1998) reported that urinary and fecal excretion, intake, and utilization efficiency for N level, can be calculated by the mechanism they developed by using MUN and total milk protein level. In line with these findings only the MUN monitoring of the dairy cattle in terms of protein level can be clearly revealed. However, according to many studies on this subject there are different opinions about optimum MUN level. Accordingly, Moore and Varga (1996) and Rajala-Shultz et al. (2001) reported that optimum MUN level was found 10-14 mg/dl level. In addition, other optimal MUN levels have been reported (10-16 mg / dl; Jonker et al., 1998), 11-17 mg / dl; Hong et al., 2003). According to the researchers, high level of acceptable MUN is directly related to milk yield. Cows who have high milk yield these have a higher amount of N that they will consume because of their special feeding kinetics. Therefore, it is more reasonable to adopt 10-14

mg/dl for medium and low-yield dairy cattle. In addition, Kohn (2007) 's pilot study with a mean of 12.7 mg/dl MUN average in flocks, otherwise it is not economic reports that the feeding of the opinion confirms.

The value of MUN is not only affected by the protein level of the ration. The level and type of energy in the ration are also effective on MUN. Because it is necessary to have sufficient fermentable carbohydrates in the environment for the degradation and recombination of the protein in the rumen (Oltner et al. 1985, Moore and Varga 1996, Rajala-Shultz 2001). One of the important and reliable studies in this situation was of Beckman and Weiss (2005). Researchers reported that when the ratio of NDF-starch increased the level of MUN also increased despite the same protein level and sources. Valerades et al. (2000) reported that in the ration of dairy cattle, instead of high-moist corn, use of alfalfa silage increased the value of MUN. However, NDF digestibility has a large share in this effect. As Kauffman and St-Pierre (2001) reported, the MUN value is not affected by the replacement of the starch sources in the ration with very high digestibility (such as soy shell) raw materials. Furthermore, Jonker et al. (2002) reported that low levels of milk in dairy cattle fed with protein in accordance with the amounts reported in NRC (2001) led to a decrease in milk yield and an increase in MUN value. The researchers correlated the detection of a high level of MUN value in dairy cows with low milk yield to energy insufficiency. Similarly decreasing starch and energy value without increasing protein level and sources of ration and increasing of NDF resources which are difficult to digest increased MUN value.

Another metabolic parameter that indicates health and productivity of dairy cattle is the level of BHBA level in milk because it gives information about the energy metabolism and ketosis susceptibility levels of animals in herd (Enjalbert et al. 2001). Ketosis is an important disorder that appears as a reflection of severe negative energy balance in dairy cattle and has a strong relationship with other metabolic diseases which negatively affects the health and productivity

of animals (Grummer 1993, Gustafsson et al. 1993, Duffield 2000, Oetzel 2007). The ketosis is manifested by two types clinical and subclinical. The dairy cows with clinical ketosis have a depressive, anorexia, dull and lethargic appearance and a significant decrease in their milk yield (Duffield 2000). However, the subclinical form is very sneaky with having no visible signs except decrease in milk yield which poses significant economic losses to the farmer (Anderson 1988, Oetzel 2007). Duffield (1997) reported that cows with blood BHBA level 1.6 mmol/ l 1.8 liters per day; Cows with 1.8 mmol / l 3 liters; Cows with more than 2 mmol / l produce 4 liters of milk. As it can be prevented in time, losses due to subclinical ketosis may cause serious economic losses. Because it depends on nutrition, various tests are carried out to reveal this insidious disease, which is generally herd-based, without serious losses. BHBA analysis, which is routinely performed on tank milk, is one of these tests. According to Shultz and Myers (1959) and Andersson (1984), there is a very high correlation between the ketone bodies in the milk and the ketone bodies in the blood. Therefore, analysis in milk instead of blood can be more easily and reliably revealing the incidence of ketosis in herd. Especially, in recent years, studies have been carried out to calculate the correlation between an increasing number of blood and milk BHBA levels (Enjalbert 2001, Van Kneegsel 2010, Denis-Robichaud et al.2014). One of the most recent studies on the determination of milk BHBA level by NIR method is Denis-Robichaud et al. (2014). According to this study, the level of BHBA detected in milk above 0.2 mmol / l indicates hyperacetonemia, in other words, subclinical ketosis. In the present study, although there was a difference between the groups in terms of milk BHBA levels ( $P < 0.05$ , Table 2), the level of any group did not exceed 0.20 mmol / l. In other words, if we look at the averages of the groups, we can easily say that there is no danger of subclinical ketosis. There may be several reasons for this. First of all, as reported by Overton and Waldron (2004), subclinical ketosis is a problem of dairy cows that develop immediately after birth and have high milk yield. In the present study, the average daily milk per animal of the samples from which the samples are obtained varies between 21 and 23 l / day and a high level of efficiency cannot be mentioned. In addition, the number of new birth animals is less than the herd overall. Therefore, it is understandable that the incidence of subclinical ketosis is low for the farms where the samples are taken. But at the ideal MUN level (12-16 mg / dl, Group A), it is very thought-provoking that the level of milk BHBA is lower than that of low ( $< 12$  mg / dl, Group B) and high ( $> 16$  mg / dl, Group C) MUN groups. However, in order to be able to express this situation more clearly and to make a healthy interpretation, there is a need for new studies to be carried out in new dairy cows with higher milk yield. However, there is a positive

correlation between ketone bodies in blood and milk fat levels. Duffield et al. (1997) reported that milk fat is increased in cows with subclinical ketosis and the ratio of milk fat to protein increases. Milk fat was also found to be high in group A in which milk BHBA level was high in line with this finding ( $P < 0.05$ ). Therefore, it can be said that there is a connection between MUN level and milk fat.

However, in some recent studies, the number of studies reporting a close correlation between the fatty acid composition of milk and the negative energy balance and ketone bodies is increasing (Melendez et al. 2016). The origin of the short and medium chain fatty acids in milk fat is acetate, whereas the long-chain fatty acids are synthesized from the non-esterified fatty acids circulating in the blood (Bauman and Griinari 2003). Thus, parallel to the rising negative energy balance, the rate of PUFA that make up milk oil increases due to increased blood levels of NEFA and BHBA (Melendez et al. 2016). In our study, while the PUFA values were not different, the MUFA and TUS values were different. MUFA and TUS values were significantly lower in the C group with higher MUN levels than in the other groups. In addition, milk fat and BHBA levels of group C were found to be statistically lower in group B and statistically lower in group A than in group A. This decrease in milk fat and BHBA level resulted in a decrease in MUFA and TUS levels. In addition, there was a statistically significant difference between all groups in terms of saturated fatty acids, it was found to be the highest in group A with MUN level in accordance with other parameters and the lowest in group C with high MUN level. The low level of energy, especially the starch level in the ration of group C, may have led to these results. However, the fact that ketosis is not developed due to the low milk yield in the dairy samples is difficult to make a clear interpretation.

The level of acetone in milk is a very useful parameter which can be used in herd health programs to diagnose subclinical ketosis cases and can provide reliable results about energy balance (Mottram et al. 2002, Reist et al. 2000). In milk, acetone level shows a negative correlation with energy balance ( $r = -0.64$ ) (Clark et al. 2005). The acetone concentration in milk ranges from 0 to 2 mmol / L and is generally classified as  $< 0.4$  mmol / L, 0.41-1.0 mmol / L, 1.01-2.0 mmol / L and  $> 2.0$  mmol / L (Mottram et al. 2002). The acetone concentration in milk is  $< 0.7$  mmol / L, indicating that the dairy cows are extremely healthy, that 0.7-1.4 mmol / L can be ketosis, and  $> 1.4$  mmol / L ketosis. When the acetone levels of the experimental groups were reviewed, although there were statistically significant differences between the groups, the acetone values of all three groups were among the values reported in dairy cows (Mottram et al. 2002). In the research,

AFM1 values obtained as a result of analysis in milk were statistically different ( $P < 0.01$ ). However, the values of all groups are within normal limits. There are legally tolerable limit values due to the very significant risks that aflatoxins can cause on human health. This limits the Codex Alimentations for AFM1 levels of 500 ng / kg (PPT), the European Union and in Turkey and 50 ng / kg (PPT) d (Şanlı 1995, Anonymous 2002, Anonymous 2006).

## CONCLUSION

In this study, it was investigated how the other parameters were affected in the milk with different (high, normal, low) MUN levels. Accordingly, it was found that the MUN level was directly affected by the energy level of the ration, and even if the protein was very well calculated in the dairy cattle fed with insufficient energy, the bioavailability would decrease and the MUN level would increase and the milk fat would decrease. This can lead to serious economic damage, resulting in both loss of yield (milk yield, milk fat, reproductive fertility) and waste of the ration protein. However, there was also a correlation between the level of MUN and the level of BHBA in milk. Although high levels of BHBA in MUN normal levels are thought-provoking, no group has reached the level of clinical or subclinical ketosis. This may be due to the low milk yield of dairy farms. Therefore, according to the data obtained in this study, more extensive studies are needed with the milk samples to be obtained from high milk producers in order to reveal the interaction between MUN and the levels of BHBA, fat, saturated and unsaturated fats in milk.

## ACKNOWLEDGEMENT

*The authors thank to Afyon Kocatepe Scientific Research Projects Coordination Unit (AKÜ BAPK) for supporting (Project Number 14.SAĞBİL.17).*

## REFERENCES

**Abdoul H, Rezik B, Haddad-Boubaker A.** Non-nutritional factors associated with milk urea concentrations under Mediterranean conditions. *World J Agric Sci.* 2008; 4(2):183-188.

**Amaral-Phillips, D.M.** Milk urea nitrogen-a nutritional evaluation tool. <http://www.uky.edu/Ag/AnimalSciences/dairy/extension/nut00029.pdf>. Accesien date: 15 February 2009.

**Andersson L.** Subclinical ketosis in dairy cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*1988; 4:233-248.

**Andersson L.** Concentrations of blood and milk ketone bodies, blood isopropanol and plasma glucose in dairy cows in relation to the degree of hyperketonemia and clinical signs. *Zentralbl Veterinarmed A.*1984; 31:683-693.

**Anonimous.** Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ. Tebliğ No: 2002/63, 23 Eylül 2002 tarihli ve 24885 sayılı Resmi Gazete, Ankara. 2002.

**Anonimous.** EC No: 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off J Eur Union*, 2006; 364: 5-24.

**Arunvipas P, Van Leeuwen JA, Dohoo IR, Keefe GP, Burton SA, Lissemore KD.** Relationships among milk urea-nitrogen, dietary parameters, and fecal nitrogen in commercial dairy herds. *The Canadian J Vet Research.* 2008;72: 449-453.

**Barton BA, Rosario HA, Andersson GW, Grindle BP, Carroll DJ.** Effects of dietary crude protein, breed, parity, and health status on the fertility of dairy cows. *J Dairy Sci.* 1996;79: 2225–2236.

**Bauman DE, Griinari JM.** Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Rev Nutr.* 2003; 23: 203.

**Barros T, Barros T, Reed KF, Olmos Colmenero JJ, Wattiaux MA.** Short communication: Milk urea nitrogen as a predictor of urinary nitrogen and urea nitrogen excretions of late-lactation dairy cows fed nitrogen-limiting diets. *J Dairy Sci.* 2019; Feb; 102(2):1601-1607.

**Beckman JL, Weiss WP.** Nutrient digestibility of diets with different fiber to starch ratios when fed to lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2005; 88(3): 1015-1023.

**Broderick GA, Clayton MK.** A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. *J Dairy Sci.* 1997; 80: 2964–2971.

**Bruhn JC, Franke AA.** Monthly variations in gross composition of California herd milks. *J. Dairy Sci.* 1977; 60: 696-700.

**Canfield RW; Sniffen CJ, Butler WR.** Effects of excess degradable protein on postpartum reproduction and energy balance in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 1990; 73: 2342-2349.

**Carlsson J, Pehrson B.** The relationship between seasonal variations in the concentration of urea in bulk milk and the production and fertility of dairy herds. *J Vet Med.* 1993; 40: 205-212.

**Carroll DJ, Barton BA, Anderson GW, Smith RD.** Influence of protein intake and feeding strategy on reproductive performance of dairy cows. *J Dairy Sci.* 1988; 71(12): 3470-3481.

**Cerbulis J, Farrell HM.** Composition of milks of dairy cattle. 1. Protein, lactose, and fat contents and distribution of protein fraction. *J Dairy Sci.* 1975; 58: 817–827.

**Ciszuk AU, Gebregziabher T.** Milk urea as an estimate of urine nitrogen of dairy cows and goats. *Acta Agric Scand* 1994; 44:87–95.

**Clark CEF, Fulkerson WJ, Nandra KS, Barchia I, Macmillan KL.** The use of indicators to assess the degree of mobilisation of body reserves in dairy cows in early lactation on a pasture-based diet. *Livest Prod Sci.* 2005;94: 199-211.

**Denis-Robichaud J, Dubuc J, Lefebvre D, DesCôteaux L.** Accuracy of milk ketone bodies from flow-injection analysis for the diagnosis of hyperketonemia in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2014;97(6): 3364-3370.

**Duffield T.** Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Anim Practice.* 2000; 16(2): 231-253.

**Duffield TF.** Effects of a monensin controlled release capsule on energy metabolism, health and production in lactating dairy cattle. *DVSc-Thesis*, 1997;University of Guelph, Ontario, Canada.

**Duffield TF, Kelton DF, Leslie KE, Lissemore KD, Lumsden JH.** Use of test day milk fat and milk protein

- to detect subclinical ketosis in dairy cattle in Ontario. *Canadian Vet J.* 1997; 38(11): 713.
- Eicher R, Bouchard E, Bigras-Poulin M.** Factors affecting milk urea nitrogen and protein concentrations in Quebec dairy cows. *Prev Vet Med.* 1999; 39: 53-63.
- Enjalbert F, Nicot MC, Bayourthe C, Moncoulon R.** Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: Relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *J Dairy Sci.* 2001;84(3): 583-589.
- Ferguson JD.** Milk urea nitrogen. 2000; Penn State University extension. USA.
- Frank B, Swensson C.** Relationship between content of crude protein in rations for dairy cows and milk yield, concentration of urea in milk and ammonia emissions. *J Dairy Sci.* 2002; 85: 1829-1838.
- Grextan B.** MUN data on Ontario herds offers up some interesting information, Accesien Date: September 2, 1999. <http://www.ontdhi.com/mundata.htm>
- Grummer RR.** Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* 1993; 76(12):3882-3896.
- Gustafsson AH, Carlsson J.** Effects of silage quality, protein evaluation systems and milk urea content on milk yield and reproduction in dairy cows. *Livestock Prod Sci.* 1993; 37: 91-105.
- Gustafsson AH, Palmquist DL.** Diurnal Variation of Rumens Ammonia, Serum Urea, and Milk Urea in Dairy Cows at High and Low Yields. *J Dairy Sci.* 1993; 76: 475-484.
- Hof G, Vervoorn MD, Lenaers PL, Tamminga S.** Milk urea nitrogen as a tool to monitor the protein nutrition of dairy cows. *J Dairy Sci.* 1997; 80: 3333-3340.
- Hong NTT, Wanapat M, Wachirapakorn C, Pakdee P, Rowlinson P.** Effects of timing of initial cutting and subsequent cutting on yields and chemical compositions of cassava hay and its supplementation on lactating dairy cows. *Asian Australasian J Anim Sci.* 2003; 16(12): 1763-1769.
- Hutjens M, Chase LE.** Interpreting milk urea nitrogen (MUN) values Accesien Date: 2004; [http://www.extension.org/pages/Interpreting\\_Milk\\_Urea\\_Nitrogen\\_\(MUN\)\\_Values](http://www.extension.org/pages/Interpreting_Milk_Urea_Nitrogen_(MUN)_Values).
- Ide Y, Shimbayashi K, Yonemura T.** Effect of dietary conditions upon serum- and milk-urea nitrogen in cows I. Serum- and milk-urea as affected by protein intake. *Jap J Vet Sci.* 1966; 28: 321-327.
- Jonker JS, Kohn RA, Erdman RA.** Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cattle. *J Dairy Sci.* 1998; 81: 2681-269.
- Jonker JS, Kohn RA, High J.** Use of milk urea nitrogen to improve dairy cow diets. *J Dairy Sci.* 2002; 85: 939-946.
- Kauffman AJ, St-Pierre NR.** The relationship of milk urea nitrogen to urine nitrogen excretion in Holstein and Jersey cows. *J Dairy Sci.* 2001; 84: 2284-2294.
- Kirchgeßner M, Kreuzer M, Roth-Mailer DA.** Milk urea and protein content to diagnose energy and protein malnutrition of dairy cows. *Arch Anim Nut.* 1986; 36: 192-197.
- Kohn R.** Use of milk or blood urea nitrogen to identify feed management inefficiencies and estimate nitrogen excretion by dairy cattle and other animals. In 18th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium. 2007; Paper (Vol. 8).
- Meeske R, Botha PR, Van der Merwe GD, Greyling JF, Hopkins C, Marais JP.** Milk production potential of two ryegrass cultivars with different total non-structural carbohydrate contents. *South African J Anim Sci.* 2009; 39(1): 15.
- Melendez P, Pinedo P, Bastias J, Marin MP, Rios C, Bustamante C, Duchens M.** The association between serum  $\beta$ -hydroxybutyrate and milk fatty acid profile with special emphasis on conjugated linoleic acid in postpartum Holstein cows. *BMC Veterinary Res.* 2016; 12(1): 50.
- Moore DA, Varga G.** BUN and MUN: urea nitrogen testing in dairy cattle. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian.* 1996;18 (12): 712-720.
- Mottram T, Velasco-Garcia M, Berry P, Richards P, Ghesquiere J, Masson L.** Automatic on-line analysis of milk constituents (urea, ketones, enzymes and hormones) using biosensors. *Comp Clin Pathol.* 2002; 11: 50-58.
- Ng-Kwai-Hang KF, Hayes JF, Moxley JE, Monardes HG.** Percentages of protein and nonprotein nitrogen with varying fat and somatic cells in bovine milk. *J Dairy Sci.* 1985; 68: 1257-1262.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC.** Nutrient requirements of dairy cattle. 7.ed. Washington: National Academy Press, 2001; 381p.
- Oetzel GR.** Herd-level ketosis—diagnosis and risk factors. In *Proceedings of the 40th annual conference of bovine practitioners.* 2007; Vancouver, Canada.
- Oltner R, Emanuelson M, Wiktorsson H.** Urea concentrations in milk in relation to milk yield, live weight, lactation number and amount and composition of feed given to dairy cows. *Livestock Prod Sci.* 1985; 12: 47-57.
- Overton TR, Waldron MR.** Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. *J Dairy Sci.* 2004; 105-119.
- Powell JM, Wattiaux MA, Broderick GA.** Short communication: Evaluation of milk urea nitrogen as a management tool to reduce ammonia emissions from dairy farms. *J Dairy Sci.* 2014; 94:4690-4694.
- Rajala-Schultz PJ, Saville WJA, Frazer GS, Wittum TE.** Association between milk urea nitrogen and fertility in Ohio dairy cows *J Dairy Sci.* 2001; 84(2): 482-489.
- Reist M, Koller A, Busato A, Küpfer U, Blum JW.** First ovulation and ketone body status in early postpartum period of dairy cows. *Theriogenology.* 2000; 54: 685-701.
- Roseler DK, Ferguson JD, Sniffen CJ, Herrema J.** Dietary protein degradability effects on plasma and milk urea nitrogen and milk nonprotein nitrogen in Holstein cows. *J Dairy Sci.* 1993; 76: 525-534.
- Schultz LH, Myers M.** Milk test for ketosis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 1959; 42: 705-710.
- Sederevicius A, Kabasinskiene A, Savickis S, Svedaite V, Makauskas S.** Milk urea nitrogen as an important indicator of dairy cow: nutrition review. *Veterinarja Ir Zootechnika.* 2008; 44(66): 98.
- SPSS for Windows.** Released 6.0 June 17 1993; Copy right (c. Sps inc. 1989-1993).
- Şanlı Y.** Mikotoksinler. *Veteriner Klinik Toksikoloji*, (Ed. Sezai Kaya), sh: 283-306, Medisan Yayinevi, Medisan Yayin Serisi no:21, Ankara.1995.

- Thorton RF.** Factors effecting the urinary excretion of urea nitrogen in cattle: I. Sodium chloride and water loads. *Aust J Agric Res.* 1970; 21: 131–144.
- Valadares SC, Broderick GA, Valadares RFD, Clayton MK.** Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on nutrient utilization and milk production. *J Dairy Sci.* 2000; 83: 106–114.
- Van Knegsel ATM, Van der Drift SGA, Horneman M, de Roos APW, Kemp B, Graat EAM.** Short communication: Ketone body concentration in milk determined by Fourier transform infrared spectroscopy: Value for the detection of hyperketonemia in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2010; 93: 3065–3069.
- Wambugu M, Wahome RG, Gachuri C, Tanner J, Kaitho R.** Evaluation of the use of milk urea nitrogen (MUN) as an indicator of nutritional status of dairy cattle in smallholder farms in kiambu district. Paper presented at the Faculty of Vet. Med. Biennial Conference, Kabete Campus, University of Nairobi, 5-7 August. 1998.
- Yoon T, Lee JH, Kim CK, Chung YC, Kim CH.** Effects of Milk Production, Season, Parity and Lactation Period on Variations of Milk Urea Nitrogen Concentration and Milk Components of Holstein Dairy Cows\* *Asian-Australian J Anim Sci.* 2004; 17(4): 479-484.



## Investigation of Epidermal Growth Factor (EGF) Levels in Milk of Anatolian Buffaloes with Subclinical Mastitis

Hande GURLER<sup>\*1</sup>, Gül Fatma YARIM<sup>2</sup>, Seçkin SALAR<sup>3</sup>, Arzu FINDIK<sup>4</sup>, Ayris GOKCEOGLU<sup>2</sup>, Aytac AKCAY<sup>5</sup>, Ayhan BASTAN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Turkey

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Turkey

<sup>3</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Turkey

<sup>4</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Turkey

<sup>5</sup>Department of Biometry, Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University, Turkey

### ABSTRACT

Subclinical mastitis (SCM) is a serious disease of farm animals. There are many studies on SCM that aim to make the diagnosis practical, economical and reliable. It was the aim of the present study comparison of epidermal growth factors (EGF) ratios in animals with and without subclinical mastitis as an indicator of SCM in Anatolian water buffaloes. A study was carried out in a total of on 35 milk samples from 20 healthy and 15 mastitic mammary quarters of clinical healthy and nonpregnant buffaloes. Samples were examined using California mastitis test (CMT) as cow side test to detect of SCM before being transferred to the laboratory. Microbiological culture was also performed to determine bacterial contamination. Level of EGF and somatic cell count (SCC) was determined in all samples. As a result of the comparison of the EGF concentration between the SCM (+) and SCM (-) groups, the SCM (+) group was found to be higher than the SCM (-) group. EGF tests may be a useful tool in determining subclinical mastitis.

**Keywords:** Buffalo, Epidermal growth factor, Milk, Subclinical mastitis

\*\*\*

### Subklinik Mastitisli Anadolu Mandalarında Epidermal Büyüme Faktörü Değerlerinin (EGF) Araştırılması

#### ÖZ

Subklinik mastitis (SKM), çiftlik hayvanlarının ciddi bir hastalığıdır. Subklinik mastitis tanısının pratik, ekonomik ve güvenilir olmasını amaçlayan birçok çalışma vardır. Bu çalışmada Anadolu mandalarında SKM'in bir göstergesi olarak subklinik mastitis olan ve olmayan hayvanlarda epidermal büyüme faktörleri (EGF) oranlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışma klinik olarak sağlıklı ve gebe olmayan 20 sağlıklı ve 15 mastitisli meme lobundan alınan toplam 35 süt örneğinde yürütülmüştür. Süt örnekleri alınır alınmaz, laboratuvara transferi gerçekleştirilmeden önce Kaliforniya mastitis test (CMT) ile saha koşullarında SKM tespiti yapıldı. Bakteriyele kontaminasyonu belirlemek amacıyla mikrobiyolojik kültür yapıldı. Tüm örneklerde EGF düzeyi ve somatik hücre sayısı (SCC) belirlendi. EGF konsantrasyonunun SKM (+) ve SKM (-) grupları arasındaki karşılaştırma sonucunda, SKM (+) grubunun SKM (-) grubundan daha yüksek olduğu bulundu. EGF testlerinin subklinik mastitisin belirlenmesinde yararlı bir araç olabileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Epidermal büyüme faktörü, Manda, Subklinik mastitis, Süt

To cite this article: Gürler H, Yarım G.F, Salar S, Fındık A, Gökçeoğlu A, Akçay A, Bastan A. Investigation of Epidermal Growth Factor (EGF) Levels in Milk of Anatolian Buffaloes with Subclinical Mastitis. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):254-257.

Submission: 08.04.2019 Accepted: 16.07.2019 Published Online: 24.08.2019

**ORCID ID;** HG: 0000-0001-7239-5388, GFY: 0000-0003-4050-429X, SS: 0000-0001-9303-6253, AF: 0000-0002-9123-6160, AG: 0000-0002-2944-9122, AA: 0000-0001-6263-5181, AB: 0000-0001-8291-1147

\*Corresponding author e-mail: handeulusoy@gmail.com

## INTRODUCTION

Epidermal growth factor is a 53-amino acid polypeptide that plays an important role in the regulation of mammary epithelial regeneration and also modulation of innate immune responses. It has biological roles including embryonic organ development, mammary morphogenesis, mammary cell proliferation and mammary development. (Fu et al. 2015, Gabadage et al. 2017).

According to International Dairy Federation (IDF) a confirmatory diagnosis of SCM recommendations is based on the microbiological status and inflammatory reactions i.e., somatic cell count ( $SCC \geq 2 \times 10^5$  cells/ml of milk) of the quarter (IDF 1987). It was reported that diagnosis based on physical and chemical changes in the SCM milk is reported to be unsatisfactory and also the logistic and financial considerations involved with sampling all animals in a herd have precluded these techniques from being widely adopted. For this reason, it is desirable to use alternative parameters to indicate inflammation in order to determine the health status of the mammary glands (Guha et al. 2013). It has been suggested that EGF may be important in cows with SCM by increased expression due to inflammatory events in the mammary gland various cellular processes and tissue repair (Sheffield 1997). According to Guha et al. (2013) one of the principles of detecting inflammation within the mammary gland is to study the mammary epithelial integrity. Increased insulin like growth hormone (IGF-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in the mammary gland as a result of infection with *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) causing chronic mastitis suggests that growth factors play a role in mammary gland infections (Dallard et al. 2007). However, no studies have examined the relationship between EGF and SCM.

## MATERIAL and METHODS

This study was carried out in small family-type farms of Anatolian buffalo localized around the Kızılırmak delta in Samsun (latitude 41°34'16"N; longitude, 35°51'56"E). The study was conducted on 35 milk samples from 20 healthy and 15 mastitic mammary quarters of clinical healthy and nonpregnant buffaloes. Teat ends were disinfected with cotton swabs with 70% alcohol, allowed to dry and the foremilk from quarters were discarded. Milk samples were collected from buffaloes with milking being done by hand. CMT was performed directly to milk samples from each quarter in the farm using the method Schalm et al. (1971). CMT was evaluated separately from four mammary quarters with negative (-), suspicious (+1), +2, +3 and +4 (Bardakcioglu et al. 2011).

CMT positive samples were examined by bacteriological examination. For this purpose milk samples were brought to the laboratory, they were homogenized with a vortex mixer; each of them was plated on blood agar enriched with 5% sheep blood and McConcey agar plates. The plates were incubated at 37°C for 24-48 hours. Then, suspicious colonies were evaluated for cultural characteristics (haemolysis, pigmentation) and microscopy (Gram staining) (Quinn et al. 1994).

The milk EGF concentrations were determined using bovine specific ELISA kit (MBS706122, MyBioSource, Inc. San Diego, CA, USA) following the procedure as described by the manufacturer. Absorbance was measured at 450 nm with a microplate reader (Infinite F50, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) and EGF concentrations were calculated.

To determine SCC of the milk, a composite milk sample (50 ml) was collected from all quarters of each animal and 10 ml milk sample placed in a sealable tube. Prior to transport of the samples to the laboratory, a chemical tablet (Microtabs), which inhibits microbial growth without affecting the SCC, was added to the each tube, as it will be one tablet for 10 ml milk sample. The milk samples were transported to the laboratory under controlled cold chain conditions (+4°C). In the laboratory, the milk samples were first heated in a 40°C water bath for 10 min. The SCC of each sample was then determined with device the Combi 150 (Bentley) includes a device (Somacount 150) for measuring the SCC of milk according to the manufacturer's instructions. In the evaluation of the SCC data, buffaloes with SCC below  $200 \times 10^3$  cells/ml were considered SCM (-), while above  $200 \times 10^3$  cells/ml were SCM (+) (Sharma et al. 2011).

## Statistical analysis

Normal distribution of data was evaluated by Q-Q plot, histogram and Shapiro Wilk test. Kruskal Wallis and Mann Whitney U test were used to compare experimental groups according to EGF and SCC. The relationship between EGF and SCC was evaluated by Spearman's Rho test. NCSS 9 program was used for data analysis. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

According to the results of bacterioscopy, there was a significant difference in terms of EGF between the group bacterial growth (+) and bacterial growth (-) ( $p < 0.05$ ). The mean of the bacterial growth (+) ( $6.89 \pm 0.62$ ) was higher than the mean of the bacterial growth (-) group ( $4.55 \pm 0.50$ ) (Table 1).

There was a significant difference between the SCM (+) and SCM (-) groups in terms of EGF ( $p < 0.001$ ). The comparison of EGF concentration between SCM (+) and SCM (-) group is shown in Table 2. SCM (+) group ( $7.50 \pm 0.41$ ) was higher than SCM (-) group ( $3.15 \pm 0.32$ ).

There was a significant difference between CMT (+) and CMT (-) groups in terms of EGF ( $p < 0.01$ ). The mean of EGF (-) group was lower than that of CMT (+2) and (+3) group ( $3.15 \pm 0.32$ ) (Table 3). A positive correlation was found between EGF and SCC ( $r = 0.737$ ,  $p < 0.001$ ) (Table 4).

**Table 1.** EGF and SCC levels and statistical significance control according to bacterioscopy results

	Groups ( $\bar{X} \pm SEM$ )		P
	bacterial growth (+)	bacterial growth (-)	
EGF(ng/ml)	6.89±0.62	4.55±0.50	<b>0.039</b>
SCC	1123.86±300.25	354.11±159.92	<b>0.001</b>

**Table 2.** EGF levels and statistical significance control according to subclinical mastitis

	Groups ( $\bar{X} \pm SEM$ )		P
	SCM (+)	SCM (-)	
EGF (ng/ml)	7.50±0.41	3.15±0.32	<b>&lt;0.001</b>

**Table 3.** EGF levels and statistical significance control according to CMT results

	Groups ( $\bar{X} \pm SEM$ )				P
	CMT (-)	CMT (+1)	CMT (+2)	CMT (+3)	
EGF(ng/ml)	3.15±0.3 <sup>a</sup>	8.57±0.65 <sup>b</sup>	6.90±0.48 <sup>b</sup>	7.05±0.83 <sup>b</sup>	<b>&lt;0.001</b>
SCC	33.05±4.1 <sup>a</sup>	839.20±405.38 <sup>b</sup>	839.60±265.5 <sup>b</sup>	1745.40±650.7 <sup>b</sup>	<b>&lt;0.001</b>

**Table 4.** The correlation between EGF and SCC levels

Spearman's rho correlation coefficient	EGF (ng/ml)	P value
SCC	0,737	<0,001

## DISCUSSION

Subclinical mastitis is the most important disease affecting the dairy sector in all farm animals. It causes high losses in the amount and quality of milk, resulting in significant economic losses (Bradley 2002, Ergun et al. 2009, Ozenc et al. 2008, Sudhan and Sharma 2010). Unlike clinical mastitis, subclinical mastitis is a herd problems and its detection is not as easy as clinical mastitis. For this reason, fast detection is very important in terms of minimizing the financial loss.

It has been reported that EGF has increased due to its role in tissue repair in cow mammary tissue with subclinical mastitis (Sheffield 1997). Epidermal growth factor (EGF) is a 53 amino acid polypeptide with biological roles such as embryonic organ development, mammary morphogenesis, mammary cell proliferation and mammary development.

Epidermal growth factor receptor (EGFR) ligands have been identified as important components in the modulation of natural immunity. It is noted that these ligands are produced by inflammatory cells, including neutrophils, eosinophils, monocytes, epithelial cells and fibroblasts, and upregulation of prostaglandin production and interleukin 1 (IL-1) in the mammary gland of intermittent animals, interleukin 8 (IL-8), tumor to participate in the production of necrosis factor and antimicrobial peptides. Both IL-1 and IL-8 have been shown to increase neutrophil flow and increased oxygen radical formation during *S.aureus* mastitis in ruminant animals and thus fight bacterial invasion (Gabadage et al. 2017). In this study the results confirmed our hypothesis and the increase in EGF due to inflammation in the mammary gland is thought to occur in parallel with the increase in SCC caused by inflammation. Similarly, strong positive association with bacterial growth and CMT values supports this view. In addition, it has been reported

that cows with mastitis increase EGF expression in mammary tissue and play a potential role in tissue repair and cellular process during mastitis (Sheffield 1997). In this study, it was found that EGF levels increased in buffalo milk with subclinical mastitis compared to healthy milk.

It was reported that EGF receptor numbers increase during pregnancy in the cow (Spitzer and Grosse, 1987). And it was also stated that concentration of EGF in goat milk to be influenced by pregnancy and lactation status (Dehnhard et al. 2000). Throughout the study none of the buffaloes were pregnant. The possibility of EGF exchange due to pregnancy was eliminated in this way.

## CONCLUSION

This study indicated a significant correlation between SCC, CMT and EGF concentrations in Anatolian buffalo milk with subclinical mastitis. These results revealed that milk EGF assay together with SCC could be a useful tool for laboratory diagnosis of subclinical mastitis as well as for monitoring udder health.

## Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## ACKNOWLEDGEMENT

*This study was supported by Ondokuz Mayıs University Research Fund (project number PYO.VET.1901.17.010)*

## REFERENCES

- Bardakcioglu HE, Sekin S, Oral Toplu HD.** Relationship between some teat and body measurements of Holstein cows and sub-clinical mastitis and milk yield. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2011; 10: 1735-1737.
- Bradley AJ.** Bovine mastitis: An evolving disease. *The Veterinary Journal*. 2002; 164: 117-126.
- Dallard BE, Ruffino V, Heffel S, Calvinho LF.** Effect of a biological response modifier on expression of growth factors and cellular proliferation at drying off. *Journal of Dairy Science*. 2007; 90: 2229-2240.
- Ergun Y, Aslantas O, Kirecci E, Sarıbay MK, Ates AT, Ulku A, Demir C.** Prevalence and etiology of SCM in awassi dairy ewes in southern Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*. 2009; 33: 477-483.
- Fu NY, Rios AC, Pal B, Soetanto R, Lun AT, Liu K, Beck T, Best SA, Vaillant F, Bouillet P, Strasser A, Preiss T, Smyth GK, Lindeman GJ, Visvader JE.** EGF-mediated induction of Mcl-1 at the switch to lactation is essential for alveolar cell survival. *Nat. Cell Biol*, 2015; 17, 365-375.
- Gabadage K, Chirino-Trejo,M, Campbell J, Luby C.** Efficacy of recombinant bovine epidermal growth factor in the treatment of experimental subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in a ewe model. *Veterinary Record Open*. 2017; 4: e000179.
- Guha A, Guha R, Gera S.** Comparison of  $\alpha$ 1-antitrypsin,  $\alpha$ 1-acid glycoprotein fibrinogen and Nox as indicator of subclinical mastitis in riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *Asian Australas. Journal of Animal Science*, 2013; 26: 788-794.
- IDF.** Bovine Mastitis: Definition and guidelines for diagnosis. *Bulletin of the International Dairy Federation*, No. 211, Belgium. 1987.
- Ozenc E, Vural MR, Sekeri E, Ucar M.** An evaluation of SCM during lactation in Anatolian buffaloes. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*. 2008; 32: 359-368.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR.** *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby- Year Book Europe, London, 1994.
- Schalm, OW, Carroll EJ, Jaire NC.** Bovine mastitis. *Lea and Febiger, Philadelphia, PA*. 1971; 80-89.
- Sharma N, Singh NK, Bhadwal MS.** Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 2011; 24: 429-438.
- Sheffield LG.** Mastitis increases growth factor messenger ribonucleic acid in bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*. 1997; 80: 2020-2024.
- Sudhan NA, Sharma N.** Mastitis-An important production disease of dairy animals. *SMVS' DAIRY YEAR BOOK*, 2010; 72-88.

## Protective Effect of N-Acetylcysteine on The Kidney and Liver Pathology Induced by NMDA Receptor Antagonist Mk-801 in Mice

Murat Sırrı AKOSMAN<sup>1\*</sup>, Hasan Hüseyin DEMİREL<sup>2</sup>, Ruhi TURKMEN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, University of Afyon Kocatepe, Afyonkarahisar, Turkey

<sup>2</sup>Bayat Vocational School, University of Afyon Kocatepe, Afyonkarahisar, Turkey

<sup>3</sup>Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Afyon Kocatepe, Afyonkarahisar, Turkey

### ABSTRACT

The glutamatergic system and its receptor N-methyl-D-aspartate (NMDA) is an important synapse mechanism in the nervous system. The MK-801 is the blocker of this receptor and according to the literature, the sub-chronic administration of 1mg/kg MK-801 resulted in schizophrenia-like symptoms and degeneration in the mice brain. The aim of the present study was to observe whether this dose of MK-801 has any pathological effect on the liver and kidney tissues and whether N-acetylcysteine (NAC) was a protective effect. For this purpose, the 24 Balb/C male mice were divided into 4 groups, equally. The first group was the control and 0.9% saline (10mg/kg) was intraperitoneally (i.p.) injected. The 1mg/kg MK-801 was i.p. administered to the second group. The third group was i.p. received 1mg/kg MK-801, 100 mg/kg NAC and finally the 100mg/kg NAC i.p. injected to the fourth group. The drug administration was ended on the 14<sup>th</sup> day. The kidney and the liver of the sacrificed mice were collected and routine histology procedure was applied. The histopathological changes in the organs and NAC's mostly protective effect were noticed after the observations. In conclusion, NAC has a partially but significantly protective effect against the MK-801 dependent histopathological changes on the kidney and liver tissues.

**Keywords:** Histopathology, Kidney, Liver, Mice, MK-801, N-acetylcysteine

\*\*\*

### Farelerde NMDA Reseptör Antagonisti Mk-801 ile Böbrek ve Karaciğerde Oluşan Patolojik Değişikliklere Karşı N-Asetilsisteinin Koruyucu Etkisi

### ÖZ

Glutamaterjik sistem sinir sisteminde önemli bir sinaps mekanizmasıdır. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri bu sistemin önemli bir parçasıdır. NMDA reseptörlerinin hipofonksiyonu farelerde kognitif ve motorik sorunlara sebep olmaktadır. MK-801 bu reseptörün oldukça önemli bir blokördür. 1mg/kg MK-801'in sub-kronik uygulanması farelerde şizofreni benzeri semptomlara ve beyinde dejenerasyona sebep olmaktadır. Sunulan bu çalışmada MK-801'in 1mg/kg'lık sub-kronik uygulamasının farelerin böbrek ve karaciğerlerinde patolojik etkileri olup olmadığı ve N-asetilsisteinin'in (NAS) bu etkiler karşısında koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla 24 adet erkek Balb/C faresi alınarak dört eşit gruba bölündü. İlk grup kontrollerden oluştu ve bu gruba %0,9 fizyolojik tuzlu su (10mg/kg) intraperitoneal (i.p.) yolla, ikinci gruba 1mg/kg dozunda MK-801 i.p., üçüncü gruba 1mg/kg MK-801 ile 100mg/kg NAS birlikte i.p ve dördüncü gruba da 100mg/kg NAS i.p. yolla verildi. İlaç uygulamaları 14 gün boyunca sürdü. Sakrifiye edilen farelerin karaciğer ve böbrekleri alınarak bunlara rutin histoloji prosedürü uygulandı. İncelemelerden sonra organlarda histopatolojik değişiklikler ve NAS'ın genelde koruyucu etkisinin olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak NAS'ın böbrek ve karaciğer üzerinde MK-801'le indüklenen histopatolojik değişikliklere karşı önemli bir koruyucu etkisinin olduğu ortaya kondu.

**Anahtar Kelimeler:** Böbrek, Fare, Histopatoloji, Karaciğer, MK-801, N-asetilsistein

To cite this article: Akosman M.S, Demirel H.H, Türkmen R. Protective Effect of N-Acetylcysteine on The Kidney and Liver Pathology Induced by Nmda Receptor Antagonist Mk-801 in Mice. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):258-263.

Submission: 29.05.2019 Accepted: 17.07.2019 Published Online: 24.08.2019

ORCID ID; MSA: 0000-0001-6675-8840, HHD: 0000-0002-4795-2266, RT: 0000-0003-4726-3900

\*Corresponding author e-mail: akosmans@yahoo.com

## INTRODUCTION

Glutamate is the main neurotransmitter and the glutamatergic system is the most important synapse system of the nervous system (IOM 2011, Vandogen 2009). NMDA receptors are important elements of the glutamatergic system and hypofunction of this receptor can cause cognitive and motor problems in human and animals (Javitt 2007, Kruk-Slomka et al. 2016, Xiu et al. 2014, 2015). The NMDA receptor antagonist MK-801 is the blocker and the neurotoxic antagonist of this receptor (Ozyurt et al. 2014, Xiu et al. 2014, 2015). According to the previous studies, the higher doses of the MK-801 give harm to the internal organs (Fix et al. 2000). In addition, the sub-chronic dose of the MK-801 (1mg/kg) causes degenerations in the brain and revealed schizophrenia-like symptoms in the mice (Xiu et al. 2014, 2015). Recently, it was found out that the glutamatergic system transporters and receptors are placed in the several organs of the body such as kidney and liver (Hu et al. 2004). Within the kidney, NMDA receptors can be found in the cortex, medullary and renal proximal tubules (Dryer et al. 2015, Leung et al. 2008).

Low doses of MK-801 can be used therapeutically in kidney and liver degeneration. For example, the 0.5 mg/kg of MK-801 administration during 28 days was mitigated the glomerular and tubular dysfunction in the ischemic and reperfused kidneys (Lin et al. 2015, Roshanravan et al. 2016). It was also ameliorated the kidney damage dependent on gentamicin use (Leung et al. 2004). Controversially, MK-801 causes some degeneration of the kidney because the kidneys reduce the glomerular filtration rate and increase the number of podocytes (Deng et al. 2002, 2009, Giardino et al. 2009, Hashimoto 2017). In addition, MK-801 has been shown to intensify the harmful effects of dexamethasone and to make morphological changes after individual applications (Sekita-Krzak et al. 2004). Information about the effects of MK-801 on the liver is limited in the literature. Previously, it was reported that MK-801 could be used as a preventive in acute liver failure (Cauli et al. 2008, Rodrigo et al. 2009).

The antioxidant NAC is the mostly known mucolytic agent and the paracetamol antidote (Deepmala et al. 2015). However, it is known that the NAC ameliorates the glomerular filtration rate, improves the kidney function and reduces the inflammation in the kidney (Nitescu et al. 2006). The NAC is also effective and prophylactic on liver disorders such as fatty liver and hepatotoxicity (Khoshbaten et al. 2010).

The aim of this study was to observe the harmful effects of sub-chronic administration of 1 mg/kg

MK-801 and the protective effect of NAC on the kidney and liver of mice.

## MATERIAL and METHODS

### Animals

This study was conducted on 24 male Balb/c mice (obtained from the Kobay a.ş.) under the permission of the Ethical Committee of Experimental Animals, Afyon Kocatepe University, AKUHADYEK-189-17. The animals were kept at the Experimental Animal Research Centre of Afyonkarahisar. The room temperature was adjusted to  $22 \pm 2$  °C with a 12/12h light/dark cycle and ad libitum feeding.

### Groups and dosages

The 24 mice were equally divided into 4 groups. The Group I was the control and 0.9% saline (10ml/kg) was intraperitoneally (i.p.) injected due to MK-801 (Sigma, St. Louis, MO, USA) dissolved in the saline. The MK-801(1mg/kg) i.p. injected to Group II. The Group III was i.p. received 1mg/kg MK-801 and 100mg/kg NAC and the fourth group was i.p. received 100 mg/kg NAC. All injections were performed for 14 days. In the third group, NAC was injected in the morning and MK-801 was injected in the afternoon.

### Histological tissue processing

At the end of the trial, all the mice were sacrificed and the necropsy was formed. The kidney and liver were collected and fixed by 10% formalin during two weeks and then embedded into paraffin. The tissues were trimmed into 5 µm thickness, consecutively. All the slides were stained with hematoxylin-eosin.

### Tissue evaluation

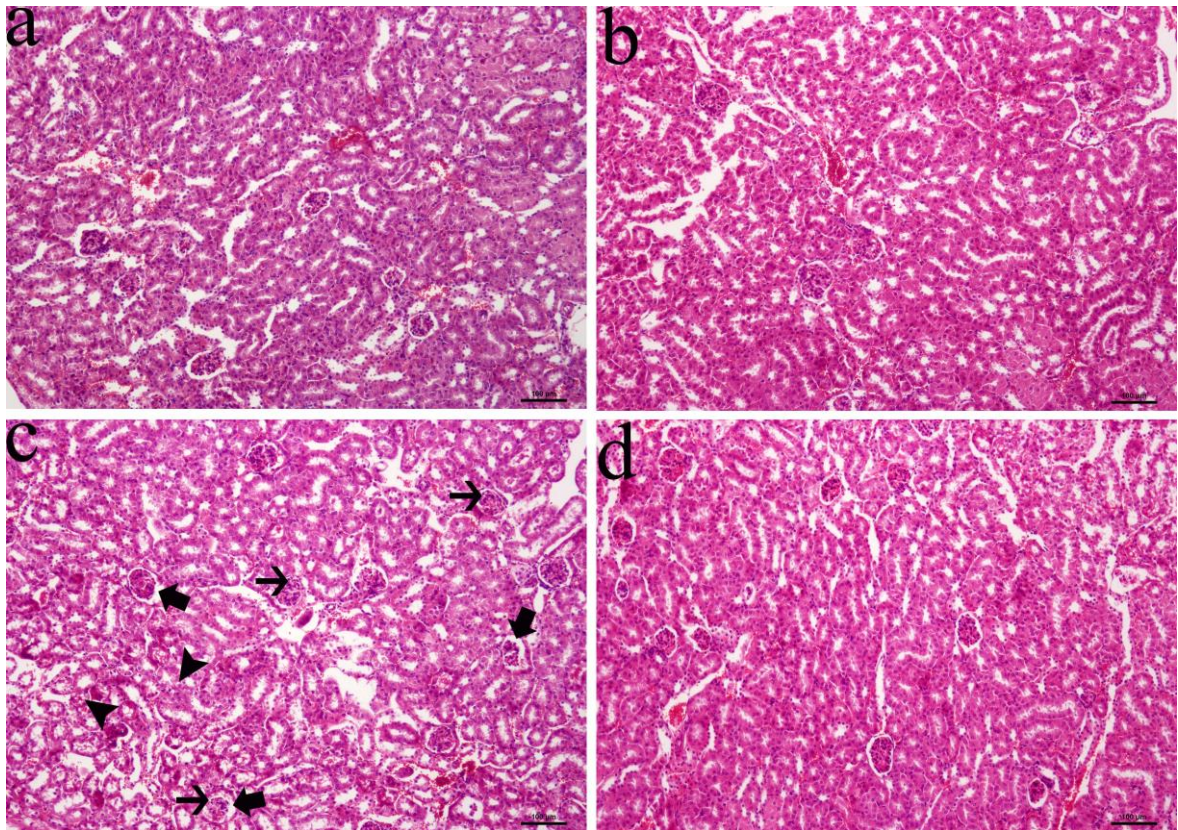
The glomerular atrophy was evaluated on the computer loaded M-Shot software attached to the Olympus microscope with M-Shot 14 mp camera. Semiquantitative scoring of the liver and kidney was done according to previous research (Gibson-Corley et al. 2013).

### Statistical analysis

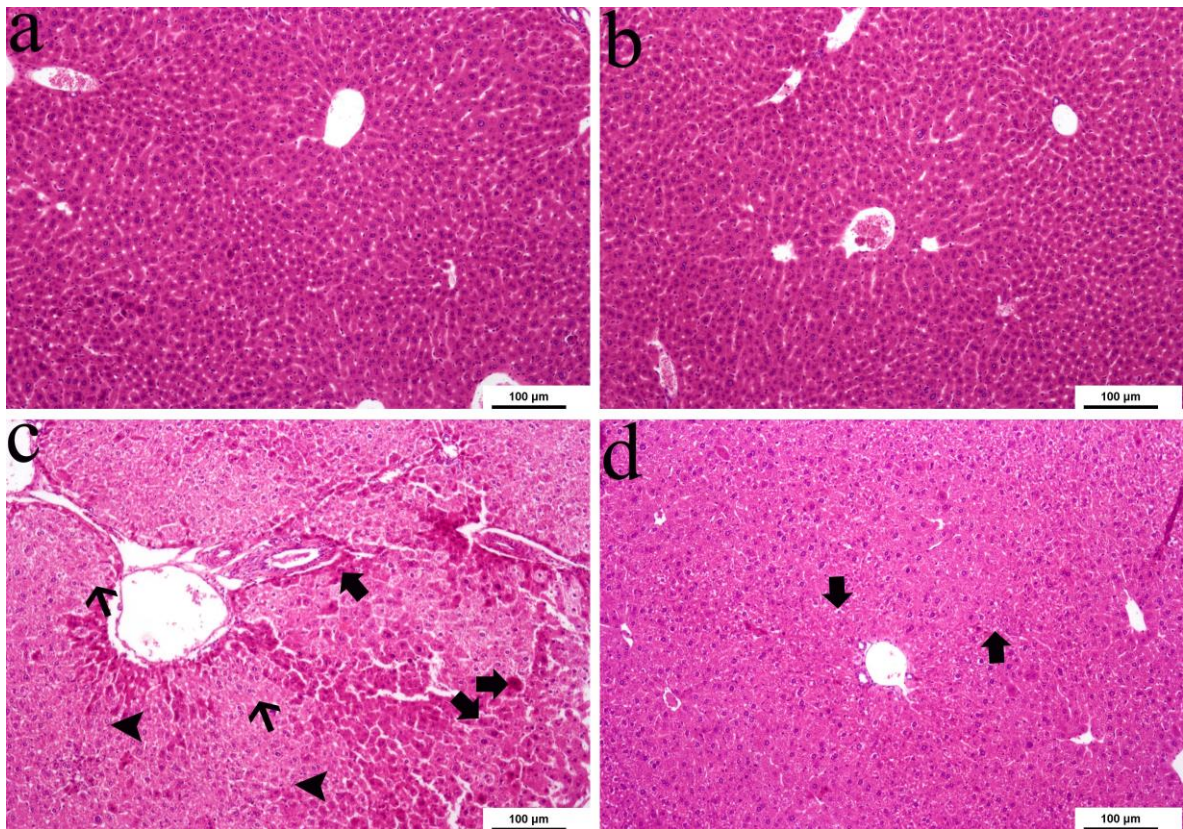
The data about the glomerular shrinkage was estimated as means and standard deviations and analysed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan posthoc test on the SPSS 16.0 software computer programme. A difference in the mean values of  $P < 0.05$  was considered to be significant.

## RESULTS

The glomerular atrophy in the kidney and histopathological changes both in the kidney and liver tissue was observed after the sub-chronic administration of 1mg/kg MK-801 (Table 1, 2 and Figure 1, 2). Besides, the protective role of the NAC was expressed in the tables and figures.



**Figure 1.** a. Control group, b. NAC group, c. MK-801 group; thick arrow: expansion in the bowman-space, thin arrow: vacuolar degeneration in the glomerulus, arrowhead: degenerative and necrobiotic changes in the tubular epithelial cells d. MK-801+NAC group



**Figure 2.** a. Control group, b. NAC group, c. MK-801 group: Thick arrow: Double-nuclei hepatocytes in the periportal area, Thin arrow: multifocal coagulation necrosis, Arrowhead: Kupffer cell activation, d. MK-801+NAC group: Thick arrow: Vacuolar degeneration area around the central vein

**Table 1.** Measurement of the glomerulus diameter.

Groups	The mean glomerulus diameter
Control	112±5 <sup>a</sup>
MK-801	102±8 <sup>b</sup>
NAC + MK-801	107±7 <sup>ab</sup>
NAC	110±3 <sup>a</sup>
P value	0,03

Values are the mean ± S.D, n=6.

<sup>a,b</sup>: In the same column values with different letters show statistically significant differences in “the mean glomerulus diameter” (P<0,05)

**Table 2.** Histopathological observation of the liver and kidney

Tissue	Histo-pathological findings	Control	NAC	MK-801	MK-801 + NAC
<b>Liver</b>	Multifocal coagulation necrosis	-(7/7)	-(7/7)	+(4/7) ++(1/7) +++ (2/7)	-(7/7)
	Kupffer cell activation	-(7/7)	-(7/7)	-(3/7) +(1/7) ++(3/7)	-(5/7) +(2/7)
	Double-nuclei hepatocytes in the periportal area	-(7/7)	-(7/7)	+(5/7) ++(2/7)	-(7/7)
	Vacuolar degeneration around the central veins	-(7/7)	-(7/7)	+(7/7)	-(6/7) +(1/7)
<b>Kidney</b>	Vacuolar degeneration in the glomerulus	-(7/7)	-(7/7)	-(2/7) +(3/7) ++(2/7)	-(7/7)
	Expansion in the bowman-space	-(7/7)	-(7/7)	+(3/7) ++(4/7)	-(6/7) +(1/7)
	Degenerative and necrobiotic changes in the tubular epithelial cells	-(7/7)	-(7/7)	+(4/7) ++(2/7) +++ (1/7)	-(7/7)

-:No lesions, +Mild, ++:Moderate, +++: Severe

## DISCUSSION

The glutamatergic system and its units are the important neurotransmitter mechanism in the brain (IOM 2011) and the NMDA receptors are one of the most important pieces of this system. The recent findings revealed that the hypo function of the NMDA receptors occurs cognitive and motoric problems (Xiu et al. 2014, 2015). The MK-801 is the blocker and toxic antagonist of this receptor and it's 1mg/kg sub-chronic dose administration during 14 days to the mice resulted in schizophrenia-like symptoms (Xiu et al. 2014, 2015). Besides the NMDA receptors are placed in the brain, it was discovered that they also expressed in the liver and kidney.

However, there is limited knowledge in the literature about the effect of this dose on the liver and kidney. In the previous studies, it was reported that 0.3mg/kg of MK-801 causes slight narrowing in the urinary space of the nephrons and its combination with the dexamethasone additionally to the hyperemia in the kidney, dilated the spaces in the nephrons (Sekita-Krzak et al. 2004). Moreover, in another research, the MK-801 administration was constructed the kidney veins, reduced the glomerular filtration rate and produced abundant podocyte skeleton (Deng et al. 2002, 2009, Giardino et al. 2009, Hashimoto 2017). Besides, in this study, the sub-chronic administration of the MK-801 caused vacuolar degeneration in the glomerulus, expansion in the bowman-space, degenerative and necrobiotic changes in the tubular epithelial cells where the NMDA receptors



expression areas. The NAC application is protected against these harmful effects on the kidney.

In the literature, the effect of the MK-801 on the liver was very limited. In the previous studies, the MK-801 has treated the ALF syndrome (Cauli et al. 2008, Rodrigo et al. 2009). However, due to the side effects of MK-801 such as the cognitive and motoric problems, it's not suitable in the clinical practice. Additionally to this, the findings of the present study revealed that the sub-chronic administration of the MK-801 causes multifocal coagulation necrosis, kupffer cell activation, hepatocytes with double-nuclei in the periportal area and vacuolar degeneration around the central veins. The NAC administration has protected the tissue on a large scale.

In conclusion, in the present study, the harmful effects of the sub-chronic administration of MK-801 on the kidney and liver and the protective effect of the NAC against this administration were revealed. NAC inhibits most of the destructive effect of MK-801 and it is particularly important to prevent degenerative and necrobiotic changes of tubular epithelial cells due to the expression domains of NMDA receptors in the kidney.

#### ACKNOWLEDGEMENT

*This study was supported by the Afyon Kocatepe University Scientific Research Project Coordination Unit (17.Kariyer.45).*

#### REFERENCES

**Cauli O, Rodrigo R, Boix J, Piedrafita B, Agusti A, Felipo V.** Acute liver failure-induced death of rats is delayed or prevented by blocking NMDA receptors in brain. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;295(3):G503-11.

**Deepmala J, Slattery N, Kumar L, Delhey M, Berk O, Dean C, Spielholz RF.** Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: a systematic review. *Neurosci Biobehav. Rev.* 2015;55:294-321.

**Deng A, Valdivielso JM, Munger KA, Blantz RC, Thomson SC.** Vasodilatory N-methyl-D-aspartate receptors are constitutively expressed in rat kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(5):1381-4.

**Deng A, Thomson SC.** Renal NMDA receptors independently stimulate proximal reabsorption and glomerular filtration. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296(5):F976-82.

**Dryer SE.** Glutamate receptors in the kidney. *Nephrology Dialysis Transplantation,* 2015;30(10):1630-1638.

**Fix AS, Stützel SR, Ridder GM, Switzer RC.** MK-801 neurotoxicity in cupric silver-stained sections: lesion reconstruction by 3-dimensional computer image analysis. *Toxicol Pathol.* 2000;28(1):84-90.

**Giardino L, Armelloni S, Corbelli A, Mattinzoli D, Zennaro C, Guerrot D, Tourrel F, Ikehata M, Li M, Berra S, Carraro M, Messa P, Rastaldi MP.** Podocyte glutamatergic signaling contributes to the function of the

glomerular filtration barrier. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(9):1929-40.

**Gibson-Corley KN, Olivier AK, Meyerholz DK.** Principles for valid histopathological scoring in research. *Vet Pathol.* 2013;50(6):1007-15.

**Hashimoto K:** The NMDA receptors. Humana Press. pp. 62-64, 2017.

**Hu JH, Yang N, Ma YH, Jiang J, Zhang JF, Fei J, Guo LH.** Identification of glutamate transporters and receptors in mouse testis. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25:366-371.

**IOM (Institute of Medicine).** Glutamate-related biomarkers in drug development for disorders of the nervous system: A workshop summary. Washington, DC: The National Academies Press. pp: 5-8. 2011.

**Javitt DC.** Glutamate and schizophrenia: phencyclidine, N-methyl-D-aspartate receptors, and dopamine-glutamate interactions. *Int Rev Neurobiol.* 2007;78:69-108.

**Khoshbaten M1, Aliasgarzadeh A, Masnadi K, Tarzamani MK, Farhang S, Babaei H, Kiani J, Zaare M, Najafipour F.** N-acetylcysteine improves liver function in patients with non-alcoholic Fatty liver disease. *Hepat Mon.* 2010;10(1):12-6.

**Kruk-Slomka M, Budzynska B, Slomka T, Banaszkiwicz I, Biala G.** The influence of the CB1 receptor ligands on the schizophrenia-like effects in mice induced by MK-801. *Neurotox Res.* 2016;30:658-676.

**Leung JC, Marphis T, Craver RD, Silverstein DM.** Altered NMDA receptor expression in renal toxicity: Protection with a receptor antagonist. *Kidney Int.* 2004;66(1):167-176.

**Leung JC, Ragland N, Marphis T, Silverstein DM.** NMDA agonists and antagonists induce renal culture cell toxicity. *Med Chem.* 2008;4(6):565-571.

**Lin CS, Hung SF, Huang HS, Ma MC.** Blockade of the N-Methyl-D-Aspartate glutamate receptor ameliorates lipopolysaccharide-induced renal insufficiency. *PLoS ONE.* 2015;10(7):1-18.

**Nitescu N, Ricksten SE, Marcussen N, Haraldsson B, Nilsson U, Basu S, Guron G.** N-acetylcysteine attenuates kidney injury in rats subjected to renal ischaemia-reperfusion. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21:1240-1247.

**Ozyurt H, Ozyurt B, Sarsilmaz M, Kus I, Songur A, Akyol O.** Potential role of some oxidant/antioxidant status parameters in prefrontal cortex of rat brain in an experimental psychosis model and the protective effects of melatonin. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(15):2137-2144.

**Rodrigo R, Cauli O, Boix J, ElMili N, Agusti A, Felipo V.** Role of NMDA receptors in acute liver failure and ammonia toxicity: therapeutic implications. *Neurochem Int.* 2009;55(1-3):113-8.

**Roshanravan H, Kim EY, Dryer SE.** NMDA Receptors as Potential Therapeutic Targets in Diabetic Nephropathy: Increased Renal NMDA Receptor Subunit Expression in Akita Mice and Reduced Nephropathy Following Sustained Treatment With Memantine or MK-801. *Diabetes.* 2016;65(10):3139-50.

**Sekita-Krzak J, Visconti J, Wójtowicz Z, Zebrowska-Lupina I, Ossowska G, Klenk-Majewska B.** Histological examination of the kidney after experimental administration of MK-801 and dexamethasone. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med.* 2004;59(2):70-4.

**Vandongen MA.** Biology of the NMDA receptor. CRC Press Taylor and Francis Group. USA. pp:1-8. 2009.

**Xiu Y, Kong XR, Zhang L, Qiu X, Chao FL, Peng C, Gao Y, Huang CX, Wang SR, Tang Y.** White matter injuries induced by MK-801 in a mouse model of schizophrenia based on NMDA antagonism. *Anat Rec (Hoboken)*. 2014;297(8):1498-507.

**Xiu Y, Kong XR, Zhang L, Qiu X, Gao Y, Huang CX, Chao FL, Wang SR, Tang Y.** The myelinated fiber loss in the corpus callosum of mouse model of schizophrenia induced by MK-801. *J Psychiatr Res*. 2015;63:132-40.

## Anti-Proliferative Effect of Melamine on Human Colon Adenocarcinoma Cells

Hidayet TUTUN\*

Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, 15030, Burdur, TURKEY

### ABSTRACT

Melamine is an organic chemical used primarily as a plastics stabilizer and fire retardant. Also, it was used to fraudulently elevate the protein content of animal feed and dairy products, which led to infant kidney diseases and pet deaths. In this study, melamine was studied for its effects on growth in the human colon adenocarcinoma cells (Caco-2). Different concentrations of medium-dissolved melamine were incubated for 24 h with Caco-2 cells and tested for its anti-proliferative potential using MTT assay. Half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of melamine was calculated from dose-response curve and found to be 14636 µg/L in the cells. The results demonstrated that the dose dependent melamine decreased cell proliferation and direct anti-proliferative effect in Caco-2 cells.

**Keywords:** Anti-proliferative, Caco-2, Melamine, MTT

\*\*\*

### Melaminin İnsan Kolon Adenokarsinom Hücreleri Üzerindeki Anti-Proliferatif Etkisi

#### ÖZ

Melamin, öncelikle plastik dengeleyici ve yangın geciktirici olarak kullanılan organik bir kimyasaldır. Hayvansal yem ve süt ürünlerinin protein içeriğini suni şekilde yükseltmek için kullanılmasıyla bebeklerde böbrek hastalıklarına ve hayvan ölümlerine yol açmıştır. Bu çalışmada, melaminin insan kolon adenokarsinom hücrelerinin (Caco-2) proliferasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda çözülmüş melamin Caco-2 hücreleri ile 24 saat inkübe edildi ve MTT testi kullanılarak anti-proliferatif potansiyeli test edildi. Melaminin yarı maksimal inhibisyon konsantrasyonu (IC<sub>50</sub>), doz-cevap eğrisinden hesaplandı ve hücrelerde 14636 µg/L olarak bulundu. Sonuçlar doza bağımlı olarak melaminin Caco-2 hücrelerinin proliferasyonunu azalttığını ve Caco-2 hücrelerine karşı anti-proliferatif etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Anti-proliferatif, Caco-2, Melamin, MTT

To cite this article: Tutun H. Anti-Proliferative Effect of Melamine on Human Colon Adenocarcinoma Cells. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):264-267.

Submission: 12.06.2019

Accepted: 17.07.2019

Published Online: 24.08.2019

ORCID ID; HT: 0000-0001-9512-8637

\*Corresponding author e-mail: hidayettutun@gmail.com

## INTRODUCTION

Melamine (2, 4, 6-triamino-1, 3, 5-triazine) is an organic base chemical becoming headline news recently after the occurrence of an outbreak of nephrolithiasis and acute kidney injury among infant and young children due to consumption of milk adulterated with melamine to fraudulently elevate its protein content in China. (Chan et al. 2008, Skinner et al. 2010). Also, in 2004 in Asia and in 2007 in North America, melamine-contaminated pet food resulted in renal failure outbreaks in dogs and cats (Guan and Deng 2016). Though melamine has a low acute toxicity with a high LD<sub>50</sub> in animals, it causes chronic renal toxicity including formation of kidney stones and kidney injury when chronic ingestion of melamine-adulterated food and feed in excessive doses (Dalal and Goldfarb 2011, Hau et al. 2009). Many researchers have focused on the effect of melamine-related renal failure, but there is little information about the toxic effects of melamine to other tissues and cancers (Choi et al. 2010, Han et al. 2011, Hsieh et al. 2012). Therefore, it is necessary to investigate the possible anti-proliferative effects of melamine. The aim of the present study was to investigate the anti-proliferative effects of melamine on Human Colon Adenocarcinoma Cells (Caco-2).

## MATERIALS and METHODS

### Cell Culture

Caco-2 cells (ATCC® HTB-37™) were maintained in the Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich®) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma), 100,000 U/L penicillin and 10 mg/L streptomycin (Thermo Fisher Scientific, USA) in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> and at 37°C. The cells for experiments were seeded at 1x10<sup>3</sup> cells/well in 96 well plates (BD Falcon, Rockville).

### Cell Viability Assay

Melamine (Sigma-Aldrich®) were dissolved in DMEM and diluted to working concentrations (100, 50, 12.5, 6.25, 3.124, 1.563 and 0.781 µg/ml) with fresh medium. After serial dilution of melamine, cell viability was estimated at 24 h by MTT (3-[4, 5-dimethylthiazole-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) assay to obtain IC<sub>50</sub> concentrations of melamine as described by Ulukaya et al. (2008). Briefly, after 24 h incubation with melamine, the medium was aspirated and MTT was added to reach a final concentration of 0.5 mg/mL for 4 h. Formazan crystals formed by viable cells were dissolved in Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Merck). Cell viability was analyzed using the SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, USA) at 540 nm wavelength. Triton X-100 (0.1%) was used as positive control and the cell cultivation medium was used as negative control (nontoxic, untreated). The cell viability (growth) was calculated

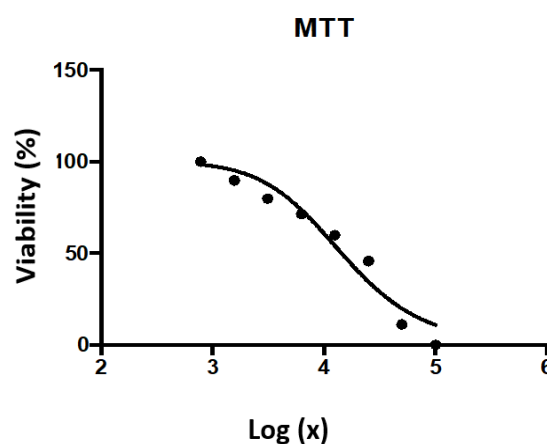
according to the nontoxic control, which was considered to be %100 viability. Positive control was set to 0% viability. The degree of inhibition of melamine treated cells was expressed as a percentage of control cells (untreated). The half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) value representing the concentration of melamine that is required for 50% inhibition was calculated using a statistical program.

### Statistics

IC<sub>50</sub> was determined using the Software GraphPad PRISM (version 7).

## RESULTS

MTT assay was carried out to determine anti-proliferative effect of melamine on Caco-2 cells. Figure 1 demonstrates the growth inhibition curves of melamine at different concentrations. IC<sub>50</sub> value of melamine was calculated and founded to be 14636 µg/L (Table 1). This result referred to the anti-proliferative effect of melamine.



**Figure 1.** The inhibition curve of melamine at eight different concentrations.

**Table 1.** IC<sub>50</sub> levels (µg/L) of melamine, according to the MTT

Log(Inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope	
<b>Best-fit values</b>	
IC <sub>50</sub>	14636
HillSlope	-1.224
logIC <sub>50</sub>	4.165
<b>Std. Error</b>	
LogIC <sub>50</sub>	0.06791
HillSlope	0.216
<b>95% Confidence Intervals</b>	
IC <sub>50</sub>	9983 to 21458
HillSlope	-1.753 to -0.6956
logIC <sub>50</sub>	3.999 to 4.332
R square	0.9547

## DISCUSSION

There are a wide range of chemicals available in the market. It is important to investigate whether these chemicals have toxic effects on humans and animals (Bilir et al. 2018, Florento et al. 2012). The *in vitro* cytotoxicity test is one of the most important consideration to evaluate bioactive compounds. The cytotoxic responses of various cell types to various chemicals are assessed using cell based assays, such as MTT, lactate dehydrogenase enzyme test. MTT is colorimetric test to use for the measurement of cell proliferation (cell growth rate), cytostatic effects or cytotoxic effects. It is commonly used for the assessments of cytotoxic compounds like anticancer drugs, toxic agents, and other pharmaceuticals (Aslantürk 2017, Florento et al. 2012, Mervin et al. 2016). A change in cell number causes a concomitant change in the level of formazan crystals produced by cellular reduction of the MTT, demonstrating the degree of cytotoxicity induced by the chemicals. IC<sub>50</sub> is the concentration of the tested chemical that lead to the death of 50% of the cells, might be used to predict the degree of cytotoxicity (Florento et al. 2012).

Melamine is an organic chemical causing nephrotoxicity in human and animals. Numerous study on the toxicity of melamine focused on renal damage. However, there are a few research on the cytotoxicity of melamine (Liu et al. 2014). It has been shown that melamine caused apoptosis of the normal rat kidney (NRK)-52e cells via excessive production of cellular Reactive Oxygen Species and the activation of p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) signaling pathway, leading to cellular apoptosis (Guo et al. 2012). In another study, melamine revealed IC<sub>50</sub> values of 1.89 and 2.07 mg/mL in NRK-52e cells and 293T cells (Normal human kidney cell lines), respectively (Sun et al. 2016). Radko et al. (2010) reported that after 48 h of exposure of melamine, EC<sub>50</sub> values for FaO (Rat hepatoma cells) and L6 cells (Rat skeletal muscle cells) were 6.4 and 8.2 mM, respectively. In other study, it has been reported that the 24-h IC<sub>50</sub> values of melamine in Madin-Darby canine kidney epithelial cell line (MDCK) and human renal adenocarcinoma cell line (ACHN) were 4792 and 2792 µg/ml, respectively (Choi et al. 2010). In the present study, after 24-hour exposure of melamine, IC<sub>50</sub> value for Caco-2 cells were 14636 µg/L. Cell proliferation was suppressed by melamine in a dose-dependent manner in this study. The cytotoxicity of melamine in cancer cell lines such as Caco-2, FaO, ACHN was more potent than in normal cells such as L6 cells, MDCK, NRK-52 (Choi et al. 2010, Guo et al. 2012, Radko et al. 2010, Sun et al. 2016).

## CONCLUSION

There are no studies on the anti-proliferative activity of melamine on human colon adenocarcinoma cells before. In the present study, it was examined the anti-proliferative activity of melamine on these cells. The cells appeared to be sensitive to melamine. The anti-proliferative effect of melamine was found to be moderate in this cell line.

## ACKNOWLEDGEMENT

*The generous gift of Caco-2 cells from Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN (Ankara University Veterinary Faculty, Turkey) is gratefully acknowledged.*

## REFERENCES

- Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In Genotoxicity-A Predictable Risk to Our Actual World. IntechOpen. 2017; DOI: 10.5772/intechopen.71923.
- Bilir EK, Tutun H, Sevin S, Kismalı G, Yarsan E. Cytotoxic Effects of Rhododendron ponticum L. Extract on Prostate Carcinoma and Adenocarcinoma Cell Line (DU145, PC3). Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2018; 24(3): 451-457.
- Chan EYY, Griffiths SM, Chan CW. Public-health risks of melamine in milk products Lancet, 2008; 372 (9648): 1444-1445
- Choi L, Kwak MY, Kwak EH, Kim DH, Han EY, Roh T, Bae JY, Ahn IY, Kwon MJ, Jang DE, Lim SK, Kwack SJ, Han SY, Kang TS, Kim SH, Kim HS, Lee BM. Comparative nephrotoxicity induced by melamine, cyanuric acid, or a mixture of both chemicals in either Sprague-Dawley rats or renal cell lines. J Toxicol Environ Health A, 2010; 73(21-22): 1407-1419.
- Florento L, Matias R, Tuaño E, Santiago K, dela Cruz F, Tuazon A. Comparison of cytotoxic activity of anticancer drugs against various human tumor cell lines using in vitro cell-based approach. Int J Biomed Sci, 2012; 8(1): 76.
- Guan X, Deng Y. Melamine-associated urinary stone. Int J Surg, 2016; 36(d), 613-617.
- Guo C, Yuan H, He Z. Melamine causes apoptosis of rat kidney epithelial cell line (NRK-52e cells) via excessive intracellular ROS (reactive oxygen species) and the activation of p38 MAPK pathway. Cell Biol Int, 2012; 36(4): 383-389.
- Han YG, Liu SC, Zhang T, Yang Z. Induction of apoptosis by melamine in differentiated PC12 cells. Cell Mol Neurobiol, 2011; 31(1): 65-71.
- Hau AKC, Kwan TH, Li PKT. Melamine toxicity and the kidney. J Am Soc Nephrol, 2009; 20(2): 245-250
- Hsieh TJ, Hsieh PC, Tsai YH, Wu CF, Liu CC, Lin MY, Wu MT. Melamine induces human renal proximal tubular cell injury via transforming growth factor-β and oxidative stress. Toxicol Sci, 2012; 130(1): 17-32.
- Liu X, da Huang W, Wu KJ, Wu YN, Jia XW, Gong ZY. An evaluation of genotoxicity and cytotoxicity of melamine in combination with cyanuric acid at three mass ratios. Bio Environ Sci, 2014; 27(8): 641-645.

- Mervin LH, Cao Q, Barrett IP, Firth MA, Murray D, McWilliams L, Haddrick M, Wigglesworth M, Engkvist O, Bender A.** Understanding cytotoxicity and cytostaticity in a high-throughput screening collection. *ACS Chem. Biol.*, 2016; 11(11): 3007-3023.
- Radko L, Minta M, Stypula-Trebas S, Zmudzki J.** Determination of melamine cytotoxicity. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2010; 54: 223-228.
- Skinner CG, Thomas JD, Osterloh JD.** Melamine toxicity. *J Med Toxicol*, 2010; 6(1): 50-55.
- Sun H, Wang K, Wei H, Li Z, Zhao H.** Cytotoxicity, organ distribution and morphological effects of melamine and cyanuric acid in rats. *Toxicol Mech Methods*, 2016; 26(7): 501-510.
- Ulukaya E, Ozdikicioglu F, Oral AY, Demirci M.** The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicol in vitro*, 2008; 22(1): 232-239.

## Evaluation of 25 (OH) D<sub>3</sub> Concentrations in Neonatal Calves with Diarrhea

Tahir ÖZALP<sup>1</sup>, Hasan ERDOĞAN<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Adnan Menderes University, Veterinary Faculty, Internal Medicine Department, 09100, Aydın, Turkey

### ABSTRACT

In the present study the aim was to determine the relationship between plasma vitamin D<sub>3</sub> and fibrinogen concentrations of calves with diarrhea. In this context, calves neonatal diarrhea (n = 100) and healthy (n = 20) ones were enrolled. Diarrheic calves were enrolled into two intra-groups of mono and co-infected, then mono-infected calves and co-infected calves were divided into subgroups according to *E. coli*, Rotavirus, Coronavirus, *Cryptosporidium* sp., and *Giardia* sp., and Rotavirus + *Cryptosporidium* sp. and *E. Coli* + *Cryptosporidium* sp. It was determined that 6% of the calves were infected with and *E.coli*, 13% Rotavirus, 6% Coronavirus, 6% *Giardia* in mono-infected ones and 11% *E.coli* + *Cryptosporidium* sp., and 22% Rotavirus + *Cryptosporidium* sp., with co-infection and 17% healthy. According to healthy calves, mono-infected and co-infected calves had significantly higher fibrinogen concentrations, whereas 25 (OH) D<sub>3</sub> levels were significantly lower in both groups than healthy calves. There was a negative correlation between fibrinogen and 25 (OH) D<sub>3</sub> concentrations ( $r = - 403$ ,  $p < 0.05$ ) in calves with diarrhea. As a result, 25 (OH) D<sub>3</sub> concentrations decreased in diarrhea calves due to the presence and severity of the infection.

**Keywords:** Calf, fibrinogen, diarrhea, vitamin D<sub>3</sub>

\*\*\*

### Neonatal İshalli Buzağlarda 25 (OH) D<sub>3</sub> Konsantrasyonlarının Araştırılması

#### ÖZ

Bu araştırma ile neonatal dönemde ishal semptomu gösteren buzağların plazma vitamin D<sub>3</sub> ve fibrinojen konsantrasyonları arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlandı. Bu kapsamda neonatal ishalli (n=100) ve sağlıklı (n=20) buzağlar araştırmaya dahil edildi. İshalli buzağlar kendi içerisinde mono enfekte ve ko enfeksiyon gruplarına göre iki ana gruba, mono-enfekte buzağlar kendi içerisinde *E. coli*, Rotavirus, Coronavirus, *Cryptosporidium* sp., ve *Giardia* sp., ko-enfekte buzağlar ise Rotavirus + *Cryptosporidium* sp. ve *E. coli* + *Cryptosporidium* sp. olacak şekilde alt gruplara ayrıldı. Buzağların %6'sının *E. coli*, %19'u *Cryptosporidium* sp., %13'ü Rotavirus, %6'sı Coronavirus, %6'sı *Giardia* ile mono-enfekte, ko-enfekte buzağların ise %11'i *E. coli* + *Cryptosporidium* sp., ve %22'sinin Rotavirüs + *Cryptosporidium* sp., ile enfekte ve %17'nin sağlıklı olduğu belirlendi. Sağlıklı buzağlara göre mono enfekte ve ko-enfekte buzağların fibrinojen konsantrasyonlarının anlamlı düzeyde yüksek olduğu buna karşın 25 (OH) D<sub>3</sub> seviyelerinin ise her iki grupta sağlıklı buzağlara göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi. İshalli buzağlarda fibrinojen ve 25 (OH) D<sub>3</sub> konsantrasyonları arasında ( $r = - 403$ ,  $p < 0,05$ ) negatif korelasyon bulunduğu belirlendi. Sonuç olarak 25 (OH) D<sub>3</sub> konsantrasyonlarının ishalli buzağlarda enfeksiyonun varlığı ve şiddetine bağlı olarak azaldığı tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Buzağı, Fibrinojen, İshal, Vitamin D<sub>3</sub>

To cite this article: Özalp T, Erdoğan H. Evaluation of 25 (Oh) D<sub>3</sub> Concentrations in Neonatal Calves with Diarrhea. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):268-276.

Submission: 25.02.2019 Accepted: 17.07.2019 Published Online: 24.08.2019

ORCID ID; TÖ: 0000-0002-9873-0364, HE: 0000-0001-8109-8537

\*Corresponding author e-mail: hasan.erdogan@adu.edu.tr

## GİRİŞ

Buzağı ishalleri sığircılık işletmeleri en önemli problemlerinden biri olmaya devam etmektedir (Ok ve ark. 2009, House ve ark. 2011). Ekonomik kayıpların buzağı ishallerine neden olan etmenlerin hızlı bir şekilde teşhisinin yanı sıra oluşturdukları klinikopatolojik değişikliklerin belirlenmesiyle en aza indirilebileceği belirtilmektedir (Klein ve ark. 2009). Buzağılarda ishale bağlı gelişen klinikopatolojik değişimlerinin belirlenmesine yönelik yapılan araştırmaların hastalığın kontrolü ve sağaltımına ışık tutacak yeni verilerin belirlenmesine yardımcı olmaktadır. Beşeri hekimlikte yangı biyobelirteçleri ve vitamin D seviyeleri arasında önemli ilişkilerin bulunduğu ve söz konusu ilişkinin özellikle kardiyometabolik hastalıklar açısından önem arz ettiği bir çok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Hypponen ve ark. 2001, Lappe ve ark. 2007, Reis ve ark. 2009). Bununla birlikte farklı hastalıklarda yangı biyobelirteçleri ve vitamin D seviyeleri arasındaki değişimlerin değerlendirildiği araştırmalar her geçen gün önem kazanmaktadır (Jorgensen ve ark. 2010, Haque ve ark. 2012).

25 (OH) D<sub>3</sub> seviyelerinin farklı hastalıklar ve operatif durumlarla ilişkili yapılan değerlendirmelerinin yanında (Reis ve ark. 2009, Reid ve ark. 2011) bağırsak hastalıkları açısından da önem arz ettiği özellikle ishal oluşumunu sınırlayabileceği ve ishale karşı direnci artırabileceği yönü ile görüş birliği bulunmaktadır (Shamsir 2016). Çocuklarda ishale neden olan *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *S. typhimurium*, *Salmonella* ve *Shigella spp.* üzerinde bakterisit etkileri olan antimikrobik peptitlerin 25 (OH) D<sub>3</sub> aracılığı ile düzenlediğini bildirilmektedir (Ouellette ve ark. 1994, Welkamp ve ark. 2007, Gudmundsson ve ark. 2010). Söz konusu etkilerinin yanı sıra bağırsak yüzeyindeki enfeksiyonlara karşı koruma sağlamak ve sızıntılı bağırsak sendromunda gelişmesini engellemek gibi etkileri de bilinmektedir (Kong ve ark. 2008, Fujita ve ark. 2008). İnflamatuvar bağırsak hastalığına (IBH) sahip bireylerde serum 25 (OH) D<sub>3</sub> seviyelerinin normal ya da düşük seyir edebileceği ya da 25 (OH) D<sub>3</sub> seviyelerindeki azalmaların hastalığın bir sonucu olarak da şekillenebileceği yönü ile sonuçlara da ulaşılmaktadır (Aaron ve Andrew 2015).

Fibrinojen, temel olarak kan kanının pıhtılaşmasını veya fibrin oluşumunu uyaran 340 kDa boyutunda büyük bir glikoprotein olup bununla birlikte sığırlarda önemli bir akut faz proteini olduğu bilinmektedir (Conner ve ark. 1988). Sığırlarda fibrinojen inflamatuvar ve travmatik hastalıkların değerlendirilmesinde kullanıldığı ve enfeksiyonlarda yanıt olarak belirgin şekilde arttığı bildirilmektedir (Hirvonen ve Pyorala, 1998).

Söz konusu araştırma ile ishal semptomu bulunan buzağuların plazma 25 (OH) D<sub>3</sub> konsantrasyonlarının

belirlenerek, etiyolojik faktörlere bağlı olarak 25 (OH) D<sub>3</sub> ve plazma fibrinojen seviyeleri arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Hayvan Materyali ve Grupların Dizayını

Araştırmanın hayvan materyalini Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesine getirilen neonatal dönemde (1-28 gün) akut ishalleri, holştayn ırkı 100 buzağı ile benzer yaş aralığındaki sağlıklı 20 buzağı olmak üzere toplam 120 buzağı oluşturdu. Bovid-5 katı fazlı immunokromatografi yöntemi ile çalışan hızlı test kitleri aracılığıyla tanı konulan buzağular mono ve ko-enfeksiyon ana gruplarına ayrıldı. Mono enfeksiyon grupları kendi içerisinde I. Grup (*E. coli* ile enfekte), II. Grup (Rota virus ile enfekte), III. Grup (Coronavirus ile enfekte), IV. Grup (*Cryptosporidium sp.* ile enfekte) ve V. Grup (*Giardia sp.* ile enfekte) ve kontrol grubu VI. Grup (sağlıklı) olarak ayrıldı. Ko-enfeksiyon grupları ise *Rotavirus-Cryptosporidium* ve *E.coli-Cryptosporidium* ile enfekte hayvanları içerecek şekilde iki alt gruba ayrıldı (Resim 1). Araştırma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu izni (no:64583101/2018/052) ile gerçekleştirilmiştir.

### Kan Örneklerinin Alınması ve Klinik Değerlendirme

Araştırmaya dahil edilen buzağular hızlı test kitleri ile tanıyı takiben örnekleme işlemleri gerçekleştirildi. Bu kapsamda sodyum sitrat ve heparin içeren (Vacutte, Avusturya) tüplere *Vena jugularis* aracılığı ile toplamda 4 ml olacak şekilde bir defaya mahsus alındı. Etiyolojik olarak tanısı belirlenen ve gruplar içerisine dağıtılan buzağuların klinik muayeneleri gerçekleştirildi. Bu kapsamda dışkı skorlaması, deri elastikiyeti ve gözlerin orbita içerisindeki konumu milimetrik cetvelle ölçülüp aşağıdaki formüllerden yararlanılarak buzağuların dehidrasyon dereceleri belirlendi.

Dehidrasyon Derecesi [%] = 1.71 x [enofthalmus (mm)] + 0,38

Dehidrasyon Derecesi [%] = 1.77 x [deri elastikiyetinin normale dönmesi (sn)] - 3,16

Bu kapsamda dehidrasyon dereceleri göz önüne alınarak ishalden orta derecede etkilenen buzağular çalışmaya dahil edildi.

### Laboratuvar Örneklerin İşlenmesi

Kan örneklerinden kan sayımı (Abacus Junior Vet, Macaristan) ve kan gazı analizleri (IRMA True point, Amerika) gerçekleştirildikten sonra her iki örnek santrifüj işlemine (Hettich, Almanya, 3000 devir/dk) tabi tutularak heparin ve sitratlı plazma örnekleri elde edildi.

25 (OH) D<sub>3</sub> analizleri heparin plazmalar ile Florasan immuno kromatografi yöntemi kullanılarak flöresan immunoassey cihazı (Savant Beijing Savant



Biotechnology, Çin) ve 25-OH-D<sub>3</sub> test kitleri (Savant Beijing Savant Biotechnology, Çin) aracılığı ile gerçekleştirildi. Bu kapsamda üretici firmanın belirttiği prosedürler uygulandı. Fibrinojen analizleri için yarı otomatik koagülometre cihazı (Semi-Automatic Blood Coagulation Analyser C2000-4) kullanıldı. Yarı otomatik koagülometre cihazı ile yapılan fibrinojen analizinin test aşaması üretici firmanın belirttiği şekilde gerçekleştirildi. Sağlıklı ve ishallerli buzağılardan alınan kan örnekleri hematolojik (ve venöz kan pH' sı ve elektrolit değerleri fakültemiz bünyesinde kullanılan kan sayım cihazı (Abacus Junior Vet, Macaristan) ve kan gazı cihazı (Irma, Truepoint, Amerika) aracılığı ile gerçekleştirildi.

### İstatistiksel analizler

Elde edilen verilerin tanımlayıcı istatistikleri ve normalite testleri gerçekleştirildi. Tanımlayıcı veriler ortalama ve standart hata şeklinde tablolara aktarıldı. Normal dağılım göstermeyen verilere logaritmik transformasyon işlemi uygulandı ve normalite testleri tekrarlandı. Normal dağılım göstermeyen veriler ise Kruskal-wallis testi ile karşılaştırıldı. Tüm analizler SPSS21.0 (IBM, Amerika) programı yardımı ile gerçekleştirilerek p<0.05 değeri istatistiksel anlamlı kabul edildi.



**Resim 1.** Etken teşhisi yapılan buzağuların gruplandırılması  
**Figure 1.** Grouping of calves diagnosed as etiological agents

## BULGULAR

Araştırma kapsamında değerlendirilen ishallerli buzağuların dışkılarının sulu ve sıvı-pastöz kıvamda, renk ve kokusunun etiyolojik ajanların farklılıklarına göre değişimler gösterdiği açık sarı ve sarı dan gri beyaz ve gri kahverengi renklerde olduğu belirlendi. İshallerli buzağuların entansif yetiştiricilik yapılan süt işletmelerinde bulunan yalnızca süt ile beslenen ve 1-3 gündür ishal bulguları gösteren buzağular olduğu belirlendi. Buzağuların emme reflekslerinin zayıf birçoğunun sternal pozisyonda yatar halde olduğu ayağa kaldırıldığında yatma isteği içerisinde bulunduğu belirlendi. İshallerli buzağuların klinik muayeneleri kapsamında dehidrasyon dereceleri belirlenmiş olup gruplarda bulunan dehidrasyon derecelerinin dağılımının etiyolojik faktörlere bağlı olarak %7,57 ile %8,71 seviyelerinde değişim gösterdiği ve ishallerli buzağuların orta derecede dehidrasyona maruz kaldıkları belirlendi (Tablo 1.). Beden ısılarının 36,91 °C ile 38,46 °C arasında değiştiği en düşük beden ısı ortalamasının *E.coli* ile mono-enfekte buzağuların

oluşturduğu belirlendi. Kalp frekansının 106,29 ±3,96 vuruş/dk ile Coronavirus ile enfekte olan buzağularda en düşük seviyede, solunum sayısının ise 37,57 sayı/dk ile *E. coli* ile enfekte buzağularda bulunduğu tespit edildi (Tablo 2). İshallerli buzağuların etiyolojik faktörlere bağlı dağılımları Tablo 1 de gösterildi.

### Laboratuvar Bulgular

Monoenfekte, koenfekte ana grupları ile sağlıklı grup içerisinde değerlendirilen buzağuların total lökosit (WBC) sayılarının koenfekte grupta bulunan buzağuların sağlıklı grupta bulunan buzağulara göre anlamlı derecede (p<0,05) yüksek olduğu nötrofil (NEU) sayılarının monoenfekte ve koenfekte gruplarda sağlıklı gruba göre yüksek olduğu ve farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. Eritrosit (RBC) sayılarının enfeksiyon gruplarında sağlıklı gruba göre daha yüksek olduğu belirlendi. Sağlıklı buzağuların hematokrit (HCT) değerlerinin monoenfekte hayvanların ortalamasına göre anlamlı değişimlerin bulunmadığı ancak

koenfekte hayvanların ortalama HCT değerinin sağlıklı gruba göre anlamlı derecede ( $p<0,01$ ) yüksek olduğu belirlendi. Trombosit (PLT) sayılarının enfeksiyon gruplarına göre sağlıklı buzağuların ortalamaları ile farklılığının bulunmadığı buna karşın monoenfekte hayvanların PLT ortalamalarının koenfekte hayvanlara göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (Tablo 3).

Monoenfekte ve koenfekte ana grupları içerisinde bulunan buzağuların kan pH'sının mono-enfekte hayvanlarda, ko-enfekte ve sağlıklı gruplara kıyasla düşük olduğu mono enfeksiyon grubundaki buzağuların metabolik asidozisin şiddetinin daha yüksek olduğu ancak söz konusu değişimlerin istatistiksel anlamının olmadığı belirlendi. Tüm ana gruplarda  $Na^+$  ve  $K^+$  konsantrasyonunun istatistiksel anlamlı değişimlerin bulunmadığı,  $iCa^+$  konsantrasyonunun ise sağlıklı grupta bulunan buzağulara kıyasla enfeksiyon ana gruplarında anlamlı derecede düşük seyir ettiği belirlendi (Tablo 4)

Monoenfeksiyon ve koenfeksiyon alt gruplarının değerlendirilmesinde ise pH seviyelerinin *E.coli* ile enfekte buzağularda en düşük seviyede seyir ettiği,  $Na^+$  ve  $K^+$  konsantrasyonunda anlamlı değişimler bulunmaz iken  $iCa^+$  konsantrasyonunun Rotavirus ile monoenfekte hayvanlarda sağlıklı buzağulara göre

düşük seyir ettiği ve farklılığın istatistiksel anlamlı olduğu belirlendi (Tablo 5).

Mono-enfekte ve ko-enfekte ishalleri buzağuların 25 (OH) D<sub>3</sub> seviyelerinin Sağlıklı buzağulara göre istatistiksel anlamlı düşük olduğu belirlendi (Tablo 6.). Fibrinojen konsantrasyonlarının ise sağlıklı buzağulara göre mono-enfekte ve ko-enfekte buzağularda anlamlı yüksek olduğu bununla birlikte koenfeksiyonu bulunan buzağuların Fibrinojen konsantrasyonlarının monoenfekte buzağulara kıyas ile yüksek olduğu belirlendi. Sağlıklı ve ana enfeksiyon gruplarında bulunan buzağuların 25 (OH) D<sub>3</sub> ve Fibrinojen konsantrasyonlarının arasında istatistiksel anlamlı ( $r=-0,403$ ,  $p<0,01$ ) negatif yönlü bir korelasyonun bulunduğu belirlendi.

Sağlıklı buzağulara kıyasla tüm enfeksiyon alt gruplarındaki buzağuların 25 (OH) D<sub>3</sub> seviyelerinin istatistiksel anlamda düşük olduğu belirlenirken, Rota virus ile mono enfekte hayvanlarda 25 (OH) D<sub>3</sub> seviyelerinin en düşük, *E. coli* ile mono enfekte hayvanlarda ise en yüksek seviyede olduğu belirlendi. Buna karşın fibrinojen konsantrasyonlarının *E. coli* ile enfekte hayvanlarda en düşük düzeyde olduğu coronavirus ile enfekte hayvanlarda ise yüksek seviyede olduğu belirlendi (Tablo 7.)

**Tablo 1.** İshalleri buzağuların etiyolojik faktörlere bağlı dağılımları

**Table 1.** Distribution of diarrheic calves according to etiological factors

Enteropatojenler	n	%
<i>Criptosporodium</i>	22	19
Rota virus	15	13
<i>E.coli</i>	7	6
Corona virüs	7	6
<i>Giardia</i>	7	6
<i>Criptosporodium- E.coli</i>	13	11
<i>Criptosporodium- Rota virüs</i>	26	22
Sağlıklı	20	17

**Tablo 2.** Enfeksiyon gruplarında etiyolojik ajanlara göre klinik bulguların değerlendirilmesi

**Table 2.** Evaluation of clinical findings according to etiological agents in infection group

GRUPLAR	PARAMETRELER			
	Dehidrasyon (%) $\bar{X} \pm SH$	Beden Isısı (°C) $\bar{X} \pm SH$	Kalp Frekansı (atım/dk) $\bar{X} \pm SH$	Solunum Sayısı (sayı/dk) $\bar{X} \pm SH$
Rotavirus	8.13 ± 0.40	38.07 ± 0.31	109.87 ± 4.04	40.80 ± 2.93
Coronavirus	7.57 ± 0.48	38.46 ± 0.38	106.29 ± 3.96	42.29 ± 5.37
<i>E. coli</i>	8.71 ± 0.78	36.91 ± 0.95	115.86 ± 19.79	37.57 ± 8.21
<i>Cryptosporodium</i>	8.23 ± 0.25	37.87 ± 0.31	108.68 ± 5.30	39.14 ± 2.56
<i>Giardia</i>	7.71 ± 0.42	37.03 ± 0.94	127.43 ± 13.99	34.86 ± 7.69
Rotavirus- <i>Cryptosporodium</i>	8.31 ± 0.29	37.26 ± 0.33	108.9 ± 4.42	39.66 ± 2.17
<i>E.coli-Cryptosporodium</i>	7.92 ± 0.38	38.40 ± 0.38	115.38 ± 9.18	45.23 ± 4.35

**Tablo 3.** Enfekte gruplarda ve sağlıklı grupta hematolojik değerlendirmeler  
**Table 3.** Hematologic evaluations in the infected groups and healthy group

PARAMETRELER	GRUPLAR			P değeri
	Monoenfekte $\bar{X} \pm SH$	Koenfekte $\bar{X} \pm SH$	Sağlıklı $\bar{X} \pm SH$	
WBC ( $10^9/L$ )	17.28 $\pm$ 1.53	21.48 $\pm$ 2.28 <sup>b</sup>	10.01 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>	<b>0.014</b>
NUE ( $10^9/L$ )	8.47 $\pm$ 0.74 <sup>b</sup>	8.11 $\pm$ 0.70 <sup>b</sup>	5.07 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>	<b>0.027</b>
RBC ( $10^{12}/L$ )	8.15 $\pm$ 2.31	8.99 $\pm$ 3.03	6.11 $\pm$ 0.36	0.104
HCT (%)	24.45 $\pm$ 1.36	26.99 $\pm$ 1.30 <sup>b</sup>	20.01 $\pm$ 2.20 <sup>a</sup>	<b>0.004</b>

**Tablo 4.** Enfekte gruplarda ve sağlıklı grupta kan pH' sı ve elektrolit değerlendirmeleri  
**Table 4.** Blood pH and electrolyte evaluation in the infected groups and healthy group

PARAMETRELER	GRUPLAR			P değeri
	Mono-enfekte $\bar{X} \pm SH$	Ko-enfekte $\bar{X} \pm SH$	Sağlıklı $\bar{X} \pm SH$	
pH	7.28 $\pm$ 0.02	7.32 $\pm$ 0.01	7.34 $\pm$ 0.01	0.211
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	132.18 $\pm$ 0.99	131.30 $\pm$ 1.40	134.22 $\pm$ 0.72	0.378
K <sup>+</sup> (mmol/L)	5.1 $\pm$ 0.19	5.19 $\pm$ 0.33	4.79 $\pm$ 0.10	0.590
iCa (mmol/L)	1.17 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	1.17 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	1.27 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.006

**Tablo 5.** Enfeksiyon alt gruplarında ve sağlıklı grupta kan pH' sı ve elektrolit değerlendirmeleri  
**Table 5.** Blood pH and electrolyte evaluations in infectious subgroups and healthy group

GRUPLAR	PARAMETRELER			
	pH $\bar{X} \pm SH$	Na <sup>+</sup> (mmol/L) $\bar{X} \pm SH$	K <sup>+</sup> (mmol/L) $\bar{X} \pm SH$	iCa (mmol/L) $\bar{X} \pm SH$
<i>Rotavirus</i>	7.28 $\pm$ 0.03	130.31 $\pm$ 2.11	4.96 $\pm$ 0.32	1.10 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
<i>Coronavirus</i>	7.33 $\pm$ 0.04	133.14 $\pm$ 3.68	4.96 $\pm$ 0.30	1.11 $\pm$ 0.09
<i>E. coli</i>	7.24 $\pm$ 0.05	132.67 $\pm$ 2.76	6.37 $\pm$ 0.84	1.31 $\pm$ 0.19
<i>Cryptosporidium</i>	7.27 $\pm$ 0.04	132.82 $\pm$ 1.39	4.67 $\pm$ 0.39	1.20 $\pm$ 0.05
<i>Giardia</i>	7.27 $\pm$ 0.05	132.63 $\pm$ 3.09	5.46 $\pm$ 0.50	1.09 $\pm$ 0.08
<i>Rotavirus- Cryptosporidium</i>	7.31 $\pm$ 0.02	130.54 $\pm$ 1.85	5.5 $\pm$ 0.49	1.17 $\pm$ 0.49
<i>E.coli-Cryptosporidium</i>	7.34 $\pm$ 0.02	132.8 $\pm$ 1.9	4.56 $\pm$ 0.13	1.14 $\pm$ 0.04
Sağlıklı	7.34 $\pm$ 0.01	134.22 $\pm$ 0.72	4.79 $\pm$ 0.10	1.27 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
<i>P değeri</i>	0.439	0.814	0.073	<b>0.038</b>

**Tablo 6.** Enfeksiyon gruplarında ve sağlıklı gruplarda Vitamin D ve Fibrinojen düzeyleri  
**Table 6.** Vitamin D and Fibrinogen levels in infection groups and healthy group

PARAMETRELER	GRUPLAR			P değeri
	Mono-enfekte	Ko-enfekte	Sağlıklı	
	$\bar{X} \pm SH$	$\bar{X} \pm SH$	$\bar{X} \pm SH$	
Vitamin D (ng/ml)	39.0 ± 2.33 <sup>b</sup>	36.85 ± 2.10 <sup>b</sup>	65.86 ± 2.81 <sup>a</sup>	0.001
Fibrinojen (mg/dL)	281.17 ± 11.98 <sup>b</sup>	304.45 ± 11.14 <sup>b</sup>	126.37 ± 8.32 <sup>a</sup>	0.001

**Tablo 7.** Enfeksiyon alt gruplarında ve sağlıklı grupta Vitamin D ve Fibrinojen seviyeleri  
**Table 7.** Vitamin D and Fibrinogen levels in infectious subgroups and healthy group

GRUPLAR	PARAMETRELER	
	D vitamini (ng/ml)	Fibrinojen (mg/dL)
	$\bar{X} \pm SH$	$\bar{X} \pm SH$
Rotavirus	34.48 ± 4.77 <sup>b</sup>	306.76 ± 16.08 <sup>b</sup>
Coronavirus	36.40 ± 8.53 <sup>b</sup>	339.85 ± 18.10 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i>	51.70 ± 6.14 <sup>a</sup>	246.09 ± 47.96 <sup>a</sup>
<i>Cryptosporidium</i>	37.36 ± 2.75 <sup>b</sup>	252.29 ± 19.79 <sup>b</sup>
Giardia	43.08 ± 9.00 <sup>a</sup>	293.50 ± 39.98 <sup>b</sup>
Rotavirus- <i>Cryptosporidium</i>	35.70 ± 2.30 <sup>b</sup>	289.07 ± 14.83 <sup>b</sup>
<i>E.coli-Cryptosporidium</i>	39.12 ± 4.39 <sup>b</sup>	335.20 ± 11.97 <sup>b</sup>
Sağlıklı	65.86 ± 2.81 <sup>a</sup>	126.37 ± 8.32 <sup>a</sup>
P değeri	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>

## TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında farklı etiyolojik ajanlara maruz kalarak ishal semptomu gösteren buzağılarda ishalden etkilenme derecesi, yangısal cevabın durumu ve 25 (OH) D<sub>3</sub> seviyelerindeki değişimlerin değerlendirilmesi amaçlandı. Araştırma kapsamında değerlendirilen ishali buzağuların %6'sı *E. coli*, %19'u *Cryptosporidium*, %13'ü Rotavirus, %6'sı Coronavirus, %6'sı Giardia, %11'i *Cryptosporidium* + *E. coli* ve %22'si *Cryptosporidium* + Rotavirus ile enfekte olduğu belirlendi. Lokal ve sistemik enfeksiyon durumları ile karakterize olabilen ishal durumlarında hematolojik parametrelerden total lökosit (WBC) sayılarına ve lökosit diferansiyasyonlarında değişimlere neden olabilmektedir. Özellikle etiyolojik faktörlerinde etkisi altında kalarak gelişen enteritis tablosunun bu değişimleri hematolojik verilere yansıttığı görülmektedir (Taylor 2000, Darabus ve ark. 2009). Araştırma kapsamında değerlendirilen monoenfekte ve koenfekte buzağuların WBC ve NEU sayıları sağlıklı buzağılara göre anlamlı derecede yüksek, enfeksiyon alt gruplarında ise söz konusu değişimlerin Rotavirus ile monoenfekte ve rotavirus+cryptosporidium ile koenfekte buzağılarda

sağlıklı gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi. Söz konusu değişimlerin enfeksiyon alt gruplarında sağlıklı kontrol grubunda bulunan buzağılara göre istatistiksel anlamlı farklılığın bulunmadığı gruplarda enfeksiyonun süresi ve yangısal cevabın derecesi ile ilişkili olabileceği düşünüldü. İshal durumlarında HCT değerinde artış şekillenmekte ve söz konusu artışların ishalden neden olduğu dehidrasyon ve dehidrasyonun şiddetine bağlı değişim gösterebileceği bildirilmektedir (Slanina 1988, Constable ve ark. 1998). Viral ve bakteriyel kökenli ishallerde HCT değerinde belirtilen artışların gelişebileceği ancak paraziter kökenli enteritislerde gelişen anemiye bağlı olarak HCT seviyelerinin normal sınırlar içerisinde de bulunabileceği bildirilmektedir (Hafez 1974). Çalışmada enfeksiyon grubunu oluşturan buzağuların HCT değerlerinin sağlıklı gruba göre HCT değerinde anlamlı derecede artışlar gösterdiği belirlendi (Tablo 3). Enfeksiyon grupları içerisinde bulunan buzağuların klinik değerlendirmelerinde de dehidrasyon derecelerinin %8 seviyelerinde olduğu ve ishale bağlı gelişen dehidrasyondan orta derecede etkilendikleri söylenebilir.

İshalli buzağılarda dehidrasyon ve metabolik asidozis ishali doğurduğu başlıca sonuçlar olarak karşımıza çıkmakta ve HCO<sub>3</sub> kaybı, perfüzyon eksikliğine bağlı olarak dokularda laktik asit birikimi, H<sup>+</sup> iyonlarının böbreklerden atılmasının azalması ve intestinal alanda meydana gelen fermentasyon sonucu oluşan organik asitlere bağlı olarak şekillenmektedir (Bouda ve ark. 1997, Lorenz 2009, Şen ve ark. 2013, Smith 2014). Bu çalışmada değerlendirilen buzağuların araştırmacıların bildirimlerine benzer şekilde pH değişimleri yaşadığı ve bu değişimlerin söz konusu buzağılarda hafif ve orta şiddette bir metabolik asidozis şeklinde olduğu belirlendi. İshal ile birlikte dışkı içerisinden Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> ve K<sup>+</sup> iyonlarının kaybı şekillenmekte ve bu kayıplara bağlı olarak söz konusu iyonların toplam vücut sıvılarındaki düzeyleri azalmaktadır (Constable 2013). Bu çalışma kapsamında değerlendirilen ishalli buzağuların Na ve K seviyelerinin sağlıklı buzağuların ortalamalarına göre istatistiksel anlamlı değişimler göstermediği buna karşın iCa konsantrasyonlarındaki değişimlerin mono ve koenfekte gruplarda sağlıklı gruba göre p<0,05 düzeyinde düşük olduğu belirlendi. Potasyum seviyesinde meydana gelen değişimlerde istatistiksel anlamlı farklılıkların bulunmaması söz konusu buzağuların dehidrasyondan orta derecede etkilenmelerine rağmen metabolik asidozisten aynı düzeyde etkilenmemeleri ile açıklanabilir. Ancak ishal ile birlikte gelişen metabolik asidozisin tamponlanması açısından H<sup>+</sup> iyonlarının hücre içersine taşınıp K<sup>+</sup> iyonlarının hücre dışarısına gönderilmesi ve K<sup>+</sup> iyonlarının renal tübül atılmalarının azalmasına bağlı olarak serumdaki K<sup>+</sup> konsantrasyonları artış eğilimindedir (Constable 2013, Şen ve Constable, 2013). Organizmada K<sup>+</sup> noksanlığı olarak karşımıza çıkan bu durumun metabolik asidozisin derecesine ve süresine bağlı olarak farklı derecelerde artışlar ile karakterize olabileceği, orta şiddette dehidre buzağılarda serum K<sup>+</sup> konsantrasyonlarının 5,36 ± 0,35 mmol/L (Güzelbektaş ve ark, 2007), 4,86 ± 0,22 ve 5,18 ± 0,35 mmol/L (Coşkun ve ark, 2010) ve 5,66 ± 1,43 mmol/L (Öcal ve ark, 2006) seviyelerinde olabileceği bildirilmektedir. Sodyum konsantrasyonlarındaki değişimlerin literatürler ile uyumlu olduğu araştırma kapsamında değerlendirilen buzağuların ishale yakalanma süreleri göz önüne alındığında Na kayıplarının sağlıklı buzağulara göre anlamlı değişimler göstermediği görülmektedir. İshalli buzağılarda süt emme isteksizliği ve literatürlerde bildirildiği gibi (Grove-White ve Mitchell 2001) çalışmada değerlendirilen buzağularında ılımlı düzeyde hipokalsemik oldukları belirlendi.

Çocuklarda ishale neden olan Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, S. typhimurium, Salmonella ve Shigella üzerinde bakterisit etkileri olan anti-mikrobik peptitlerin vitamin D seviyeleri ile ilişkili olarak düzenlediğini bildirilmektedir. (Ouellette ve ark 1994, Welkamp ve ark. 2007, Gudmundsson ve ark. 2010). Söz konusu

etkilerinin yanı sıra bağırsak yüzeyindeki enfeksiyonlara karşı koruma sağlayan ve sızıntılı bağırsak sendromunuda gelişmesini engelleyen gap junksınları güçlendirdiği bilinmektedir (Kong ve ark. 2008, Fujita ve ark. 2008). İnflamatuar bağırsak hastalığı'nda (IBH) kan serumlarındaki 25 (OH) D<sub>3</sub> seviyelerinin normal ya da düşük seyir edebileceği ya da 25 (OH) D<sub>3</sub> seviyelerindeki azalmaların hastalığın bir sonucu olarak da şekillenebileceği yönü ile araştırmalara da ulaşılmaktadır (Aaron ve Andrew 2015). Çalışma kapsamında değerlendirilen monoenfekte ve koenfekte ishalli buzağılarda serum 25 (OH) D<sub>3</sub> seviyelerinin sağlıklı gruba karşın anlamlı derecede (p<0,01) düşük olduğu belirlendi. Monoenfekte grupta bulunan buzağılarda serum 25 (OH) D<sub>3</sub> seviyelerinin 39,0 ± 2,33 ng/ml seviyesinde olduğu, enfeksiyonun daha şiddetli olduğu ko-enfekte grupta ise serum vitamin D<sub>3</sub> seviyelerinin 36,85 ± 2,10 ng/ml seviyelerinde olduğu enfeksiyonun şiddeti arttıkça 25 (OH) D<sub>3</sub> seviyelerinin azalmalarının belirginleştiği görülmektedir. Sağlıklı sığırlarda 25 (OH) D<sub>3</sub> seviyelerinin plazmadaki konsantrasyonlarının 20- 50 ng / ml arasında olması gerektiği bildirilmektedir (Horst ve ark 1994). Bu çalışmada belirlenen sağlıklı sığırlara ait 25 (OH) D<sub>3</sub> seviyelerinin 65,86 ± 2,81 ng/ml seviyelerinde olduğu ve literatürlerde bildirilen değerlere ile karşılaştırıldığında yüksek olduğu belirlendi. Yine mono ve koenfekte gruplarda bulunan buzağuların 25 (OH) D<sub>3</sub> seviyelerinin araştırmanın kontrol grubu değerlerine göre düşük olmasına rağmen literatür verileri ile karşılaştırıldığında referans aralıklar içerisinde bulunduğu belirlendi. Bu durumun ishal gelişen buzağuların beslenmesinde kullanılan konsantre yemler içerisinde bulunan 25 (OH) D<sub>3</sub> seviyeleri ile ilişkili olduğu düşünülmekte ve sağlıklı referans aralıkların belirlenmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunun göstergesi olarak açıklanabilir.

Hastalıkların erken dönemde teşhisi kapsamında hastalık biyobelirteçlerinin değerlendirilmesi ve değişimlerin doğru yorumlanması gerekmektedir. Bu kapsamda akut faz yanıtta meydana gelen değişimlerin değerlendirilmesi beşeri hekimlikte olduğu kadar veteriner hekimliğinde de kullanım alanı bulmaktadır. Dokularda meydana gelen enfeksiyon, doku zedelenmesi, neoplastik oluşumlar ve immünolojik değişimlere bağlı olarak akut faz yanıt gelişmekte ve başta karaciğer olmak üzere birçok doku tarafından sentezlenen proteinlerin seviyelerinde artışlar ve azalmalar ile karakterize durumlar ortaya çıkmaktadır (Pfeffer ve ark. 1993, Petersen ve ark. 2004). Fibrinojen seviyelerinin hayvanlarda enfeksiyöz durumların birçoğunda artış eğiliminde bulunduğu (McSherry ve Horney 1970) özellikle ruminantlarda uzun yıllardan beri enflamasyon düzeylerinin belirlenmesinde kullanıldığı bildirilmektedir (Eckersall ve Conner 1988). Bu çalışma kapsamında değerlendirilen buzağuların fibrinojen

konsantrasyonlarının enfeksiyon gruplarında sağlıklı buzağılara kıyasla  $p < 0,01$  düzeyinde yüksek olduğu belirlendi (Tablo 6). Söz konusu değişimlerin literatürlerde bildirilen artışlara paralellik gösterdiği ve değişimlerdeki farklılıkların enfeksiyonun şiddeti ve süresine bağlı olarak değişim gösterebileceği düşünüldü. Beşeri hekimlik alanında yapılan araştırmalarda enflamasyon biyobelirteçleri ve 25 (OH) D<sub>3</sub> seviyeleri arasında önemli ilişkilerin bulunduğu ve söz konusu ilişkinin özellikle kardiyometabolik hastalıklar açısından önem arz ettiği bir çok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Hypponen ve ark. 2001, Lappe ve ark. 2007, Reis ve ark. 2009). Araştırmamız kapsamında ruminantlar için pozitif akut faz proteini olan fibrinojen konsantrasyonlarındaki artışlar ile 25 (OH) D<sub>3</sub> konsantrasyonundaki azalmalar arasında negatif yönlü bir korelasyonun bulunduğu ( $r = -0,403$ ) ve bu değişimlerin  $p < 0,05$  seviyesinde anlamlı olduğu belirlendi. Beşeri hekimlikte yapılan araştırmalar göz önüne alındığında ruminantlar için pozitif bir akut faz biyobelirteci olan fibrinojen seviyelerinin insanlardakine benzer şekilde 25 (OH) D<sub>3</sub> konsantrasyonlarında azalmalar ile karakterize olduğu görülmektedir. Araştırmamız kapsamında sağlıklı buzağuların 25 (OH) D<sub>3</sub> konsantrasyonlarının mono-enfekte ve ko-enfekte ishelli buzağularda anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi. Bu durum 25 (OH) D<sub>3</sub>'nin akut yangısal durumlarda azaldığını gösteren diğer araştırmalar (Reid ve ark 2011) ile paralellik göstermektedir.

Yapılan incelemelerde ishelli buzağularda akut hastalık bulgularına paralel olarak mono ve ko enfeksiyon gruplarında vitamin D konsantrasyonlarının anlamlı derecede azaldığı ve 25 (OH) D<sub>3</sub> seviyelerinin ishal bulgusu gösteren buzağularda negatif akut faz biyobelirteci olarak kullanılabilirliği sonucuna ulaşıldı.

## TEŞEKKÜR

*Bu çalışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Ofisi (ADU-BAP) tarafından VTF-18023 proje numarası ile desteklenmiştir.*

*Bu çalışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda "Neonatal İshelli Buzağularda 25 (OH) D<sub>3</sub> Konsantrasyonlarının Araştırılması" başlığı ile tamamlanan Yüksek Lisans Tezinin bir bölümünden özetlenmiştir.*

*Bu çalışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunca 64583101/2018/052 numaralı izin dahilinde gerçekleştirilmiştir.*

## KAYNAKLAR

Aaron S, Bancil- Andrew P. The Role of Vitamin D in Inflammatory Bowel Disease. *Healthcare*, 2015;3:338-350.

- Bouda J, Doubek J, Medina-Cruz M, Paasch ML, Candanosa AE, Dvořák R, Soška V. Pathophysiology of severe diarrhoea and suggested intravenous fluid therapy in calves of different ages under field conditions. *Acta Veterinaria Brno*, 1997;66(2):87-90.
- Conner J, Eckersall P, Wiseman A, Aitchison T, Douglas T. Bovine acute phase response following turpentine injection. *Research in Veterinary Science*, 1988, 44, 82-88
- Constable P. Hyperkalemia in diarrheic calves: Implications for diagnosis and treatment. *The Veterinary Journal*, 2013;195:271-272.
- Constable PD, Walker PG, Morin DE, Foreman JH. Clinical and laboratory assessment of hydration status of neonatal calves with diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1998;212:991-996.
- Coskun A, Sen I, Guzelbektes H, Ok M, Turgut K, Canikli S. Comparasion of the effects
- Dărăbuș G, Oprescu I, Morariu S, Mederle N, Imre K, Imre M, Brudiu I. The study of some haemathological parameters in infection with *Cryptosporidium* spp. and other enteropathogens in calves. *Lucrari Stiintifice-Universitatea de Stiinte Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara*, 2009;42(1):5-15.
- Eckersall P, Conner J. Bovine and canine acute phase proteins. *Vet Res Commun*, 1988;12:169-178.
- Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, Yamamoto Y, Wada T, Kojima T, Yokozaki H, Yamashita T, Kato S, Sawada N, Chiba H. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca<sup>2+</sup> absorption between enterocytes. *Molecular Biology of the Cell*, 2008;19:1912-1921.
- Grove-White DH, Michell AR. Comparison of the measurement of total carbon dioxide and strong ion difference for the evaluation of metabolic acidosis in diarrhoeic calves. *Veterinary Record*, 2001;148:365-370.
- Gudmundsson GH, Bergman P, Andersson J, Raqib R, Agerberth B. Battle and balance at mucosal surfaces--the story of Shigella and antimicrobial peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010;396:116-119
- Güzelbekteş H, Coşkun A, Sen I. Relationship between the degree of dehydration and the balance of acid-based changes in dehydrated calves with diarrhoea. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2007, 51, 83-87.
- Hafez AM. Untersuchungen zum Verhalten einiger Elektrolyte in Pansensaft, Blutsrum und Harn sowie des roten und weissen Blutbildes bei gesunden und enteritiskranken Rindern im Hinblick auf therapeutische Schlussfolgerungen. *Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule, Hannover, Deutschland*, 1974.
- Haque UJ, Bathon JM, Giles JT. Association of vitamin D with cardiometabolic risk factors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2012;64(10):1497-1504.
- Hirvonen J, Pyorala S. Acute-phase response in dairy cows with surgically treated abdominal disorders. *Veterinary Journal*, 1998, 155, 53-61.
- Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA. Adapting to the transition between gestation and lactation: Differences between rat, human and dairy cow. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2005;10:141-156.
- Hypponen E, Laara E, Reunanen A, et al. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet*, 2001;358(9292):1500-1503.
- Jorgensen SP, Agnholt J, Glerup H, et al. Clinical trial: vitamin D3 treatment in Crohn's disease - a randomized double-

blind placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther*, 2010; 32(3):377-383.

**Klein D, Kern A, Lapan G, Benetka V, Möstl K, Hassl A, Baumgartner W.** Evaluation of Rapid Assays for the Detection of Bovine Coronavirus, Rotavirus A and *Cryptosporidium parvum* in Faecal Samples of Calves. *Vet J*, 2009;182:484-486

**Kong J, Zhang Z, Musch MW, Sun J, Hart J, Bissonnette M, Li YC.** Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier. *American Physiological Society-Gastrointest and Liver Physiology*. 2008;294:208-216.

**Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP.** Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2007; 85(6):1586-1591

**Lorenz I.** D-Lactic acidosis in calves. *Veterinary Journal*, 2009;179(2):197-203.

**McSherry B, Horney F.** Plasma fibrinogen levels in normal and sick cows. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 1970, 34, s-191-7

**Ok M, Güler L, Turgut K, Ok U, Sen I, Gündüz IK, Birdane MF, Güzelbekteş H.** The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *Zoonoses Public Health*, 2009;56(2):94-101.

**Ouellette AJ, Hsieh MM, Nosek MT, Cano-Gauci DF, Huttner KM, Buick RN, Selsted ME.** Mouse Paneth cell defensins: primary structures and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms. *Infection and Immunity*. 1994;62:5040-5047.

**Öcal N, Duru SY, Yağcı BB, Gazyağcı S.** İshalli buzağılarda asit-baz dengesi bozukluklarının saha şartlarında tanı ve sağaltımı. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2006, 12(2),175-183.

**Pfeffer A, Rogers K, O'keeffe L, Osborn P.** Acute phase protein response, food intake, liveweight change and lesions following intrathoracic injection of yeast in sheep. *Research in Veterinary Science*, 1993;55:360-366.

**Reid D, Toole BJ, Knox S, Dinesh T, Johann H, Denis St JO, Scott B, John K, McMillan CD, Wallace AM.** The relation between acute changes in the systemic inflammatory response and plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations after elective knee arthroplasty. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2011;93:1006-1011.

**Reis JP, Von Muhlen D, Miller ER, Michos ED, Appel LJ.** Vitamin D status and cardiometabolic risk factors in the United States adolescent population. *Pediatrics*, 2009; 124(3):371-379.

**Shamsir Ahmet AM.** Association of Vitamin D status with acute respiratory infection and diarrhoea in children less than two years of age in an urban slum of Bangladesh. PhD Thesis, School of Public Health, The University of Queensland, 2016

**Slanina L, Rossow N, Horvath Z, Fischer G.** Innere Krankheiten der Haustiere. Bd II: Funktionelle Störungen, Stoffwechselüberwachung in Kaelbernbestaende, 1988;536- 544.

**Smith GW, Berchtold J.** Fluid therapy in calves. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 2014;30(2):409-427.

**Şen İ, Constable PD.** General overview to treatment of strong ion (metabolic) acidosis in neonatal calves with diarrhea. *Eurasian Journal of Veterinary Science*, 2013, 29(3), s-14-120.

**Şen İ, Güzelbekteş H, Yıldız R.** Neonatal buzağı ishalleri: Patofizyoloji, epidemiyoloji, klinik, tedavi ve koruma. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Science*, 2013;4(1);71-78.

**Taylor JA.** Leukocyte Responses in Ruminants. In, Bernart FF, Joseph GZ, Nemi CJ (Eds): *Schalm's Veterinary Hematology*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2000;5:391-401.

**Wehkamp J, Schaubert J, Stange EF.** Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Current opinion in gastroenterology*, 2007;23:32-38.

## Determination of Risk Factors Associated with Subclinical Mastitis as Detected by California Mastitis Test in Smallholder Dairy Farms in Afyonkarahisar

Erhan ÖZENÇ\*

*Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynaecology, Afyonkarahisar - Turkey*

### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the incidence of subclinical mastitis and risk factors causing subclinical mastitis in smallholder dairy farms in Afyonkarahisar. California Mastitis Test was applied to 757 quarters belonging to 202 lactating cows. Seventy-four percent of the cows and 41% of the quarters were subclinically infected. Quarters from cows in smallholder dairy farms with 10 or fewer animals in the herd and quarters from cows in the later stage of lactation (>180 days in milk (DIM)) were more likely to have subclinical mastitis ( $p<0.05$ ). Although the effect of age was statistically significant ( $p<0.05$ ) on the incidence of subclinical mastitis, breed factor, milking method, teat-dipping after milking and localization of mammary quarters were not statistically significant. It was found that the quarters in cows older than 8 years had a 3.02 times higher risk of infection than the quarters in cows in the 2-5 age group. The risk of infection in flocks with a herd size of 10 or less was found to be about 1.75 times higher than flocks with a herd size greater than 10. In conclusion, it was determined that the incidence of subclinical mastitis was high in smallholder dairy farms in Afyonkarahisar and mastitis control programs should be applied to decrease this rate.

**Keywords:** California Mastitis Test, Dairy Cows, Risk Factors, Smallholder Dairy Farms, Subclinical Mastitis

\*\*\*

### Afyonkarahisar'da Aile Tipi İşletmelerde California Mastitis Test ile Saptanan Subklinik Mastitis Olguları ile İlişkili Risk Faktörlerinin Belirlenmesi

#### ÖZ

Sunulan çalışmada, Afyonkarahisar'da bulunan aile tipi işletmelerde subklinik mastitis insidensinin belirlenmesi ve subklinik mastitise neden olan risk faktörlerinin belirlenmesi amaçlandı. Laktasyondaki 202 ineğin 757 meme lobuna California Mastitis Testi yapıldı. İneklerin %74'ü ve meme loblarının %41'inde subklinik mastitis belirlendi. Sürüde 10 ve daha az hayvan bulunan ve laktasyonun son döneminde olan (>180 gün) ineklerin meme loblarında subklinik mastitis gözlenme oranının daha yüksek olduğu saptandı ( $p<0,05$ ). İneklerde yaşın subklinik mastitisin görülme insidensini istatistiksel olarak önemli oranda arttırdığı ( $p<0,05$ ) belirlenmesine rağmen ineklerin ırk farklılıklarının, sağım yöntemlerinin, sağım sonrası teat-dipping uygulamalarının ve meme lokalizasyonlarının bu insidensi etkilemediği tespit edildi. Sekiz yaşından daha büyük ineklerin meme loblarının 2-5 yaş grubundaki ineklerin meme loblarına göre yaklaşık 3,02 kat daha fazla enfeksiyon riskine sahip oldukları saptandı. Ayrıca sürü büyüklüğü 10 ve altında olan sürülerde 10'un üstünde olan sürülere göre enfeksiyon riskinin yaklaşık 1,75 kat daha yüksek olduğu tespit edildi. Sonuç olarak, Afyonkarahisar'daki aile tipi işletmelerde subklinik mastitis insidensinin yüksek olduğu ve bu oranı azaltmak için mastitis kontrol programlarının uygulanmasının gerektiği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** California Mastitis Test, Sütçü İnek, Risk Faktörleri, Aile Tipi İşletmeler, Subklinik Mastitis

*To cite this article: Özenç E. Determination of Risk Factors Associated with Subclinical Mastitis as Detected by California Mastitis Test in Smallholder Dairy Farms in Afyonkarahisar. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):277-283.*

Submission: 19.06.2019

Accepted: 22.07.2019

Published Online: 24.08.2019

ORCID ID; EÖ: 0000-0002-9179-8796

\*Corresponding author e-mail: erhanankara@hotmail.com



## GİRİŞ

Meme bezinin yangısına mastitis denilmektedir (Schalm ve ark. 1971). Mastitis olguları insan, hayvan, çevre, mikroorganizmalar ve yönetim faktörlerinin etkileşmelerinin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Philpot ve Nickerson 1991). Mastitis olguları genel olarak patojen özellik gösteren bakterilerin meme başı kanalından içeriye girerek memeye penetre olmaları ile başlamaktadır (Schalm ve ark. 1971, Philpot ve Nickerson 1991). Enfeksiyon klinik veya subklinik olarak karşımıza çıkabilmektedir. Klinik mastitis olgularında meme dokusunda veya sütte gözle görülebilen anormallikler saptanabilir. Subklinik mastitis olgularında ise memede ve sütte görsel olarak herhangi bir bulguya rastlanılmaz iken memede yangının varlığı veya enfeksiyona neden olan mikroorganizmaların varlığı sütte somatik hücre sayımı ile belirlenebilmektedir. Hastalığın subklinik formu diğer formlara göre daha fazla önem arz etmektedir. Subklinik mastitis prevalansı klinik forma göre 15-40 kez daha fazla ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca süt verimini ve kalitesini düşürmesinin yanında uzun süre devam etmesi, teşhisinin zor olması da çok önemli özellikleri arasındadır. Ayrıca subklinik formlu hayvanlar sürü içerisindeki diğer hayvanlar için bir hastalık rezervuarı olarak görülmektedir (Philpot ve Nickerson 1991, Yigit ve ark. 2018). Subklinik mastitislerin ortaya çıkartılmasında indirek teşhis metodları kullanılmalıdır. Sütte somatik hücre sayısının belirlenmesinde ve hemen hayvanın yanında uygulanan bir test metodu da California Mastitis Test (CMT)'dir. CMT sütteki somatik hücrelerin sayısı ile ilişkilidir ve mastitis olgularında pozitif sonuç verir (Schalm ve ark. 1971, Özenç ve ark. 2018). Günümüzde sütteki somatik hücre sayısını otomatik olarak sayımını yapan cihazlar geliştirilmiş olmasına rağmen CMT hala yaygın olarak kullanılmaktadır (Philpot ve Nickerson 1991).

Birleşmiş milletlerin gıda ve tarım organizasyonu (FAO) bu yıl ile beraber önümüzdeki 10 yılı (2019-2028) aile çiftçiliği yılı olarak ilan etmiştir (FAO 2019). Aile tipi işletmelerde gelir kaynaklarından birisi olarak görülen sütün kaliteli olarak üretilmesi gerekmektedir. Son yıllarda dünyada küçük ölçekli işletmelerde mastitis taramaları ve buna neden olan faktörlerin araştırılmasına yönelik araştırmalar önem kazanmaya başlamıştır (Costa ve ark. 2013, Östensson ve ark. 2013, Tolosa ve ark. 2013). Güney Afrika ülkesi olan Zimbabve'de küçük ölçekli işletmelerde klinik ve subklinik mastitis oranları sırasıyla %4,8 ve %16,3 olarak bulunmuştur (Katsande ve ark. 2013). Güney Vietnam'da yapılan başka bir çalışmada ise aile tipi işletmelerde subklinik mastitis prevalansının hayvan ve meme lobu bazında sırasıyla %88,6 ve %63,2 olduğu belirlenmiştir (Östensson ve ark. 2013). Etiyopya'da ise küçük ölçekli işletmelerde subklinik mastitis oranının inek ve meme lobu bazında sırasıyla

%62 ve %51 olduğu tespit edilmiştir (Tolosa ve ark. 2013).

Ülkemizde ise aile tipi işletmelerde gözlemlenen mastitis olguları konusunda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Ergün ve ark. 2004, Macun ve ark. 2011, Özdemir ve Kaymaz 2013, Özenç ve ark. 2019). Yapılan bazı çalışmalarda aile tipi işletmelerde gözlemlenen subklinik mastitis olgularının oldukça yüksek olduğu saptanmıştır (Macun ve ark. 2011, Özdemir ve Kaymaz 2013). Sivas bölgesinde subklinik mastitis oranı %60,17 olarak saptanırken (Özdemir ve Kaymaz 2013), Kırıkkale bölgesinde %54,37 olarak tespit edilmiştir (Macun ve ark. 2011). Sunulan çalışmada, Afyonkarahisar ilinde yoğun olarak yetiştiriciliğin yapıldığı aile tipi işletmelerdeki mastitis oranları ve buna neden olan faktörlerin araştırılması amaçlandı.

## MATERYAL ve METOT

### Hayvanların seçimi

Bu çalışma, Afyonkarahisar ili merkez köy ve kasabalarında (Küçükçobanlar, Erenler, Akçın, Fethibey, Balmahmut ve Düzağaç) bulunan toplam 40 adet özel aile tipi işletmede, değişik ırk (Holştayn, Simental, İsviçre Esmeri ve Yerli Kara) ve farklı laktasyon dönemlerindeki 202 inek üzerinde yapıldı. Aile tipi işletmelerde bulunan hayvanlar sert kış şartlarında bağlı ahırlarda, bahar ve yaz aylarında ise açık padoklarda veya meralarda serbest olarak dolaşıyorlardı. İneklere yaz aylarında meraya dayalı besleme, kepek, arpa ezmesi, şeker pancası posası, kuru ot ve saman karışımına dayalı besleme uygulanıyordu. Kış aylarında ise bunlara ilave olarak yeme silaj ilave ediliyordu. Aile tipi işletmelerdeki inekler işletmenin işleyişine göre günde iki veya üç sefer makine ya da elle sağılmaktaydılar. İşletmelerin tamamında meme başları sağım öncesi ılık su ile yıkanıyordu. İşletmelerin tümünde sağım öncesi teat-dipping uygulaması yapılmazken bazı işletmelerde sağım sonrası teat-dipping uygulaması yapılıyordu.

### Verilerin toplanması

Çiftliklere uygulanan ziyaretler esnasında subklinik mastitise neden olan risk faktörlerinin verileri hem gözlem hem de sağımcular ve hayvan sahipleri ile görüşülerek toplandı. Elde edilen veriler hayvanların sürü büyüklüklerine, ırklarına, yaşlarına, laktasyon dönemlerine, sağım şekillerine, teat-dipping uygulamalarına ve meme loblarının yerlerine göre sınıflandırıldı. Hayvanların ait oldukları sürülerin büyüklükleri (inekler, düveler, boğalar ve buzağalar dahil olmak üzere  $\leq 10$  hayvan ve  $> 10$  hayvan) 2 grup altında incelendi (Tolosa ve ark. 2013). Çalışmaya alınan inekler ırklarına göre (Holştayn ve melezi, Simental ve melezi, İsviçre esmeri ve melezi ile Yerli kara) 4 grupta; yaşlarına (2-5 yaş, 6-8 yaş ve  $\geq 9$  yaş) ve laktasyon dönemlerine göre ( $< 90$  gün, 90-180 gün ve  $> 180$  gün) 3 grupta (Özdemir ve Kaymaz 2013,

Tolosa ve ark. 2013); sağım şekilleri (elle ve makineli sağım) ve sağım sonrası teat-dipping uygulamalarına göre ise (teat-dipping uygulananlar ve uygulanmayanlar) 2 grupta incelendi. Meme lobu bazında her bir meme lobu (sağ ön, sol ön, sağ arka ve sol arka) 4 ayrı kategoride değerlendirildi.

### **Klinik ve subklinik mastitis varlığının belirlenmesi**

İlk olarak meme loblarında herhangi bir klinik mastitis varlığı (memede kızarıklık, ödem, ağrı, sertlik ve sütte flakon varlığı) araştırıldı. Daha sonra ineklerinden CMT testinin yapılması amacıyla süt örneği alındı ve test yapıldı. CMT skorları negatif (-), Ş (şüpheli), +1, +2 ve +3 olarak yorumlandı (Schalm ve ark. 1971). CMT skoru Ş, +1, +2 ve +3 olarak belirlenen meme lobları subklinik mastitisli olarak, CMT skoru (-) olan meme lobları ise enfekte olmamış olarak değerlendirildi. En az bir meme lobunda subklinik mastitis saptananlar ise subklinik mastitisli inek olarak kabul edildi (Tolosa ve ark. 2013).

### **İstatistiksel analiz**

Kategorik değişkenlerin analizinde ki-kare testi, enfeksiyon durumunu (0, enfekte olmayan 1, enfekte olanlar) etkileyen risk faktörlerinin belirlenmesinde lojistik regresyon analizi kullanıldı. İstatistiksel analizler için SPSS 20,0 istatistik paket programından yararlanıldı.  $p < 0,05$  istatistiksel anlamlılık olarak kabul edildi.

## **BULGULAR**

Sunulan çalışmada laktasyon dönemi içerisindeki 202 baş inekteki toplam 808 meme lobunun tamamı fonksiyonel değildi. Bu meme başlarından 31'i kör olduğundan dolayı (25 ineğin 1 ve 3 ineğin 2 meme lobu kördü) süt örnekleri alınamadı. Süt örneklerinin alındığı zamanda 16 ineğe ait 20 meme lobunda klinik mastitis olgusu tespit edildi. Geriye kalan 757 meme lobundan 311'inde (%41,08) subklinik mastitis belirlendi. Yüz kırk dokuz (%73,76) hayvanda subklinik mastitis tespit edildi.

Meme lobu düzeyinde subklinik mastitisler değerlendirildiğinde, yaş gruplarının artışıyla birlikte mastitis olgularının da istatistiksel olarak önemli düzeyde yükseldiği gözlemlendi ( $p=0,001$ ). Laktasyon dönemlerine göre değerlendirildiğinde, laktasyonun 180. gününden sonra subklinik mastitis insidensinin laktasyonun ilk 90. gününden önce ve 90-180. gün aralıklarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gösterdiği belirlendi ( $p=0,006$ ). Sürü büyüklüğü dikkate alındığında ise 10 ve daha az sayıda hayvan bulunan işletmelerde subklinik mastitis olgularının istatistiksel olarak daha yüksek oranda gözlemlendiği tespit edildi ( $p=0,001$ ). Hayvanların ırkları, sağım şekilleri, teat-dipping uygulamaları ve meme loblarının yerleri ile subklinik mastitis olgularının görülmesi arasında önemli bir ilişki belirlenemedi (Tablo 1).

Subklinik mastitisin oluşmasında yaş, laktasyon dönemi ve sürü büyüklüğünün enfeksiyonu etkileyen bir risk faktörü olduğu belirlendi. 6-8 yaş grubunda olan ineklerin meme loblarının 2-5 yaş grubuna göre 1,65 kat daha fazla, 8 yaşından daha büyük ineklerin meme loblarının ise 2-5 yaş grubundaki ineklerin meme loblarına göre yaklaşık 3,02 kat daha fazla enfeksiyon riskine sahip oldukları saptandı. Ayrıca sürü büyüklüğü 10 ve altında olan sürülerde 10'un üstünde olan sürülere göre enfeksiyon riskinin yaklaşık 1,75 kat daha yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 2).

## **TARTIŞMA**

Çalışmada Afyonkarahisar ilinde bulunan aile tipi işletmelerde CMT uygulanarak subklinik mastitis prevalanslarının belirlenmesi ve mastitise neden olan risk faktörlerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Bölgesel olarak yapılan benzer çalışmalarda, CMT ile meme lobu ve hayvan bazında belirlenen subklinik mastitis oranlarının sırasıyla %14,11-60,17 ve %51,28-74,50 arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir (Alaçam ve ark. 1986, Ergün ve ark. 2004, Mdegela ve ark. 2004, Macun ve ark. 2011, Özdemir ve Kaymaz 2013, Tolosa ve ark. 2013, Koçyiğit ve ark. 2016). Sunulan çalışmada, meme lobu bazında belirtilen çalışmalara benzer bir değer (%41,08) saptanmasına rağmen hayvan bazında bu çalışmaların üst sınırına yakın bir subklinik mastitis insidensi (%73,76) belirlenmiştir. Yukarıda belirtilen çalışmalardan Tolosa ve ark.'nın (2013) yaptığı çalışmada, subklinik mastitis için belirlenen başlangıç değeri  $CMT \geq \text{Ş}$  olarak alınırken diğer çalışmalarda bu başlangıç değeri  $CMT \geq 1$  olarak belirlenmiştir. Bu nedenle sunulan çalışmada CMT skoru Ş olan meme lobları da subklinik mastitisli olarak değerlendirilmiş ve hayvan bazında daha yüksek bir subklinik mastitis insidens yüzdesi (%61,93) tespit edilmiştir. Yaygın olarak mastitis problemi bulunan ve mastitis kontrol programı uygulanmayan Tanzanya'da ise hayvan bazında subklinik mastitis insidensinin Afyonkarahisar iline benzer olarak ortalama 74,50 (Kibaha bölgesinde insidensin %82,40'a kadar çıktığı bildirilmiştir) olması (Mdegela ve ark. 2004) benzer şartların burada da geçerli olduğunu düşündürmektedir. Bunun nedeninin aile tipi işletmelerdeki kişilerin subklinik mastitis ile ilgili yeterli bilgiye sahip olmamaları sonucu sağım hijyenine dikkat etmemelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda sağım hijyeni eksikliği, hatalı ve gelişigüzel antibiyotik kullanımının önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Şeker ve Özenç 2011). Bununla birlikte sağım makinelerinin bakımlarının düzenli olarak yapılmaması ve makinelerin hatalı kullanılmasının da önemli faktörler arasında yerini alması muhtemel olarak görülmektedir. Bu nedenle bölgede sağım hijyeni ve mastitis kontrol programları ile ilgili halk eğitimlerinin yapılması büyük önem arz etmektedir.

Aile tipi işletmelerde, CMT ile subklinik mastitis taraması yapılan bir çalışmada, meme lobu bazında klinik mastitis ve kör meme lobu insidenslerinin sırasıyla %3,69 ve %6,11 olduğu bildirilmiştir (Tolosa ve ark. 2013). Özdemir ve Kaymaz (2013) tarafından aile tipi işletmelerde CMT ile subklinik mastitis taramasının yapıldığı başka bir çalışmada ise kör meme lobu insidensinin %4,84 olduğu tespit edilmiştir. Sunulan çalışmada da diğer çalışmalara göre daha düşük oranda klinik mastitisli (%2,48) ve kör (%3,84) meme lobu insidensinin belirlenmesinin sebebinin Afyonkarahisar ilinde fazla sayıda mezhaba bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Afyonkarahisar ili önemli bir yetiştiricilik alanıdır ve burada elde edilen ürünlerle Türkiye'nin önemli bir tüketim açığı kapatılmaktadır (Seker ve ark. 2015). Hayvan sahipleri damızlık değeri ve/veya süt verimi düşük olan hayvanlarda klinik mastitis veya memelerin körelmesi gibi olguları kolayca saptadıkları için bu hayvanları rahatlıkla mezbahaya sevk etmekte ve ekonomik kayıplarını en aza indirmek istemektedirler. Böylece süt verimi düşen bu hayvanlar mezbahada et verimleri için değerlendirilmektedir.

Tolosa ve ark. (2013) ineklere CMT uygulayarak subklinik mastitis taraması yaptıkları bir çalışmada, 4 yaş üzerindeki ve ileri laktasyon dönemlerinde hayvanlarda mastitis görülme insidensinin istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise laktasyon sayısı ve dönemi arttıkça CMT pozitif meme lobu sayılarının da önemli düzeyde artış gösterdiği saptanmıştır (Çoban ve Tüzemen 2007). Bu çalışmalardan farklı olarak Koçyiğit ve ark. (2016) yaş ve laktasyon dönemi ile subklinik mastitis arasında bir ilişkinin olmadığını saptamışlardır. Yine Rişvanlı ve Kalkan (2002) yaş ile CMT sonuçları arasında bir ilişkinin olmadığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da Çoban ve Tüzemen (2007) ve Tolosa ve ark. (2013)'na benzer şekilde yaş artışına bağlı olarak ve özellikle laktasyonun 180. gününü geçen hayvanlarda subklinik mastitis insidensinin artış gösterdiği tespit edilmiştir. İneklerde yaş artışına bağlı olarak meme sfinkterlerinde gevşeme ve duktus papillarisin özelliğini yitirmesine bağlı olarak mastitis vakaları ile daha sık karşılaşılacağı bilinmektedir (Vural ve ark. 2016). Bununla birlikte iyi idare edilen sürülerde doğumdan sonraki 5-6. haftadan sonra mastitis insidensinin düşmesi gerektiği bildirilmektedir (Vural ve ark. 2016). Sunulan çalışmada ise 25. haftadan sonra subklinik mastitis olgularında ani bir artış gözlenmiştir. Bu durumun mastitis kontrol programlarının uygulanmadığı sürülerin iyi idare edilmemesinden (Küplülü ve Vural 2016) ve/veya kuruya çıkartılması gereken hayvanların sağımının devam ettirilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

CMT (+) ve sütlerinde mikrobiyolojik üreme olan İsviçre esmeri ırkı ineklerin meme loblarındaki somatik hücre sayılarının Holştayn, Yerli ve melez ırklara göre önemli düzeyde yüksek olduğu saptanmıştır (Rişvanlı ve Kalkan 2002). Yapılan diğer bir çalışmada ise Holştayn ırkı ineklerde meme lobu düzeyinde CMT pozitif sonuçlarının daha fazla olduğu saptanmıştır (Rişvanlı 2000). Yine buna benzer olarak, Holştayn ırkı hayvanlarda Esmer ırka göre CMT pozitiflik risk faktörünün önemli düzeyde yüksek olduğu bildirilmektedir (Çoban ve Tüzemen 2007). Bunlardan farklı olarak; Holştayn, Esmer ve Simental ırklarının CMT pozitiflik ile bir ilişkilerinin olmadığını (Koçyiğit ve ark. 2016) ve Holştayn ve Esmer ırkları arasında CMT skorları bakımından bir farklılığın olmadığını (Sabuncuoğlu ve ark. 2003) bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Afyonkarahisar bölgesinde yetiştiriciliği yapılan sığır ırkları çeşitlilik göstermektedir. Sunulan çalışmada da Afyonkarahisar bölgesinde ineklerdeki ırk faktörünün subklinik mastitis ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir.

Sürü büyüklüğü ile subklinik mastitis arasında ilişkinin araştırıldığı fazla çalışma bulunmamaktadır. Tolosa ve ark. (2013) sürü büyüklüğünün subklinik mastitis ile herhangi bir ilişkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılardan farklı olarak bu çalışmada ise 10 ve daha az sayıda hayvan bulunan işletmelerde subklinik mastitis insidensinin önemli düzeyde yüksek olduğu saptandı. Afyonkarahisar ilindeki büyük aile tipi işletmeler genellikle süt ve süt ürünlerini pazarladıkları için hayvanların meme sağlığına daha fazla önem vermektedirler. Bu işletmeler meme sağlığı kontrol programlarından bazılarını uygulamaktadırlar. Küçük aile tipi işletmelerde ise genellikle bu kontrol programları uygulanmamakta ve sağım gelişi güzel yapılmaktadır. Bu nedenle küçük aile tipi işletmelerde subklinik mastitis olguları ile daha fazla karşılaşıldığı düşünülmektedir.

İsviçre esmeri üzerinde yapılan bir çalışmada CMT skorları ile meme loblarının dağılımları arasında bir ilişki belirlenmemiştir (Şeker ve ark. 2000). Benzer şekilde Holştayn, İsviçre esmeri ve Simental ırkı ineklerde de CMT skoru ile meme loblarının lokalizasyonu arasında bir fark tespit edilememiştir (Koçyiğit ve ark. 2016). Sunulan çalışmada da meme lobu yerleşim yeri ile subklinik mastitis arasında bir ilişki saptanamadı.

Sağım sonrası meme başı teat-dipping uygulamaları dünyada birçok işletmede yaygın olarak kullanılmaktadır. Avustralya'da yapılan bir çalışmada, somatik hücre sayısı yüksek olan 62 işletmenin 58'inde (%94) sağım sonrası teat-dipping işleminin uygulandığı belirtilirken somatik hücre sayısı düşük olan 52 işletmenin 49'unda (%95) sağım sonrası teat-dipping işleminin uygulanmadığı tespit edilmiştir (Plozza ve ark. 2011). Sunulan çalışmada da benzer olarak teat-dipping uygulamasının subklinik mastitisin

oluşması üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı saptandı.

Sağımın elle veya makine ile yapılması da subklinik mastitis şekillenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Türkiye'de sağım makinelerindeki hataların ve/veya hatalı kullanımların CMT skorlarını arttırdığı belirtilmektedir. Sağım makinelerindeki hataların düzeltilmesi ile CMT skorlarının da bir miktar düşebileceği gösterilmiştir (Köker ve Salmanoğlu 2000, Köker ve Özenç 2005, Özenç ve ark. 2008). Avrupa'da yapılan bir çalışmada ise otomatik sağım

sistemlerinin meme sağlığı üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı fakat laktasyon dönemi 300. günü geçen ineklerde kontrol önlemlerinin alınması gerektiği bildirilmektedir (Zecconi ve ark. 2003). Sunulan çalışmada elle sağım ile makineli sağım arasında CMT skoru bakımından farklılık bulunamamıştır. Bu durum Türkiye'de yapılan diğer çalışmalardan farklılık göstermektedir. Bunun nedeninin çalışmada elle sağım yapılan işletmelerden elde edilen verilerin oldukça az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

**Tablo 1.** İneklerde meme lobu düzeyinde bazı risk faktörlerin subklinik mastitis insidensi üzerine etkileri

**Table 1.** Effects of some risk factors on the incidence of subclinical mastitis at the quarter level in lactating dairy cows

Risk faktörleri	İnek sayısı	İncelenen meme lobu sayısı	Subklinik mastitisli meme lobu sayısı (%)	p değeri
<b>İrk</b>				0,107
Yerli kara	12	46	18 (39,13)	
Esmer	14	50	27 (54,00)	
Simental	63	237	86 (36,29)	
Holştayn	113	424	180 (42,45)	
<b>Yaş</b>				0,001
2-5 yaş	95	359	117 (32,59)	
6-8 yaş	67	255	112 (43,92)	
≥9 yaş	40	143	82 (57,34)	
<b>Laktasyon dönemi</b>				0,006
<90	61	231	82 (35,50)	
90-180	70	266	102 (38,35)	
>180	71	260	127 (48,85)	
<b>Sürü büyüklüğü</b>				0,001
≤10 hayvan	85	319	154 (48,28)	
>10 hayvan	117	438	157 (35,84)	
<b>Sağım şekli</b>				0,248
Elle sağım	9	32	10 (31,25)	
Makineli sağım	193	725	301 (41,52)	
<b>Teat dipping uygulaması</b>				0,912
Var	52	189	77 (40,74)	
Yok	150	568	234 (41,20)	
<b>Meme loblarının yerleri</b>				0,611
Sağ ön	202	195	73 (37,44)	
Sol ön	202	188	81 (43,09)	
Sağ arka	202	185	75 (40,54)	
Sol arka	202	189	82 (43,39)	

**Tablo 2.** İneklerde meme lobu düzeyinde subklinik mastitise neden olan risk faktörleri

**Table 2.** Risk factors associated with subclinical mastitis at the quarter level in lactating dairy cows

Bağımsız Değişkenler	$\beta$	SE	OR	%95 GA	p-değeri
Sabit	-1.042	0.170	-	-	-
<b>Yaş</b>					0.001
2-5 yaş	Ref				
6-8 yaş	0.502	0.173	1.653	1.178-2.320	0.004
$\geq 9$ yaş	1.104	0.210	3.016	1.996-4.556	0.001
<b>Laktasyon Dönemi</b>					0.017
<90	Ref				
90-180	-0.191	0.195	0.826	0.546-1.210	0.327
>180	0.327	0.189	1.387	0.957-2.010	0.084
<b>Sürü Büyüklüğü</b>					
>10	Ref				
$\leq 10$	0.560	0.155	1.751	1.291-2.374	0.001

$\beta$ : Regresyon Katsayısı; SE: Standart Hata; OR: Odds Ratio; GA: Güven Aralığı; Ref: Referans Grup

## SONUÇ

Sunulan çalışmanın sonucunda, sürüde 10 ve daha az hayvan barındıran aile tipi işletmelerde bulunan ineklerde, laktasyonun ilerleyen dönemlerindeki ineklerde ve 9 yaş ve üzeri ineklerde CMT skorlarına göre subklinik mastitis olgularının daha fazla gözleendiği tespit edilmiştir. Afyonkarahisar ilinde aile tipi işletmelerde yüksek oranda gözlenen subklinik mastitis olguları büyük bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bölgede bulunan bu tip işletmelere mastitis kontrol programları hakkında mutlaka eğitim verilerek işletmelerin kar oranları arttırılmalıdır.

## TEŞEKKÜR

*İstatistiksel analizlerin yapılması aşamasındaki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Nurban DOĞAN'a teşekkür ederim. Bu araştırma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 16.SAĞ.BİL.11 nolu proje ile desteklenmiştir. Bu araştırma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (AKÜHLADYEK-385-14-Referans nolu araştırma, sayı:49533702/96).*

## KAYNAKLAR

- Alaşam E, Tekeli T, Sezen Y, Erganiş O. Sütçü ineklerin subklinik mastitislerinde cefoperazone'un etkisi üzerine çalışma. Selçuk Üniversitesi Vet Fak Derg. 1986; 2(1):65-74.
- Costa JH, Hötzel MJ, Longo C, Balcão LF. A survey of management practices that influence production and welfare of dairy cattle on family farms in southern Brazil. J Dairy Sci. 2013; 96(1):307-17.
- Çoban Ö, Tüzemen N. Siyah alaca ve esmer ineklerde subklinik mastitis için risk faktörleri. Uludağ Univ J Fac Vet Med, 2007; 26(1-2):27-31.

Ergün Y, Aslantaş Ö, Doğruer G, Cantekin Z. Hatay ilindeki aile tipi süt sığırcılığı işletmelerinde subklinik mastitislerin epidemiyolojisi. Vet Bil Derg. 2004; 20(4):25-28.

FAO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu). <http://www.fao.org/family-farming-decade/en/>;Erişim tarihi: 18.06.2019.

Katsande S, Matope G, Ndengu M, Pfukenyi DM. Prevalence of mastitis in dairy cows from smallholder farms in Zimbabwe. Onderstepoort J Vet Res. 2013; 80(1): Art.523,7 pages.

Koçyiğit R, Yılmaz O, Özenç E, Uçar M. Effect of some risk factors on subclinical mastitis in dairy cows. Kocatepe Vet J. 2016; 9(3):185-193.

Köker A, Salmanoğlu R. Sütçü ineklerde subklinik mastitislerin şekillenmesinde sağım makinesine ilişkin sorunların incelenmesi. YYÜ Vet Fak Derg. 2000; 11(2):106-112.

Köker A, Özenç E. Sağım makinalarının kaliteli süt üretimindeki rolü. Hasad Hayvancılık Derg. 2005; 245:24-29.

Küplülü Ş, Vural R. Büyük ruminantlarda meme sağlığı kontrol programları, In: Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları, Ed; Kaymaz M, Fındık M, Rışvanlı A, Köker A. 1. Baskı, Medipres Matbaacılık Ltd. Şti., Malatya. 2016: pp. 261-294.

Macun HC, Pir Yağcı İ, Ünal N, Kalender H, Sakarya F, Yıldırım M. Kırıkkale'de belirlenen subklinik mastitisli ineklerde etken izolasyonu ve antibiyotik direnç durumu. Erciyes Üniv Vet Fak Derg. 2011; 8(2):83-89.

Mdegela RH, Kusiluka LJM, Kapaga AM, Karimuribo ED, Turuka FM, Bundala A, Kivaria F, Kabula B, Manjurano A, Loken T, Kambarage DM. Prevalence and determinants of mastitis and milk-borne zoonoses in smallholder dairy farming sector in Kibaha and Morogoro districts in eastern Tanzania. J Vet Med B. 2004; 51:123-128.

Östensson K, Lam V, Sjögren N, Wredle E. Prevalence of subclinical mastitis and isolated udder pathogens in dairy cows in Southern Vietnam. Trop Anim Health Prod. 2013; 45:979-986.

Özdemir S, Kaymaz M. Küçük Aile İşletmelerinde Yetiştirilen İneklerde Subklinik Mastitis İnsidensi ve Tanı Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg. 2013; 8(1):71-79.

- Özenç E, Vural MR, Şeker E, Uçar M.** An evaluation of subclinical mastitis during lactation in Anatolian buffaloes. *Turk J Vet Anim Sci.* 2008; 32(5):359-368.
- Özenç E, Ergün Y, Cantekin Z, Vural MR.** Sütçü Sürülerde Mastitislerin Tanısında Kullanılan Güncel Yöntemler. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Obstet Gynecol-Special Topics.* 2018; 4(1):114-118.
- Özenç E, Şeker E, Baki Acar D, Koca HB, Yazıcı E, Çelik HA, Doğan N, Avcı G, Yılmaz O, Küçükkebağcı M, Uçar M, Baştan A.** Milk lactoferrin concentrations in Anatolian buffaloes with and without subclinical mastitis. *Buffalo Bull.* 2019; 38(2): 291-298.
- Philpot WN, Nickerson SC.** Mastitis: Counter Attack. Babson Bros Co. Naperville, USA. 1991.
- Plozza K, Lievaart JJ, Potts G, Barkema HW.** Subclinical mastitis and associated risk factors on dairy farms in New South Wales. *Aust Vet J.* 2011; 89(1-2):41-46.
- Rişvanlı A.** Elazığ bölgesi süt ineklerinde klinik ve subklinik mastitislerin dağılımı, mastitislere sebep olan mikroorganizmaların izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları üzerine çalışma. Doktora tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, 2000.
- Rişvanlı A, Kalkan C.** Sütçü ineklerde yaş ve ırkın subklinik mastitisli memelerin sütlerindeki somatik hücre sayıları ile mikrobiyolojik izolasyon oranlarına etkisi. *YYÜ Vet Fak Derg.* 2002; 13(1-2):84-87.
- Sabancıoğlu N, Çolak A, Akbulut Ö, Tüzemen N, Bayram B.** Siyah-Alaca ve Esmer ineklerde CMT skoru ile bazı süt verim özellikleri arasındaki ilişkiler. *Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg.* 2003; 43(2):139-143.
- Schalm OW, Carroll, EJ, Jain NC.** Bovine Mastitis. Lea&Febiger, Philadelphia. 1971.
- Seker E, Ozenc E.** In vitro biofilm activity of *Candida* species isolated from Anatolian buffaloes with mastitis in Western Turkey. *Vet Arhiv.* 2011; 81(6):723-730.
- Seker E, Ozenc E, Konak S, Pamuk S, Kuyucuoglu Y.** Occurrence, hemolytic toxins and antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* strains from dairy cow and Anatolian water buffalo quarter milk samples in Turkey. *Acta Sci Vet.* 2015; 43:1299.
- Şeker İ, Rişvanlı A, Kul S, Bayraktar M, Kaygusuz O.** İsviçre esmeri ineklerde meme özellikleri ve süt verimi ile CMT skoru arasında ilişkiler. *Lalahan Hay Araş Enst Derg.* 2000; 40(1):29-38.
- Tolosa T, Verbeke J, Piepers S, Supre K, De Vlieghe S.** Risk factors associated with subclinical mastitis as detected by California Mastitis Test in smallholder dairy farms in Jimma, Ethiopia using multilevel modelling. *Prev Vet Med.* 2013; 112:68-75.
- Vural MR, Ergün Y, Özenç E.** Büyük ruminantlarda mastitis, In: *Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları*, Ed; Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A. 1. Baskı, Medipres Matbaacılık Ltd. Şti., Malatya. 2016: pp. 149-247.
- Yigit AA, Cinar M, Macun HC, Ozenc E, Kabakci R, Yazici E, Kalender H, Bastan A, Salar S.** Total oxidant and antioxidant activities in milk with various somatic cell count intervals during discrete cow and buffalo lactation periods. *Indian J Dairy Sci.* 2018; 71(1):72-77.
- Zeconi A, Piccinini R, Casirani G, Binda E, Migliorati L.** Effects of automatic milking system on teat tissues, intramammary infections and somatic cell counts. *Ital J Anim Sci.* 2003; 2:275-282.

## Determination of The Feedlot Performance and Ration Cost in Charolais Breed Heifers Before Insemination

Hıdır GÜMÜŞ<sup>1\*</sup>, Ahmet Cumhuri AKIN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Animal Nutrition and Nutritional Diseases Department, 15100, Burdur, Turkey

<sup>2</sup>Department of Animal Health Economics and Management, Faculty of Veterinary Medicine, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, 15100, Burdur, Turkey

### ABSTRACT

The objective of the current study was to determine the feedlot performance and ration cost in Charolais breed heifers before insemination. In this research, 65 Charolais head heifers at 9-10 months of age were used. Rations were prepared according to the protein and energy needs of heifers. Feedlot performance and daily feed costs of heifers were determined at the end of each feeding period. In the study, monthly daily gain (kg) of heifers were determined as 41,29±10,82, 34,00±6,85, 37,38±9,80, 25,14±9,58, 27,82±11,24 daily gain (kg) as 1,38±0,36, 1,13±0,23, 1,25±0,32, 0,84±0,31, 0,93±0,37 (P<0,05), respectively. The highest cost of feeding per animal was in the 3rd period (7,25±1,90TL) and the lowest cost was in the 1st period (6,10±1,60TL). Due to the high feed costs in dairy cattle breeding, it is important to control feed costs by carrying out such studies with different rations.

**Keywords:** Charolais, Heifer, Cost, Performance, Ration

\*\*\*

### Şarole Irkı Düvelerde Tohumlama Öncesi Beslenme Performansını ve Rasyon Maliyetlerinin Belirlenmesi

#### ÖZ

Bu çalışmanın amacı şarole ırkı düvelerde tohumlama öncesi beslenme performansı ve rasyon maliyetlerinin belirlenmesidir. Araştırmada 9-10 aylık yaşta 65 baş şarole ırkı düve kullanılmıştır. Rasyonlar, düvelerin protein ve enerji ihtiyaçları göz önüne alınarak hazırlanmıştır. Her besleme dönemi sonunda düvelerin beslenme performansları ve günlük yem maliyetleri belirlenmiştir. Araştırmada düvelerin aylık canlı ağırlık (kg) artışları dönemlere göre sırasıyla; 41,29±10,82, 34,00±6,85, 37,38±9,80, 25,14±9,58, 27,82±11,24 günlük canlı ağırlık artışları (kg) ise; 1,38±0,36, 1,13±0,23, 1,25±0,32, 0,84±0,31, 0,93±0,37 olarak tespit edilmiştir (P<0,05). Hayvan başına en yüksek rasyon maliyeti 3. dönemde ( 7,25±1,90TL), en düşük rasyon maliyeti ise 1. dönemde (6,10±1,60TL) gerçekleşmiştir. Süt sığırı yetiştiriciliğinde yem giderlerinin yüksek olmasından dolayı farklı rasyonlarla bu tip çalışmaların yapılarak yem maliyetlerinin kontrol altına alınması önem arz etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Şarole, Düve, Maliyet, Performans, Rasyon

To cite this article: Gümüş H. Akın A.C. Determination of The Feedlot Performance and Ration Cost in Charolais Breed Heifers Before Insemination. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):284-291.

Submission: 17.05.2019 Accepted: 12.08.2019 Published Online: 24.08.2019

ORCID ID; HG: 0000-0001-7077-1036, ACA: 0000-0003-3732-0529

\*Corresponding author e-mail: hdr gumus@gmail.com

## GİRİŞ

Süt sığırcılığı işletmelerinde sağmal hayvanların ve düvelerin yetiştiriciliği ile ilgili maliyetlerin hesaplanması çiftlik işletmeciliğinin önemli bir parçasıdır (Zwald 2007). Düve yetiştiriciliğinde amaç üretimde kullanılan girdi maliyetlerini azaltarak kârlılığı artırmaktır (Hoffman ve Funk 1992). Yem, düve üretiminde en büyük maliyet kalemini oluşturmakla birlikte bu maliyeti kontrol edebilmek için en iyi yol düve yetiştiriciliğindeki toplam masrafları kontrol altına almaktır (Gabler ve ark. 2000). Süt sığırcılığı yetiştiriciliğinde toplam masrafları kontrol etmenin en iyi yolu ise yemden yararlanmayı yönetebilmektir. Ancak yemden yararlanma düve yetiştiriciliğinde nadiren düşünülür (Zanton ve Heinrichs 2008). İşletmelerde düvelerin maliyeti, toplam süt üretim maliyetinin %15-20'sine karşılık gelmekte, bu nedenle yem maliyetinden sonra ikinci en büyük girdiyi oluşturmaktadır (Annexstad 1986, Goodger ve Theodore 1986). Düve beslemesi uygun bir büyüme hızı ile hayvanın cinsel olgunluğa ulaşmasını sağlayan ekonomik bir besleme programı temeline dayanır. Verim gücü yüksek düve yetiştirmenin başarı ölçütü düvelerin optimum düzeyde büyümesi ve gelişmesidir. Düvelerin döl verimine ilişkin performansları büyüme hızından etkilenir (Tuncer, 2017). Uygun bir büyüme hızı ile gerekli canlı ağırlığa ulaşan düvelerin tohumlanarak gebe kalması sağlanır. Nitekim erken yaşta tohumlanan düvelerde süt verimi ve canlı ağırlık artışı, gelişmesini normal olarak tamamladıktan sonra tohumlanan düvelere göre daha düşük kalmaktadır (Türk 2010). Süt sığırcılığı yapan işletmelerde süt veriminin daha çok önemsenmesi nedeniyle düve yetiştiriciliği göz ardı edilmektedir. Ancak düveler hem işletmenin süt üretim potansiyelini belirleyen hem de gelecekteki döl verimi ile sürünün sürekliliğini sağlayan gruptur (Çolakoglu ve Küplülü 2016). Düveler sürüdeki sağmal ineklere göre 100 ila 150 kg daha az vücut ağırlığı ile buzağılama yaptıklarından (doğum yaptıklarından) (Parker 1996) bakım ve besleme ihtiyaçları sürüdeki diğer hayvanlardan farklıdır (Roche ve ark. 2007, Wathes ve ark. 2007). Bu çalışma, tohumlama öncesi farklı rasyonlarla beslenen şarole ırkı ithal düvelerin farklı dönemlerdeki beslenme performanslarını ve bu rasyonların maliyetlerinin hesaplanarak belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Araştırma Afyonkarahisar'da bulunan özel bir işletmede yürütülmüştür. Hayvanlar Çek Cumhuriyetinden 14.12.2017 tarihinde yola çıkmış ve 24.12.2017 tarihinde 65 adet düve çiftliğe gelmiştir. Hayvanlar 30 gün boyunca karantina altında tutulmuş ve burada parazit ilaçları, şap (21 gün sonra tekrar yapıldı), karma, çiçek, IBR (Infection Bovine Rhinotracheitis), BVD (Bovine Viral Diarrhea) ve

brusella aşuları yapılmıştır. Çalışma boyunca ocak ayında ortalama hava sıcaklığı 8.56 C° iken en düşük sıcaklık geceleri -3.5 C°, Haziran ayında ortalama hava sıcaklığı 27,4 C° iken en yüksek sıcaklık gündüz 30 C° civarlarında seyretmiştir. Hayvanlar toplam iki padokta barındırılmıştır. Padokların kuzey tarafı tuğla ile çatısı ise sandviç paneller vasıtasıyla kapatılmıştır. Kış aylarında içeride rüzgâr akımını engellemek için güney cephesindeki kapısı da kapatılmıştır. Yaz aylarında hayvanları serinletmek için pülverizatör serinletme sistemleri kullanılmıştır. Altlık olarak padoklarda geçmeli taş (parke taşı) kullanılmıştır. Her on beş günde bir hayvanların altı kepçe ve traktör ile temizlenmiştir.

Araştırmada 9-10 aylık yaşta 65 baş düve kullanılmış ve hayvanlar tohumlama öncesi 150 günlük zaman dilimi içerisinde dönemsel olarak NRC'nin (Nutritional Research Council) belirlediği rasyona göre beslenmişlerdir (NRC 2001). Hayvanlar 30 günlük karantina süresinden sonra aylık olarak 5 döneme ayrılmış ve hep aynı padoklarda barındırılmıştır [24.Ocak-24.Şubat (1. Dönem); 24.Şubat-24.Mart (2. Dönem); 24 Mart-24.Nisan (3. Dönem); 24. Nisan-24 Mayıs (4. Dönem); 24. Mayıs-24 Haziran (5. Dönem)].

Rasyonda kaba yem içeriğini; çayır silajı, mısır silajı, buğday samanı, çayır kuru otu, yonca kuru otu, şeker pancarı posası (ŞPP); konsantre yem içeriğini arpa, melas, ayçiçeği tohumu küspesi (ATK) ve düve yemi oluşturmuştur. Hazırlanan günlük rasyonların içeriği Tablo 1'de sunulmuştur. Yemler, toplam karma yemleme (TKY) sistemi ile saat 08:00 ve 18:00'de olmak üzere iki öğün halinde 12 m<sup>3</sup>lük karma yem vagonu ile hayvanlara verilmiştir. Hayvanlar her dönemde bireysel olarak sabah yemlemesinden önce tartılmış, aylık canlı ağırlıkları (ACA) tespit edilmiştir. Tartımlar arası farktan yararlanılarak hem aylık canlı ağırlık artışları (ACAA) hem de günlük canlı ağırlık artışları (GCAA) belirlenmiştir. Bir kg canlı ağırlık artışı için tüketilen toplam yem kuru madde miktarının kilogram olarak hesaplanmasıyla yemden yararlanma oranı (YYO) hesaplanmıştır. Hayvanların ortalama günlük yem tüketim maliyeti; dönemlere göre rasyonun 1 kg yem fiyatının (TL) günlük kuru madde tüketimi ile (kg) çarpılmasıyla elde edilmiştir.

Tablo 1'de besleme süresince beş farklı dönemde her bir hayvanın günlük yem tüketimi belirlenerek elde edilen veriler cari fiyatlarla çarpılarak her bir dönemde ortalama günlük yem maliyeti (OGYM) hesaplanmıştır. Düvelerde farklı dönemlerdeki rasyonların; aylık canlı ağırlık artışı (ACAA), günlük canlı ağırlık artışı (GCAA), günlük kuru madde tüketimi (GKMT), yemden yararlanma oranı (YYO) ve ortalama günlük yem maliyeti (OGYM) üzerine etkisini belirlemek amacıyla SPSS istatistik paket programı kullanılmıştır (IBM SPSS Versiyon 22.0). Dönemler arası farklılıkları belirlemek için *tekrarlı verilerde varyans analizi (repeat measure)* ve dönemlerin

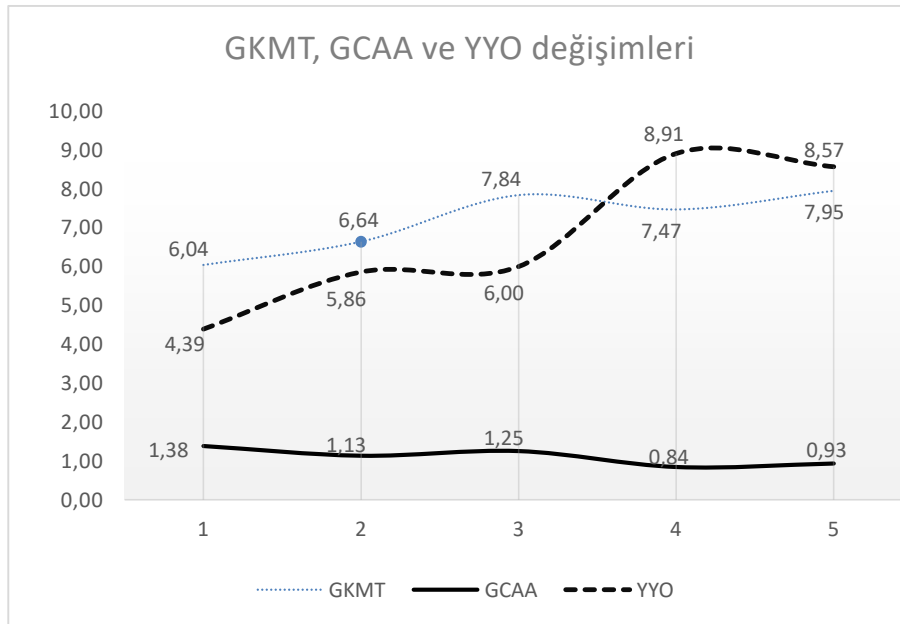


ikili karşılaştırmalarında *paired samples t-testi* kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma olarak sunulmuştur. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $P<0,05$  olarak kabul edilmiştir (Kalaycı, 2010).

## BULGULAR

Tohumlama öncesi düvelerin beslenmesi için hazırlanan rasyonların maliyetlerini gösteren bilgiler Tablo 2'de sunulmuştur. Tablo 2 incelendiğinde ilk dönem kaba yem/konsantre yem oranı %59,88 iken son dönem %80,02'ye yükselmiştir. Besleme periyodu boyunca dönem ilerledikçe rasyonda kaba yem miktarı artarken konsantre yem miktarı azalmıştır. Düvelerin günlük rasyon maliyeti birinci dönemde 6,42 (TL/kg); ikinci dönemde 7,12 (TL/kg); üçüncü dönemde 7,25 (TL/kg); dördüncü dönemde 7,12 (TL/kg) ve son dönemde 6,90 (TL/kg) TL olarak belirlenmiştir. Denemenin başında ortalama canlı ağırlıkları  $224,04\pm 20,38$  kg olan düveler, besleme dönemi sonunda  $361,86\pm 30,04$  kg'a ulaşmıştır. Dönemsel olarak aylık canlı ağırlık artışı dalgalı bir seyir

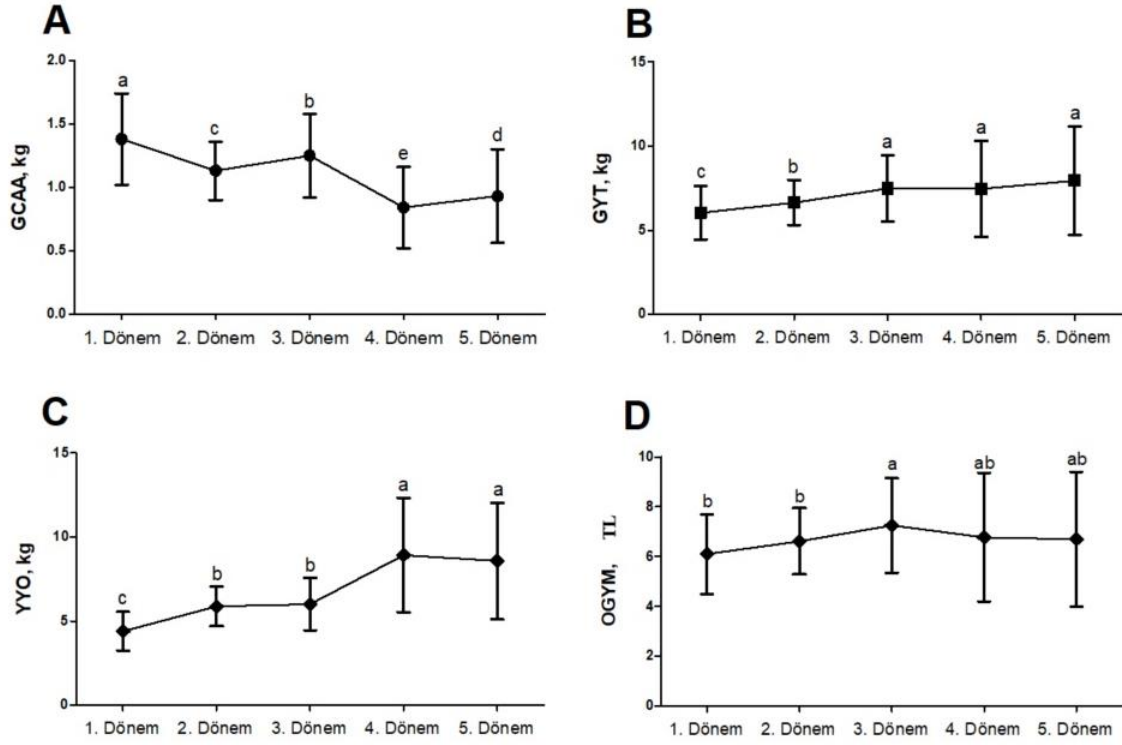
göstermiştir. Düvelerin günlük canlı ağırlık artışı birinci dönemde 1,38 kg; ikinci dönemde 1,13 kg; üçüncü dönemde 1,25 kg; dördüncü dönemde 0,84 kg ve son dönemde 0,93 kg olarak belirlenmiştir (Şekil 1). Canlı ağırlık artışına bağlı olarak düvelerin kuru madde tüketimi artış göstermiştir. Günlük canlı ağırlık artışına bağlı olarak yemden yararlanma oranı azalmıştır. Araştırmada farklı dönemlerde hazırlanan rasyonlarla beslenen düvelerde, ay sonu canlı ağırlığı (ACA), aylık canlı ağırlık artışı (ACAA), günlük canlı ağırlık artışı (GCAA), günlük kuru madde tüketimi (GKMT), yemden yararlanma oranı (YYO) ve ortalama günlük yem maliyeti (OGYM) Tablo 3'de sunulmuştur. Ortalama günlük yem maliyetleri açısından bir değerlendirme yapıldığında; en yüksek maliyetli besleme üçüncü dönemde, en düşük maliyetli besleme ise 1. dönemde gerçekleşmiştir. Şekil 2'de GCAA, GKMT, YYO ve OGYM parametreleri dönemlere göre grup ortalaması ve standart sapma olarak sunulmuştur. a, b, c, d, e; Farklı harfi taşıyan değerler için fark istatistik olarak anlamlıdır (*paired samples t-testi*,  $P<0,05$ ).



**Şekil 1.** Besleme boyunca düvelerin günlük kuru madde tüketimleri, günlük canlı ağırlık artışları ve yemden yararlanma oranları

**Graph 1.** Daily dry matter intake, daily gain and feed conversion of heifer during the feeding

GCAA, GKMT, YYO ve OGYM parametreleri dönemlere göre grup ortalaması ve standart sapma olarak sunulmuştur. a, b, c, d, e; Farklı harfi taşıyan değerler için fark istatistiki olarak anlamlıdır (paired samples t-testi, P<0,05).



**Şekil 2.** Besleme boyunca düvelerin günlük canlı ağırlık artışları (A) günlük kuru madde tüketimleri (B), yemden yararlanma oranları (C) ve ortalama günlük yem maliyeti (D)

**Graph 2.** Daily gain (A), daily dry matter intake (B), feed conversion (C) and average of daily feed cost (D) of heifer during the feeding

**Tablo 1.** Farklı dönemlerdeki rasyonların içeriği

**Table 1.** Composition of ration at different stage

Rasyon İçeriği (kg)	1. Dönem	2. Dönem	3. Dönem	4. Dönem	5. Dönem
Çayır Silajı	1,5	2,0	2,0	2,0	5,5
Mısır Silajı	1,5	2,0	2,2	2,2	2,0
Buğday Samanı	1,3	1,3	1,6	3,5	4,0
Çayır Kuru Otu	0,5	0,5	0,5	0,6	0,0
Yonca Kuru Otu	1,0	1,0	1,0	0,6	0,0
Arpa, Ezme	0,0	0,5	0,5	0,0	0,0
Melas	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1
ATK <sup>1</sup>	1,2	1,2	1,2	0,96	0,6
ŞPP <sup>2</sup>	1,5	1,5	1,5	1,5	2,0
Düve Yemi	1,1	1,1	1,1	0,8	0,8
Soda*	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Tuz	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Vitamin-Mineral Premiks **	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Canlı maya kültürü /kg ***	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
<b>Toplam</b>	<b>10,07</b>	<b>11,57</b>	<b>12,07</b>	<b>12,43</b>	<b>15,17</b>

<sup>1</sup>ATK: Ayçiçeği tohumu küspesi; <sup>2</sup>ŞPP: Şeker pancarı posası

\*Sodyum bikarbonat

\*\*Vitamin ve mineral karışımı, 1000 gramda: Vitamin A, 10.000.000 IU; Vitamin D, 2.000.000; vitamin E, 30.000 mg; Mangan, 50.000 mg; Demir, 50.000 mg; Çinko, 50.000 mg; Bakır, 10.000 mg; İyot, 800 mg; Kobalt, 150 mg; Selenyum, 150 mg

\*\*\* *Saccharomyces cerevisiae*, 1026 şuşu

**Tablo 2.** Farklı dönemlerde günlük rasyon fiyatı (TL), miktarı (kg) ve maliyetleri (TL)

**Table 2.** Daily feed price, amount and cost of ration at different stage

Yemler, kg	1. Dönem			2. Dönem			3. Dönem			4. Dönem			5. Dönem		
	Fiyat	Miktar	Maliyet	Fiyat	Miktar	Maliyet	Fiyat	Miktar	Maliyet	Fiyat	Miktar	Maliyet	Fiyat	Miktar	Maliyet
Çayır Silajı	0,25	1,50	0,375	0,25	2,00	0,50	0,30	2,00	0,60	0,30	2,00	0,60	0,30	5,50	1,65
Mısır Silajı	0,25	1,50	0,375	0,25	2,00	0,50	0,30	2,20	0,66	0,30	2,20	0,66	0,30	2,00	0,60
Buğday Samanı	0,80	1,30	1,04	0,80	1,30	1,04	0,60	1,60	0,96	0,60	3,50	2,10	0,50	4,00	2,00
Çayır Kuru Otu	0,90	0,50	0,45	0,90	0,50	0,45	0,70	0,50	0,35	0,60	0,60	0,36	0,50	0	0
Yonca Kuru Otu	0,90	1,00	0,90	0,90	1,00	0,90	0,90	1,00	0,90	0,70	0,60	0,42	0,75	0	0
Arpa, Ezme	0,90	0	0	0,90	0,50	0,45	0,90	0,50	0,45	0,85	0	0	0,85	0	0
Melas	0,40	0,30	0,12	0,40	0,30	0,12	0,40	0,30	0,12	0,40	0,10	0,04	0,40	0,10	0,04
ATK	0,85	1,20	1,02	0,85	1,20	1,02	0,85	1,20	1,02	1,10	0,96	1,056	1,10	0,60	0,66
ŞPP	0,12	1,50	0,18	0,12	1,50	0,18	0,12	1,50	0,18	0,12	1,50	0,18	0,12	2,00	0,24
Düve Yemi	1,10	1,10	1,21	1,10	1,10	1,21	1,15	1,10	1,265	1,20	0,80	0,96	1,20	0,80	0,96
Soda*	1,35	0,05	0,0675	1,35	0,05	0,0675	1,35	0,05	0,0675	1,35	0,05	0,0675	1,35	0,05	0,0675
Tuz	0,30	0,02	0,006	0,30	0,02	0,006	0,30	0,02	0,006	0,30	0,02	0,006	0,30	0,02	0,006
Vitamin-Mineral **	7,00	0,05	0,350	7,00	0,05	0,350	7,00	0,05	0,350	7,00	0,05	0,350	7,00	0,05	0,350
Canlı maya kültürü***	6,50	0,05	0,325	6,50	0,05	0,325	6,50	0,05	0,325	6,50	0,05	0,325	6,50	0,05	0,325
<b>Toplam</b>		<b>10,07</b>	<b>6,42</b>		<b>11,57</b>	<b>7,12</b>		<b>12,07</b>	<b>7,25</b>		<b>12,43</b>	<b>7,12</b>		<b>15,17</b>	<b>6,90</b>
1 kg yem maliyeti (TL)			0,637			0,615			0,601			0,573			0,455
Yem KM, %			63,1			61,8			62,0			63,2			54,0
1 kg KM yem maliyeti (TL)			1,009			0,995			0,969			0,906			0,842

<sup>1</sup>ATK: Ayçiçeği tohumu küspesi; <sup>2</sup>ŞPP: Şeker pancarı posası

\*Sodyum bikarbonat

\*\*Vitamin and mineral karışımı, 1000 gramda: Vitamin A, 10.000.000 IU; Vitamin D, 2.000.000; vitamin E, 30.000 mg; Mangan, 50.000 mg; Demir, 50.000 mg; Çinko, 50.000 mg; Bakır, 10.000 mg; İyot, 800 mg; Kobalt, 150 mg; Selenyum, 150 mg

\*\*\* *Saccharomyces cerevisiae*, 1026 şusu

**Tablo 3.** Düvelerin farklı dönemlerdeki performans değerleri ve yem maliyeti  
**Table 3.** Performance value and ration cost of heifer at different stage

	1. Dönem	2. Dönem	3. Dönem	4. Dönem	5. Dönem
ACA, kg	224,04±20,38	265,33±25,98	299,33±26,12	336,72±29,92	361,86±30,04
AAA, kg	41,29±10,82 <sup>a</sup>	34,00±6,85 <sup>c</sup>	37,38±9,80 <sup>b</sup>	25,14±9,58 <sup>e</sup>	27,82±11,24 <sup>d</sup>
GCAA, kg	1,38±0,36 <sup>a</sup>	1,13±0,23 <sup>c</sup>	1,25±0,32 <sup>b</sup>	0,84±0,31 <sup>e</sup>	0,93±0,37 <sup>d</sup>
GKMT, kg	6,042±1,583 <sup>c</sup>	6,642±1,338 <sup>b</sup>	7,480±1,961 <sup>a</sup>	7,470±2,845 <sup>a</sup>	7,950±3,214 <sup>a</sup>
YYO kg/kg	4,39±1,15 <sup>c</sup>	5,86±1,18 <sup>b</sup>	6,00±1,57 <sup>b</sup>	8,91±3,40 <sup>a</sup>	8,57±3,46 <sup>a</sup>
OGYM, TL	6,10±1,60 <sup>b</sup>	6,61±1,33 <sup>b</sup>	7,25±1,90 <sup>a</sup>	6,77±2,58 <sup>ab</sup>	6,69±2,71 <sup>ab</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup>: Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalamalar arası istatistikî fark anlamlıdır (P<0,05).

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Tohumlama öncesi farklı rasyonlarla beslenen şarole ırkı ithal düvelerin farklı dönemlerdeki beslenme performanslarını ve bu rasyonların maliyetlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada; besleme dönemlerinde AAA ve GCAA bakımından farklılıkların önemli olduğu, birim yem maliyetlerinin besleme dönemi boyunca azaldığı saptandı. Düvelerin besin madde ihtiyaçları NRC (2001) göre hesaplanmış ve rasyonları beş dönemde ihtiyaçlara göre düzenlenmiştir. Farklı dönemlerde günlük rasyon miktarları Tablo 2’de gösterilmiş olup, rasyonda kaba yem miktarı artırılmış konsantre yem miktarı da azaltılmıştır. Bindari ve ark (2013) aşırı enerji alımının düvelerde ‘yağlı inek sendromuna’ neden olduğunu ve bir sonraki laktasyonda fertilitenin olumsuz etkilendiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte kalitesiz kaba yemle beslenen düvelerde östrus belirtilerinin tam tespit edilememesine bağlı olarak gebelik oranlarında düşüklüklerin olduğu belirtilmiştir. Ayaşan (2015), düvelerin vücut kondiyon skorlarının (VKS) önemli olduğu ve beslenme uygulamalarının VKS göz alınarak yapılması gerektiğini vurgulamışlardır. Nitekim Abeni ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada İtalyan Holstein-Friesian düveleri 7 aylıktan 14 aylığa kadar (tohumlama öncesi) NRC’nin önerdiği değerlerinden %15 daha fazla enerji ve protein ve önerdiği normal değerlere göre iki grup halinde düveleri beslemişlerdir. Çalışmanın sonucunda önerilen değerden yüksek değerlere göre beslenen ve normal değerlere göre beslenen düvelerde GCAA’nın sırasıyla 0,775 kg/gün ve 0,667 kg/gün olduğunu; vücut kondiyon skorlarının 2,45 ve 2,62 olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan düveler etçi ırk özelliğine sahip olduğundan (Martinez ve ark., 2016) dolayı GCAA normale göre biraz yüksek seyretmiştir.

Sütten kesimden tohumlanma zamanına kadar iyi beslenen düvelerin daha erken pubertaya ulaşarak aktif bir sıklusa sahip olduklarından dolayı gebelik oranlarının iyileştiği (Martson ve ark. 1995), günlük kuru madde tüketimi iyi olan düvelerin hem yağsız bir kondiyon sahip olduğu bununla birlikte pubertaya erken ulaştığı belirtilmiştir. Çalışmamızda da GKMT 1. dönemde 6,042 kg/gün olarak tespit edilirken dönemler boyunca artış göstermiş ve son dönem

7,950 kg/gün hesaplanmıştır. Erken süttten kesme ve konsantre yemle besleme kombinasyonu “kademeli besleme rejimi” (stair-step) şeklinde izlenirse, kontrollü bir büyüme gerçekleşir ve düveler 14. aydan daha önce östrus siklusunu yakalayıp erken cinselliğe ulaşır (Occhio ve ark. 2018). Yapılan çalışmada günlük canlı ağırlık artışı dönemlere göre farklılık göstermekle birlikte 0,84 ile 1,38 kg arasında olduğu hesaplanmıştır. Bu oranlar yapılan çalışmalarla da benzerlik göstermektedir. Cardoso ve ark. (2014) “kademeli besleme rejimi” ile besledikleri düvelerin pubertaya daha erken ulaştıklarını, bu düvelerin günlük 0,84 kg canlı ağırlık kazandığını ve rasyon maliyetinin daha az olduğunu belirtmişlerdir. Akins ve ark. (2016) düvelerin süttten kesimden sonra tohumlanıncaya kadar ki ortalama günlük canlı ağırlık artışının 0,85-0,90 kg olması gerektiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, 3. aydan 9.’aya kadar meme gelişiminin diğer organlara göre (Allometrik büyüme) çok hızlı oranda olduğunu ve bu periyot boyunca beslemenin önemli olduğunu belirtmişlerdir. Yüksek enerjili rasyonlarla beslenen düvelerde, epitel doku hücre proliferasyonu düşer ve meme bezlerinde yağ doku birikimi artar. Lammers ve ark. (1999) günlük 1 kg canlı ağırlık artışı sağlayan düvelere göre 0,7 kg canlı ağırlık artışı sağlayan düvelerin süt üretiminin %7 daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, bu artışın sebebini meme bezlerinin farklı gelişmesiyle ilişkisi olabileceğini ifade etmişlerdir. Hoffman ve ark. (2001), aynı enerjiye sahip dört farklı protein içeriğine sahip rasyonlarla beslenen düvelerde en iyi gelişimin %13 HP (%8, %11, %13 ve %15) içeren rasyon grubunda bulunan hayvanlar olduğunu rapor etmişlerdir. Gabler ve ark. (2003) protein/enerji oranı farklı olan rasyonlarla (48,3; 59,1; 67,5 g/Mcal) beslenen düvelerde protein/enerji oranının artmasıyla beraber hayvanların kuru madde tüketimlerinin ve günlük canlı ağırlık artışlarının (736,50; 807,86; 814,16 g/gün) iyileştiğini belirtmişlerdir. Araştırmacının bulguları ile yapılan çalışmanın sonuçlar benzer olup, 4. dönem ve 5. dönem GCAA sırasıyla 0,84 ve 0,93 olarak saptanmıştır. İşletmelerde yapılan uygulamaların maliyetlerinin hesaplanması ve analiz edilmesi masrafların en aza inmesini sağlayarak karlılığı arttırmaktadır. Diğer taraftan bu analizler işletmecilik fonksiyonunun gerçekleştirilmesinde işletmeler açısından önemli fayda sağlamaktadır (Şahin ve ark. 2001). Düve yetiştiriciliğinde özellikle işletme ölçekleri

büyük olan işletmelerde uygulanan yemleme sisteminin basitleştirilmesi işgücü gereksinimini azaltır (Kılıç ve Polat 2002). Karma yemlerin hazırlanmasında yemin hem hayvanların ihtiyaçlarını karşılaması hem de en az maliyete sahip olması istenir (Şahman 2008). Rasyon formülasyonları işletmelerde yem maliyetlerini azaltmak için kullanılan yöntemlerden birisidir (Nabasirye ve ark. 2011). Araştırma kapsamında düvelerin besin ihtiyaçlarına göre hazırlanan rasyonların birim maliyetleri besleme dönemlerine göre azalan bir seyir göstermektedir (Tablo 2). Ancak tüketilen yem miktarı değişiklik gösterdiğinden besleme dönemleri boyunca OGYM dalgalı bir seyir göstermektedir (Tablo 3).

Sonuç olarak süt sığırı yetiştiriciliği yapan işletmelerde düveler mevcut sürünün devamlılığını sağlayan gruptur. Ancak düvelerin canlı ağırlıkları, sağmal hayvanlardan daha az olmasından dolayı farklı bir besleme rejimine ihtiyaç duymaktadırlar. Düvelerin pubertaya erişmeleri yaştan daha çok canlı ağırlığa bağlı olması tohumlama öncesinde düvelerin uygun maliyetli rasyonlarla beslenmesinin önemini arttırmaktadır. Diğer taraftan süt sığırı yetiştiriciliğinde yem giderlerinin yüksek olmasından dolayı farklı rasyonlarla bu tip çalışmaların yapılması kaynakların verimli kullanılması açısından önem arz etmektedir.

## KAYNAKLAR

**Abeni F, Calamari L, Stefanini L, Pirlot G.** Effects of Daily Gain in Pre- and Postpubertal Replacement Dairy Heifers on Body Condition Score, Body Size, Metabolic Profile, and Future Milk Production. *J Dairy Sci.* 83; 1468-1478.

**Akins MS.** Dairy heifer development and nutrition management. *Veterinary Clinics: Food Anim Pract.* 2016; 32(2):303-317.

**Annexstad J.** Raise replacements economically. *Dairy Herd Manage.* 1986.

**Bindari YR, Shrestha S, Shrestha N Gaire TN.** Effects of nutrition on reproduction. *Adv Appl Sci Res.* 2013; 4(1):421-429.

**Cardoso RC, Alves BRC, Prezotto LD, Thorson JF, Tedeschi LO, Keisler DH, Park CS, Amstalden M, Williams GL.** Use of a stair-step compensatory gain nutritional regimen to program the onset of puberty in beef heifers. *J Anim Sci.* 2014; 92:2942-2949.

**Çolakoğlu HE, Küplülü Ş.** İnek ve düvelerde vücut kondisyon skoru değişiminin postpartum döneme ve fertilité parametrelerine etkisi. *Kocatepe Vet J.* 2016; 9(3):146-158.

**Tuncer ŞD.** Düve Besleme, In: Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları, Ed; Ergün A, Tuncer ŞD, Çolpan İ, Yalçın S, Yıldız G, Küçükersan MK, Küçükersan S, Şehu A, Saçaklı P, 7<sup>th</sup> Ed., Medipress, Ankara, Turkey. 2017; s. 301-305

**Gabler MT, Heinrichs AJ.** Dietary protein to metabolizable energy ratios on feed efficiency and structural growth of prepubertal Holstein heifers. *J Dairy Sci.* 2003; 86:268-274.

**Gabler MT, Tozer PR, Heinrichs AJ.** Development of a cost analysis spreadsheet for calculating the cost to raise a replacement dairy heifer. *J Dairy Sci.* 2000; 83:1104-1109.

**Gooder WJ, Theodore EM.** Calf management practices and health management decisions on large dairies. *J Dairy Sci.* 1986; 69:580-584.

**Hoffman PC, Esser NM, Bauman LM, Denzine SL, Engstrom M, Chester-Jones H.** Short communication: Effect of dietary protein on growth and nitrogen balance of Holstein heifers. *J Dairy Sci.* 2001; 84:843-847.

**Hoffman PC, Funk DA.** Applied dynamics of dairy replacement growth and management. *J Dairy Sci.* 1992; 75(9): 2504-2516.

**IBM SPSS, IBM Corp. Released.** IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: USA. 2013.

**Kalaycı Ş.** SPSS uygulamalı çok değişkenli istatistik teknikleri (Vol. 5). Asil Yayın Dağıtım, Ankara, Turkey.2010.

**Lammers BP, Heinrichs AJ, Kensing RS.** The effects of accelerated growth rates and estrogen implants in prepubertal Holstein heifers on estimates of mammary development and subsequent reproduction and milk production. *J Dairy Sci.* 1999; 82(8):1753-64.

**Martinez JFJ, Parra BGM, Sifuentes RAM, Gonzales JCM, Gondro C, Perez CAG, Bustamante LAL.** Genomewide association analysis of growth traits in Şarole beef cattle. *J. Anim Sci.* 2016, 94: 4570-4582.

**Marston TT, Lusby KS, Wettemann RP.** Effects of postweaning diet on age and weight at puberty and milk production of heifers. *J Anim Sci.* 1995; 73:63-68.

**Nabasirye M, Mugisha JYT, Tibayungwa F, Kyarisiima CC.** Optimization of input in animal production: a linear programming approach to the ration formulation problem. *Int J Agric Sci.* 2011; 1(7):221-226.

**National Research Council (NRC).** Nutrient requirements of dairy cattle. 7<sup>th</sup> rev. ed., National Academy Press, Washington, DC, USA; 2001.

**Occhio MJD, Baruselli PS, Campanile G.** Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: a review. *Theriogenology.* 2018; 125: 277-284.

**Parker R.** Using body condition scoring in dairy herd management. Factsheet 94-053, Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Canada. 1996; 28-35

**Roche JR, Macdonald KA, Burke CR, Lee J M, Berry DP.** Associations among body condition score, body weight, and reproductive performance in seasonal-calving dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2007; 90(1):376-391.

**Şahin K, Gül A, Koç B, Dağistan E.** Adana ilinde entansif süt sığırcılığı üretim ekonomisi. *YYU J Agr Sci.* 2001; 11(2): 19-28.

**Şahman MA.** Karma yemlerin genetik algoritmayla maliyet optimizasyonu. Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2008.

**Türk G.** Aksaray Koçuş Tarım İşletmesinde yetiştirilen holştayn düve ve ineklerde tohumlama yaşı ile gebelik oranı arasındaki ilişki. *FÜ Sağ Bil Vet. Derg.* 2010; 24 (3):143-147.

**Wathes D C.** Mechanisms linking metabolic status and disease with reproductive outcome in the dairy cow. *Reprod Domest Anim.* 2012; 47:304-312.

**Zanton G, Heinrichs J.** Precision feeding dairy heifers: Strategies and recommendations. College of Agricultural

Sciences, DAS, 2008;18-22. Erişim: <http://www.das.psu.edu/researchextension/dairy/nutrition/dairy-cattle-nutrition>. Erişim tarihi: 05.01.2019

**Zwald A, Kohlman TL, Gunderson SL, Hoffman PC, Kriegl T.** Economic costs and labor efficiencies associated with raising dairy herd replacements on Wisconsin dairy farms and custom heifer raising operations. PhD thesis, University of Wisconsin-Extension, Madison, WI, USA. 2007.

## The Comparison of Milking Hygiene with Bulk Tank Somatic Cell Count and Total Bacterial Count in Dairy Herds in Tekirdag Province

Sıla TOSUN<sup>1</sup>, Duygu BAKİ ACAR<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynaecology, 03200, Afyonkarahisar, Turkey

### ABSTRACT

The investigation of mammary health and milking hygiene procedures, bulk tank milk somatic cell count (SCC) and total bacterial counts, and detecting deficiencies and mistakes following the comparisons of results in Tekirdag province were aimed. The bulk tank milk samples were collected from 50 family farms. 150 mL of sterile milk samples were taken from milk tanks. Somatic cell counts and total viable bacterial counts were analyzed. On the milk sampling day, a questionnaire was filled out to farm personal or owner to evaluate mastitis control programs applied in the farms. In the bulk tank milk samples, mean SCC was found 560204.08 ( $\pm 12399.769$ ) cells/mL, and mean total viable bacterial count were found 1,796,718.36 ( $\pm 156,573.31$ ) CFU/mL. After survey and laboratory analyzes, it was detected that premilking cleaning and drying, teat-dipping, strip before milking, dry-cow management and mastitis control program procedures were using hardly ever. In conclusion, SCC and total bacterial count were higher than acceptable values due to the insufficient practice of mastitis control programs in the small and middle family farms in Tekirdag province. It was considered that some education seminars and/or contact meetings about this issue should be planned to increase mammary health status and milk quality.

**Keywords:** Cow, bulk tank milk, somatic cell count, total bacterial count, mastitis control programs

\*\*\*

### Tekirdağ İlinde Bulunan Süt Sığırçılığı İşletmelerinde Sağım Hijyeni Uygulamaları ile Tank Sütü Somatik Hücre ve Toplam Bakteri Sayılarının Karşılaştırılması

#### ÖZ

Sunulan çalışma ile Tekirdağ ilindeki aile tipi süt işletmelerinde meme sağlığı ve sağım hijyeni uygulamalarının incelenmesi, işletmelerden alınan tank sütü örneklerinde somatik hücre sayısı (SHS) ve toplam bakteri sayısı sonuçlarının değerlendirilmesi, elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve eksikliklerin ortaya konulması amaçlandı. Tekirdağ ilinin farklı bölgelerinde bulunan 50 farklı işletme ve çığ süt toplama merkezi seçilerek, 150 mL'lik steril kaplara süt örnekleri alındı. Süt örneklerinde SHS ve toplam canlı bakteri sayısı ölçüldü. Tank sütü örneklerinin alındığı gün aynı işletmelerin çalışanlarına ya da işletme sahiplerine anket uygulaması yapılarak işletmede uygulanan mastitis kontrol programlarına ait bilgiler değerlendirildi. Alınan tank sütü örneklerinde SHS ortalaması 560.204,08 ( $\pm 12.399,769$ ) hücre/mL, toplam canlı bakteri sayısı ortalama 1.796.718,36 ( $\pm 156.573,31$ ) kob/mL olarak tespit edildi. Yapılan anket ve laboratuvar analizleri sonrası işletmelerde sağım öncesi meme başlarının yıkanması, kurulanması, *teat dipping*, ön sağım ve ön sütün kontrolü, kuru dönem idaresi ve meme sağlığı kontrollerinin neredeyse hiç uygulanmadığı görüldü. Sonuç olarak, Tekirdağ ilinde bulunan aile tipi sütçü işletmelerde tank sütü SHS ve toplam canlı bakteri sayısının kabul edilebilir değerlerin üzerinde olduğu, bunun sebebinin işletmelerde uygulanmayan veya dikkat edilmeyen meme sağlığı kontrol programları olabileceği kanısına varıldı. Bu bölgedeki sütçü işletmelere meme sağlığını üst seviyelerde tutmak ve süt kalitesini en iyi düzeye getirebilmek amacıyla bu konuda yoğun eğitim seminerleri ve/veya bilgilendirme toplantılarının yapılmasının uygun olacağı kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** İnek, tank sütü, somatik hücre sayısı, toplam bakteri sayısı, mastitis kontrol programları

To cite this article: Tosun S. Baki Acar D. The Comparison of Milking Hygiene with Bulk Tank Somatic Cell Count and Total Bacterial Count in Dairy Herds in Tekirdag Province. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):292-299.

Submission: 25.06.2019 Accepted: 26.07.2019 Published Online: 25.08.2019

ORCID ID; ST: 0000-0002-7449-175X, DBA: 0000-0002-6884-2621

\*Corresponding author e-mail: dbakiacar@aku.edu.tr

## GİRİŞ

Süt ineği işletmelerinde sıkça rastlanan mastitis, ciddi ekonomik kayıplara yol açan, süt kalitesini düşüren ve meme bezlerinin bakteriyel, kimyasal, travmatik veya termal hasarlara karşı verdiği yangısal tepkiler olarak tanımlanmaktadır. Tedavi maliyeti oldukça yüksek olan mastitis, süt ve süt ürünlerinin kalitesini ve saklama süresini olumsuz etkileyen istenmeyen bir hastalıktır (Baştan 2010, Vural ve ark. 2016). Oluşan yangının derecesine göre mastitisler subklinik ve klinik mastitis olarak sınıflandırılmaktadır. Subklinik formda meme yangısı klinik belirtiyeye yol açmamakta, meme dokusunda ve sütte gözle görülebilen bir değişiklik olmamaktadır. Hastalık inekler arasında kolayca bulaşma göstermekte ve bu tip meme yangıları sütçü işletmelerde maddi kayıplara sebep olan büyük problemler ortaya çıkartmaktadır. Klinik form ise gözle görülebilen semptomlara neden olarak hasta memede az veya çok şişlik, ağrı, sıcaklık artışı ve renk değişikliğine yol açmaktadır. Süt veriminde azalma hatta bazen tamamen kesilme; sütte sulanma veya pıhtılaşma gibi bozukluklar ortaya çıkabilmektedir (Blowey ve Edmondson 2010).

Somatik hücreler, vücudun doğal savunma sistemini oluşturan hücrelerdendir ve sağlıklı memeden alınan süt içeriğinde 200.000 hücre/mL'nin altında bulunmaktadır. Tank sütünden alınan örneklerde kabul edilebilir SHS ise 400.000 hücre/mL'nin altındaki değerlerdir. Sütte bulunan somatik hücre sayısındaki değişimler, savunma sistemini uyarıcı ya da meme içi enfeksiyon olgusuna neden olan yangısal tepkinin bir sonucu olarak meydana gelmektedir. Sütteki somatik hücre sayısında görülen artışlar ile yangının derecesi arasında pozitif korelasyon mevcuttur (Küplülü ve Vural 2016). Sürü sağlığı programlarında kritik nokta, mastitisin mümkün olduğunca hızlı belirlenmesi ve soruna yönelik strateji geliştirilmesidir. Sürüde mastitis varlığının belirlenmesinde kullanılan en önemli yöntemlerden birisi SHS'nin tespitidir. Bunun yanında, tank sütünden alınan örneklerde bakteri sayısının belirlenmesi de meme sağlığının durumu ve süt kalitesinin ortaya konulmasında güvenilir belirteçlerdendir. Aseptik koşullarda sağlıklı hayvanlardan sağılan sütün toplam bakteri sayısı düşüktür ve patojen bakteri içermemektedir. Çiğ süt örneklerinden steril şartlarda alınan numunelerde 1000 kob/mL'nin altındaki değerler çok iyi olarak tanımlanırken, 100.000 kob/mL'nin altındaki değerler kaliteli ve içilebilir olarak sınıflandırılmaktadır (Boor ve ark. 1998).

Meme enfeksiyonu olan bir ineği tedavi etmek, o ineği mastitise karşı korumaktan daha maliyetlidir. Bu sebeple işletmelerdeki tüm inekleri koruma altına alabilen ve "Mastitis Kontrol Programı" olarak adlandırılan bir program uygulanmalıdır. Farklı ülkelerde meme sağlığının korunması amacıyla

kullanılan bu programların uygulanması sonucunda işletmede düşük mastitis görülme oranı, süt kaybında azalma, iş gücü ihtiyacında azalma ve tedavi giderlerinin minimuma düşürülmesi gibi olumlu sonuçlar bildirilmektedir (Honkanen-Buzalski ve Pyörala 1995, Gleeson ve ark. 2009, Blowey ve Edmondson 2010, Peterson-Wolfe ve ark. 2013, Vural ve ark. 2016). Hayvancılık yönünden gelişmiş ülkelerde mastitis sorununun ortadan kaldırılması amacıyla Ulusal Mastitis Konseyleri kurulmuştur ve Ulusal Mastitis Kontrol Programları ile mastitisler önlenmeye çalışılmaktadır (Baştan 2010, Vural ve ark. 2016). Sütçü inek işletmelerinde mastitis kontrol programlarındaki 3 ana hedef 1) Mevcut enfeksiyonların eliminasyonu, 2) Yeni enfeksiyonlardan korunma, 3) Memenin sürekli mastitis açısından izlenmesi olarak belirtilmektedir. Meme sağlığı kontrol programı ile sürüde bulunan tüm ineklerin aynı anda koruma altına alınabilmesi sağlanabilmektedir. Meme sağlığı kontrol programlarının uzun süre uygulandığı sürülerde ise meme enfeksiyonlarından korunmanın %80-90 oranında başarı sağladığı görülmüştür (Pettersson- Wolfe ve ark. 2013).

Sunulan çalışma ile Tekirdağ ilindeki aile tipi süt işletmelerinde uygulanan meme sağlığı ve sağım hijyeni uygulamalarının incelenmesi, işletmelerden alınan tank sütü örneklerinde SHS ve toplam bakteri sayısı sonuçları değerlendirilmesi, elde edilen sonuçların karşılaştırılarak ortaya çıkan eksiklik ve hataların ortaya konulması amaçlandı.

## MATERYAL ve METOT

### Süt Örneklerinin Alınması

Çalışmada kullanılan tank sütü örnekleri Tekirdağ ilinde bulunan aile tipi süt işletmelerinden elde edildi. Tekirdağ ilinin farklı bölgelerinde bulunan 50 farklı işletme ve çiğ süt toplama merkezi seçilerek otomatik karıştırıcı ile sürekli karıştırılan içi soğutulmuş süt dolu tanklardan 150 mL'lik steril kaplarla steril bir şekilde süt örnekleri alındı. Alınan bu örnekler uygun saklama koşullarında depolanarak (4°C'de muhafaza edilerek) 6 saat içerisinde laboratuvara ulaştırıldı.

### Tank Sütü Örneklerinde Somatik Hücre ve Toplam Bakteri Sayılarının Analizi

Alınan süt örneklerinde SHS ve toplam bakteri sayısının analizi Tekirdağ Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü Laboratuvarında Bentley FTS/FCM Combi 400 isimli cihaz kullanılarak yapılmıştır.

### İşletmelere Uygulanan Anket Bilgileri

Tank sütü örneklerinin alındığı gün aynı işletmelerin çalışanlarına, işletme sahiplerine ya da süt toplama tankına süt döken işletmelerden seçilenlere anket uygulaması yapılarak, işletmede uygulanan mastitis kontrol programlarına ait uygulamalar değerlendirildi. Bu amaçla, yalnızca bu çalışma için orijinal anket



soruları hazırlandı. Hazırlanan sorular açık uçlu sorular şeklinde planlandı.

Anketin ilk bölümünde işletme adı, adresi, çalışan personel sayısı (varsa) ve işletme türü gibi işletmeye ait genel bilgiler soruldu. İkinci bölümde, sürüdeki hayvan sayısı, sürüdeki sağmal inek/düve sayısı, günlük süt üretim miktarı, inek başına ortalama günlük süt üretim miktarı gibi işletmede bulunan hayvanlarla ilgili bilgiler toplandı. Üçüncü bölümde ise sağım sıklığı, sağım tipi (otomatik/yarı otomatik/manuel), özel sağımhane bölümünün olup olmadığı, sağım sisteminin bakım sıklığı, sağım sisteminin temizlik rutini, ahırda kullanılan altlık tipi, dışardan hayvan girişinin olup olmadığı, ahıra ne sıklıkta hayvan girişi olduğu, antibiyotik kalıntısı nedeniyle süt iadesi/alınmaması durumunun varlığı, kuruya çıkarılırken ineklere kuru dönem antibiyotik uygulamasının yapıp yapılmadığı, sağım öncesi meme başlarının yıkanması ve kurulanması ile ilgili uygulamalar, sağım öncesi ön süt kontrolünün yapıp yapılmadığı, sağım öncesi ve sonrası teat dipping uygulama rutini, sağım sürecinde tek kullanımlık eldiven giyilip giyilmediği, her bir inek için ortalama sağım süresi, sağım yapan kişi (sahibi/aile fertleri/sağım personeli) ve düzenli mastitis kontrolü varlığı gibi meme sağlığı kontrol programları ile ilişkili ve direkt etkileyebilecek konular hakkında bilgiler alındı.

### İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada verilerin analizi Microsoft Excel ve Windows SPSS 20.0 Paket Programı (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ile yapıldı. Bu amaçla öncelikle nitel değişkenlerin frekans ve yüzde dağılımları alındı. Nicel değişkenler için ortalama, standart sapma (S.S.), minimum ve maksimum değerleri alındı. Değişkenler arasındaki ilişkilerde, nicel değişkenler arasındaki ilişkiler için korelasyon, nitel ve nicel değişkenler arasındaki ilişkilerde iki grup için bağımsız örneklemeler için t testi kullanıldı.

## BULGULAR

### Tank Sütü Somatik Hücre Sayısı

Tekirdağ ilinde bulunan 50 adet sütçü işletmeden alınan tank sütü örneklerinde SHS ortalaması  $560.204,08 \pm 12.399,769$  hücre/mL olarak belirlendi. Tank sütü SHS'nin minimum 535.000 hücre/mL ve maksimum 596.000 hücre/mL düzeylerinde olduğu görüldü (Tablo 1).

### Tank Sütü Toplam Bakteri Sayısı

Steril şartlarda ve steril örnek kaplarına alınan tank sütlerinde toplam bakteri sayısı ortalama  $1.796.718,36 \pm 156.573,31$  kob/mL olarak tespit edildi. Toplam bakteri sayısının minimum 1.577.000 kob/mL, maksimum ise 2.138.000 kob/mL olduğu belirlendi (Tablo1).

### İşletmelere Uygulanan Anket Sonuçları

Çalışma materyallerinin alındığı işletmelerin tamamı, hayvan sayıları 1 ile 369 arasında değişen (ortalama 38,86 hayvan) aile tipi işletmelerden oluşmaktadır. Ticari işletmelerden de örnek alınmak istenmesine rağmen, bu işletmelerde genel kural olarak personel dışı giriş-çıkış ve örnek alınmasının yasak olması nedeniyle örnek alınması mümkün olmadı. İşletmelerde sağmal inek sayısı ortalama 19,74 (min:1 inek; max:200 inek) olarak belirlenirken, günlük süt üretim miktarı ortalama 347,24 litre (min:22 litre; max:3.000 litre) ve inek başına ortalama günlük süt üretim miktarı 23,20 litre (min:19; max:25 litre) olarak tespit edildi (Tablo1).

İşletmelerde çalışan personel sayısı sorusuna verilen yanıtlar değerlendirildiğinde, 50 işletmenin 43'ünde herhangi bir personel çalışmadığı ve tüm işlemlerin aile fertleri tarafından gerçekleştirildiği, 7 işletmede ise yalnızca 1 adet personel çalıştığı öğrenildi. İşletmelerin tamamında sabah-akşam olmak üzere günde 2 kez sağım yapıldığı; 41 adet işletmede yarı otomatik sistem ve 9 adet işletmede otomatik sağım sistemlerinin kullanıldığı; yalnızca 10 adet işletmede özel sağımhane bölümünün bulunduğu ve diğer 40 işletmede herhangi bir sağımhane bölümünün olmadığı belirlendi (Tablo 2).

Sağım sisteminin bakım sıklığının ortalama 6,66 ayda bir kez (min:1 ay, max:12 ay) olduğu ve sağım sisteminin temizlik rutininin 26,4 günde bir kez (min:1 gün, max: 42 gün arayla) gerçekleştirildiği tespit edildi. Ahırda kullanılan altık tipi olarak en sık saman tercih edildiği, az miktarda talaş tercihi olduğu ve meraya çıkarmanın da uygulandığı görüldü. İşletmeye dışarıdan hayvan girişinin neredeyse hiç olmadığı, yalnızca 2 işletme sahibinin dışarıdan 1-2 yılda bir kez hayvan aldığı ve geri kalan işletmelerde sürekli kendi buzağlarının yetiştirildiği tespit edildi. Sağılan sütlerde antibiyotik kalıntısı nedeniyle sütün iadesi/alınmaması gibi bir sorunla karşılaştınız mı sorusuna tüm işletmeciler tarafından "Hayır" yanıtı verildi. Bununla birlikte, ineklerin kuruya çıkartılması sırasında işletmelerin hiçbirinde meme içi kuru dönem antibiyotik uygulaması yapılmadığı belirlendi. Sağım sürecinde uygulanması gereken meme sağlığı kontrol programları ile ilgili anket soruları da değerlendirildi. Buna göre, sağım öncesi meme başlarının yıkanması işlemini yalnız 12 işletmenin rutin olarak uyguladığı ve bu işletmelerden de sadece birinin yıkama sonrası meme başlarının kurulanmasına dikkat ettiği, diğer işletmelerde meme başlarının yıkama sonrası kurulanmadan direkt sağım başlıklarının takıldığı tespit edildi. Ayrıca kurulama işlemini yaptığını söyleyen işletme görevlisinin, her inek için ayrı bir kurulama bezi ya da kağıt havlu kullanmadığı ve ineklerin tamamının meme başlarının aynı bez ile kurulandığı belirlendi. Sağım işlemi sırasında sağımı yapan kişilerin hiçbir şekilde tek kullanımlık eldiven giymediği, sağım öncesi ve sağım sonrası *teat dipping*

işleminin işletmelerin hiçbirinde uygulanmadığı ve sağım öncesinde ön sütün sağılarak kontrol edilmesi işlemini yalnızca bir işletmenin gerçekleştirdiği ortaya konuldu. Ayrıca 43 işletmede sağımın işletme sahibi veya aile bireyleri tarafından gerçekleştirildiği, 7 işletmede sağım personelinin sağımla ilgilendiği görüldü. İşletmelerden birinde günlük rutin kontrol şeklinde mastitis kontrolünün yapıldığı bildirilirken, geri kalan işletmelerde düzenli aralıklarla mastitis kontrolü yapılmadığı ve hastalık ortaya çıkması durumunda kontrollerin yapıldığı belirlendi (Tablo 2). Her bir inek için sağım süresinin kaç dakika sürdüğü sorusuna verilen cevaplarda ortalama sürenin 7,98 dakika olduğu ve 3 dakika ile 9 dakika arasında değiştiği sonucuna ulaşıldı (Tablo 1).

## İşletme Özellikleri, Mastitis Kontrol Programlarının Uygulanma Aışkanlıkları, SHS ve Toplam Bakteri Sayısı Arasındaki Korelasyon Bulguları

İşletmelerden alınan anket sonuçları ile tank sütü SHS ve toplam bakteri sayıları arasındaki korelasyonlar değerlendirildi (Tablo 3). Buna göre, inek başına ortalama günlük süt üretim miktarı ile SHS arasında pozitif bir korelasyon bulunurken, sağım sisteminin bakım sıklığı ve her bir inek için ortalama sağım süresi ile SHS arasında negatif bir korelasyon olduğu tespit edildi ( $p<0,05$ ). Sağım sisteminin bakım sıklığı ve ortalama sağım süresi ile toplam bakteri sayısı arasında da, SHS’de olduğu gibi negatif korelasyon belirlendi ( $p<0,05$ ). İşletmedeki hayvan sayısı ve sağmal inek sayısı ile bakım sıklığı arasında negatif korelasyon orta derecede önemli bulunurken ( $p<0,05$ ), yine hayvan sayısı ve sağmal inek sayısı ile ortalama sağım süresi arasında yüksek derecede önemli korelasyon belirlendi ( $p<0,01$ ).

**Tablo 1.** Nicel değişkenlere ilişkin bulgular (n=50)

**Table 1.** Results of quantitative variables (n=50)

Değişkenler	Min	Max	Ortalama±S.S.	Birim
SHS	535.000	596.000	560.204±12.399,769	Hücre/mL
Toplam bakteri sayısı	1.577.000	2.138.000	1.796.718,36±156.573,31	Kob/mL
Hayvan sayısı	1	360	38,86±58,22	Adet
Sağmal inek sayısı	1	200	19,74±30,83	Adet
Günlük süt üretim miktarı	22	3000	347,24±520,07	Litre
İnek başına ort. Günlük süt üretim miktarı	19	25	23,20±1,76	Litre
Ortalama sağım süresi	3	10	7,98±2,42	Dakika

**Tablo 2.** Nitel (Kategorik) değişkenlere ilişkin bulgular

**Table 2.** Results of qualitative variables

Değişkenler		Frekans (f)	%
İşletme Türü	Aile Tipi İşletme	50	100
	Ticari Tip İşletme	-	-
Personel Varlığı	Var	43	86,0
	Yok	7	14,0
Sağım Sıklığı	2 Sağım	50	100
	3 Sağım	-	-
Sağım Tipi	Yarı Otomatik	41	82,0
	Otomatik	9	18,0
Sağımhane Bölümü	Var	10	20
	Yok	40	80,0
İşletmeye Hayvan Girişi	Yok	48	96,0
	Yılda Bir Kez	1	2,0
	İki Yılda Bir Kez	1	2,0
Antibiyotik Kalıntısı Nedeniyle Süt İadesi	Var	-	-
	Yok	50	100
Kuru Dönem Antibiyotik Uygulaması	Var	-	-
	Yok	50	100
Sağım Öncesi Meme Başlarının Yıkınması	Var	12	24,0
	Yok	38	76
Meme Başlarının Kurulanması	Var	1	2,0
	Yok	49	98,0
Sağım Yapan Kişi	Sağım Personeli	7	14,0
	Aile Fertleri	43	86,0
Düzenli Mastitis Kontrolü	Var	1	2,0
	Yok	49	98,0

**Tablo 3.** İşletme Özellikleri, Mastitis Kontrol Programlarının Uygulanma Alışkanlıkları, SHS ve Toplam Bakteri Sayısı Arasındaki Korelasyon Bulguları

**Table 3.** Significant correlation coefficients ( $r^a$ ) of the operation characteristics, mastitis control programs routines, SCC and Total bacterial counts

	SHS	Total Canlı Bakteri Sayısı	Hayvan Sayısı	Sağmal İnek Sayısı	Toplam Günlük Süt Üretimi	İnek Başına Günlük Süt Üretimi	Sağım Sisteminin Bakım Sıklığı	Sağım Sisteminin Temizlik Rutini	Sağım Süresi
SHS	-	0,007	0,128	0,137	0,114	<b>0,289*</b>	-0,138	0,115	-0,094
Total Canlı Bakteri Sayısı	0,007	-	0,035	0,036	0,020	-0,162	<b>-0,254*</b>	-0,080	<b>-0,279*</b>
Hayvan Sayısı	,128	0,035	-	<b>0,986**</b>	<b>0,953**</b>	<b>0,281*</b>	<b>-0,251*</b>	0,061	<b>-0,645**</b>
Sağmal İnek Sayısı	0,137	0,036	<b>0,986**</b>	-	<b>0,960**</b>	<b>0,290*</b>	<b>-0,285*</b>	0,060	<b>-0,623**</b>
Toplam Günlük Süt Üretimi	0,114	0,020	<b>0,953**</b>	<b>0,960**</b>	-	<b>0,338**</b>	-0,234	0,057	<b>-0,666**</b>
İnek Başına Günlük Süt Üretimi	<b>0,289*</b>	-0,162	<b>0,281*</b>	<b>0,290*</b>	<b>0,338**</b>	-	-0,098	0,140	<b>-0,346**</b>
Sağım Sisteminin Bakım Sıklığı	-0,138	<b>-0,244*</b>	<b>-0,251*</b>	<b>-0,285*</b>	-0,234	-0,098	-	<b>0,258*</b>	<b>0,345**</b>
Sağım Sisteminin Temizlik Rutini	0,115	-0,080	0,061	0,060	0,057	0,140	<b>0,258*</b>	-	-0,133
Sağım Süresi	-0,094	<b>-0,279*</b>	<b>-0,645**</b>	<b>-0,623**</b>	<b>-0,666**</b>	<b>-0,346**</b>	<b>0,345**</b>	-0,133	-

\*p<0,05; \*\*p<0,01

## TARTIŞMA

İnsanların dengeli vücut gelişiminin sağlanabilmesi ve sağlıklı kalmanın sürdürülebilmesi için en gerekli besin maddeleri hayvansal proteinlerdir. Hayvansal protein kaynakları arasında en sık tüketilenler ise et, süt ve yumurtadır. Tüm dünyada artan hayvansal gıda ihtiyacının karşılanabilmesi için hayvancılıkla ilgili yoğun araştırmalar yapılmakta, hem hayvan sayısının artırılması hem de elde edilecek hayvansal ürünlerin etkin ve yüksek oranda sağlanabilmesi için çaba harcanmaktadır (Akman ve ark. 2010, Elmadfa ve Meyer 2017). İnsanlar tarafından tüketilen hayvansal gıdalar arasında büyük oranda sığır eti ve inek sütü bulunmaktadır. Dünya üzerindeki büyükbaş hayvan sayısına bakıldığında, 2016 yılı Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre 1.674.168.000 baş büyükbaş hayvan olduğu ve bu hayvanlardan elde edilen süt üretiminin ise 659.150.049 ton olduğu bilinmektedir. Ülkemizdeki süt sığırcılığının mevcut durumu incelendiğinde 2018 yılı saf kültür, kültür melezi ve yerli ırk süt sığırı (inek ve düve) toplam sayısının 9.682.621 adet olduğu ve süt ürünleri üretiminin hayvan sayısı artışıyla doğru olarak her geçen yıl arttığı bildirilmektedir (TÜİK 2019).

Sütçü işletmelerde bulunan hayvan sayılarına göre işletme büyüklükleri belirlenmektedir. Avrupa Birliği'nde yer alan ülkelerde, 2005 yılı verilerine göre tüm işletmeler arasında 50 ve daha fazla sayıda inek bulunan işletmelerin oranı %10'dan daha az sayıdadır ve bu ülkeler arasında İngiltere, Hollanda, Danimarka ve Çekoslovakya yer almaktadır. Genel ortalama

değerlendirildiğinde ise Avrupa Birliği ülkelerinde işletmelerde bulunan ortalama inek sayısı 8,9'dur. Türkiye'de de benzer bir durum söz konusudur, hayvancılık işletmelerinin büyük çoğunluğu küçük/orta ölçekli aile işletmeleridir ve bu işletmelerde bulunan ortalama inek sayısı 4 baş civarındadır (Akman ve ark. 2010). Sunulan çalışmada Tekirdağ ilinden süt örneği alınan işletmelerin %72'si 50 baştan daha az inek sayısına sahip küçük ve orta ölçekli aile işletmeleridir ve il genelinde bulunan süt işletmelerinin genel dağılımı da benzer özellik göstermektedir.

Kaliteli süt denildiğinde akla düşük somatik hücre ve bakteri sayısına sahip, antibiyotik kalıntısı bulunmayan, katkısız süt gelmektedir. Somatik hücre sayısı ise çiğ sütün kalitesinin ve meme sağlığı durumunun değerlendirilmesinde en etkili ve sık kullanılan parametredir (Akers 2002, Wustenberg 2009). Bireysel SHS'nın 250.000 hücre/mL düzeyinden yüksek olması inekte meme içi enfeksiyon varlığı ihtimalini akla getirirken, tank sütünde ölçülen SHS'nın 400.000 hücre/mL'den yüksek olması halinde o işletmede meme sağlığı sorunlarının olduğu ve sağmal ineklerin bu konuda kontrol edilerek gerekli önlemlerin alınması gerektiği düşünülmelidir. Bununla birlikte meme sağlığı ve süt kalitesi değerlendirmesinde tank sütü SHS düzeylerinin geçmişten günümüze ülkeler arasında değişiklik gösterdiği; ABD'nde <750.000 hücre/mL, Kanada'da <500.000 hücre/mL ve Avrupa Birliğinde <400.000 hücre/mL ideal düzeyler olarak sayılırken, son yıllarda bu değerler daha da aşağı çekilerek 200.000 hücre/mL'nin altında bulunan SHS'nın halk sağlığı ve

süt ürünlerinin kalitesi açısından daha doğru olacağı bildirilmektedir (Baştan 2010, Vural ve ark. 2016). Çalışmamızda tank sütü örneklerinin SHS değerleri ortalama 560.204,08 hücre/mL olarak saptanmıştır ve bu düzey olması gereken değerin oldukça üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Tank sütü kalitesi hakkında gerçekleştirilen araştırmalarda farklı ülkelere ait SHS sonuçları değerlendirildiğinde, ABD ve Avrupa ülkelerinde tank sütü SHS değerlerinin çoğunlukla 400.000 hücre/mL düzeyinin çok altında olduğu, daha eski yıllarda yapılan araştırmalarda bu değerin bir miktar üzerine çıkabilen sonuçlar (Hollanda, 422.000 hücre/mL) bildirildiği ancak zamanla işletme büyüklüklerinin artması, hijyen uygulamalarının rutin uygulama haline gelmesi gibi nedenlerle SHS değerinin 250.000 hücre/mL'nin altında tutulmasının başarıldığı görülmektedir (Barkema ve ark. 1998, Pantoja ve ark. 2009, Zucalli ve ark. 2011). Bununla birlikte Darbaz ve ark. (2018) tarafından Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde gerçekleştirilen bir çalışmada, araştırmamıza benzer olarak tank sütü SHS ortalama 521.583 hücre/mL düzeyinde belirlemişler ve çalışmamızda bildirdiğimiz gibi sağım hijyeni, meme sağlığı kontrolleri vb. idarecilik uygulamalarında tespit ettikleri eksikliğe bağlı olarak Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde SHS'nin yüksek seyrettiğini tespit etmişlerdir.

Çiğ süt kalitesinin bir diğer belirteci de sütteki toplam bakteri sayısıdır. Süt ve süt ürünleri insanlar için önemli bir hayvansal protein kaynağı olmakla birlikte, süt içinde bulunan patojen bakteri sayısı ve türü sağlık açısından önemli sorunlara yol açabilmektedir. Bu nedenle süt kalitesinin belirlenmesi amacıyla yapılması gereken bakteriyolojik testler Amerika Halk Sağlığı Birliği tarafından ortaya konulmuştur (Marshall 1992). Kaliteli ve içilebilir çiğ sütte toplam bakteri sayısının 100.000 kob/mL düzeyinin altında olması beklenmektedir. Bu standart değerin altında bakteri sayısına sahip sütlerin pastörizasyonu sırasında patojen bakteriler başarıyla yok edilmekte ve insan sağlığı üzerine zararı olmamaktadır (Boor ve Murphy 2002, Murphy ve ark. 2016). Sütteki toplam bakteri sayısı spesifik bakteri gruplarından (termodurik, psikrotrofik ve çevresel mastitis patojenleri) etkilenmekte ve bakteri sayısındaki artışla birlikte bakteriyel mikroflora kompozisyonunda çok fazla değişiklik olmaktadır. Ayrıca tank sütü toplam bakteri sayısı mevsim, kullanılan sağım sistemi, meme sağlığı kontrol programları uygulamaları, altlık tipi, meme başı temizliği gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Gelişmiş ülkelerde sütçü işletmelerin yeterliliği, kuruluş ve işleyiş şartları çok iyi düzeylere ulaştığından SHS seviyesinde olduğu gibi toplam bakteri sayısında da standartların oldukça altına inmişler ve 10.000 kob/ml'nin altındaki rakamlara ulaşmışlardır (Jones ve Sumner 1999, Jayaro ve ark. 2004, Zucalli ve ark. 2011). Sunulan çalışmada toplam canlı bakteri sayısı ortalama 1.796.718,36 kob/mL düzeyinde bulunurken, alınan örnekler arasında en düşük değer

1.577.000 kob/mL olarak saptandı ve bu değerlerin standart toplam canlı bakteri sayısının çok üzerinde olduğu görüldü. Çalışmada örnek alınan tank sütlerinde bakteri sayılarının bu kadar yüksek çıkmasının nedenleri arasında işletmelerin aile tipi işletme olması ve mastitis kontrol programları hakkında çok yetersiz bilgiye sahip olmaları ya da hiçbir fikirlerinin olmaması, ahır ve sağım şartlarının yetersizliği, akşam sağılan sütün süt toplama tankında bekletilerek ertesi sabah sağımda toplanan sütle birlikte teslim edilmesi ve bu arada tank sütünde mikrobiyolojik üremenin artması gibi faktörlerin etkili olabileceği kanısına varıldı.

Sütçü işletmelerde süt kalitesi, hayvan sağlığı, antibiyotik kalıntı problemi gibi insan ve hayvan sağlığı ile ekonomiyi direkt olarak etkileyen en önemli sorun mastitistir. Mastitisin neden olduğu yüksek SHS ve toplam bakteri sayısına bağlı olarak tüm dünyada çok ciddi ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır. Mastitis nedenli ekonomik kayıpların önüne geçmek amacıyla ABD, Hollanda ve Fransa gibi dünyada önemli süt üretimi yapılan ülkelerde "Ulusal Mastitis Kontrol Konseyleri" kurularak ülke çapında sorunun belirlenmesi, doğru tanının konulması, önleyici stratejilerin geliştirilmesi ve mastitise bağlı ekonomik kayıpların azaltılmasına yönelik büyük adımlar atılmıştır (NMC 1996, Barnouin ve ark. 2004, Jansen ve ark. 2010, Lam ve ark. 2013). Bu amaçla ahır ve çevrenin düzenlenmesi, sağım sürecinin doğru idaresi, sağım ekipmanlarının bakım ve temizliği, meme başlarının temizliği ve sağım öncesi/sonrası teat dipping uygulaması, memenin mastitis yönünden izlenmesi, kuru dönem yönetimi gibi kritik önlemler ve uygulamalar üzerinde durulmaktadır. Yapılan araştırmalar belirtilen bu önlemler ve uygulamaların gerçekleştirilmesi sonucu süt SHS ve toplam bakteri sayısında ciddi düşüş görüldüğünü, süt kalitesinde sürdürülebilir artış kaydedildiğini ve ekonomik kayıpların önemli oranda azaltıldığını ortaya koymaktadır (Barkema ve ark. 1998, Sharif ve ark. 2009, Bava ve ark. 2011). Ülkemizin farklı bölgelerinde gerçekleştirilen farklı çalışmalarda SHS ve toplam bakteri sayısı düzeyleri ile süt kalitelerinin hijyen, bakım, sağım ve sağım sistemine bağlı faktörler nedeniyle yeterli kalite düzeyine ulaşamadığı ve geliştirilmesi gereken noktalar olduğu bildirilmiştir (Önal ve Özder 2007, Patır ve ark. 2010, Koçyiğit ve ark. 2016). Sunulan çalışmada, yukarıda bildirilen çalışmalara paralel olarak anket soruları hazırlandı ve Tekirdağ ilinde bulunan sütçü işletmelerde mastitis kontrol programları hakkındaki bilgi düzeyleri, programın uygulanma düzeyi ve rutini, işletmeye, sağım sistemlerine ve sağım düzenine ilişkin bilgiler sorularak meme sağlığı düzeyi hakkında bilgi alındı.

Mastitis kontrol programları kapsamında ilk dikkate alınan başlık işletme ve ahırın mevcut durumunun değerlendirilmesidir. Araştırmalar göstermektedir ki büyük ölçekli ve endüstriyel tipte işletmelerde tank

sütü SHS ve toplam bakteri sayıları, küçük ve orta ölçekli aile işletmelerine oranla daha düşük seyretmektedir. Büyük işletmelerde hayvan sayısı arttıkça sistemde otomatikleşme tercih edilmekte, sağım personelinin eğitim düzeyi artmakta ve kontrol mekanizmaları daha ciddi işlemektedir. Aile tipi ve az sayıda inek bulunan işletmelerde ise hayvan sayısı az olduğu için elle ya da yarı otomatik sistemlerle sağım yapılmakta, geleneksel yöntemler ve bilgi düzeyi ile aile fertleri tarafından işler sürdürülmekte ve mastitis kontrolüne yönelik uygulamalara önem verilmemekte, sonuç olarak da mastitis görülme oranı artmakta ve tedavi başarısı düşmektedir (Jayaro ve ark. 2004, Jansen ve ark. 2010, Lam ve ark. 2013). Çalışmamızda süt örneği aldığımız işletmeler küçük ve orta ölçekli aile tipi işletmelerden oluşmaktadır. Bu işletmelerde ortalama hayvan sayısı 38 adet iken sağmal inek sayısı ortalama 19 idi ve büyük çoğunluğunda personelin bulunmadığı, tüm işlemlerin aile fertleri tarafından gerçekleştirildiği belirlendi. İşletmede bulunan kişilere uyguladığımız anket sonucunda, ilgili kişilerin ineklerde mastitisin önlenmesi amacıyla alınacak önlemler, düzeltmeler ve kontrol programları hakkında neredeyse hiç bilgisi olmadığı sonucuna ulaşıldı. Mevcut durum değerlendirildiğinde farklı araştırmacılar tarafından daha önce yapılmış çalışmaları destekler nitelikte, küçük ölçekli işletmelerde bilgi düzeyinin yetersizliğine bağlı uygulama hataları olduğu ve bunun sonucunda süt SHS ve toplam bakteri sayılarının kabul edilebilir değerlerin çok üzerinde seyrettiği belirlendi.

Sağım sistemi ve sağım süreci ineklerde mastitis oluşumunda direkt etkili faktörler arasındadır. Sağım sisteminin tipi, özel sağımhane bölümü, sağım sisteminin bakım sıklığı ve temizlik rutini, sağım öncesi meme başlarının yıkanıp kurulanması, sağım öncesi ve sonrası *teat dipping* uygulamaları gibi birçok parametre doğru olarak seçildiğinde ve yapıldığında meme sağlığı sorunları azalmakta, süt SHS ve bakteri sayısında ciddi düşüşler gözlenmektedir (Baştan, 2010). Sağım makinesinin otomatik tipte olması, elle sağım ve yarı otomatik tipe göre süt SHS'nın azalmasına ve meme sağlığının olumlu yönde gelişmesine neden olmaktadır. Ancak sağım sistemi ne tipte olursa olsun kontrol ve bakımlarının düzenli yapılmaması ve temizlik rutinlerine dikkat edilmemesi sistem içinde patojen mikroorganizmaların üremesine, vakum/pulzasyon oranlarındaki düzensizlikler gibi bozuklukların meme başı hasarlarına ve meme içi enfeksiyon oranında artışa yol açması kaçınılmazdır (Köker ve Erdem 2016). Sağım sırasında tek kullanımlık eldiven giyilmesi, sağımcı tarafından patojen etkenlerin taşınması ve bulaştırılmasını en aza indirmektedir. Sağım öncesinde meme başlarının yeterince temizlenmemesi ve gübreye bulaşık halde sağıma alınması fekal kontaminasyon riskini artırmakta ve süt kalitesini olumsuz etkilemektedir; ayrıca sağım öncesi meme başlarının yıkanarak her inek için temiz bir bez veya kağıt havlu ile

kurulanması sütün indirilmesine de hazırlık imkanı vermektedir. Bu sırada ön sütün sağılarak muayenesinin yapılması ile hem klinik enfeksiyon kontrolünün yapılmasını sağlamakta hem de sütün indirilmesini uyarmaktadır. Meme başlarının temizliği ve önsütün muayenesi ile meme sağıma hazırlanırken hızlı hareket edilmeli ve sağım başlıkları yaklaşık 90 saniye içinde takılmalıdır. Oksitosin meme bezi üzerinde yaklaşık 8 dakika etkisini göstermektedir, bu nedenle sütün memeden tam olarak indirilebilmesi için bu sürelerin takibi önemlidir (Pantoja ve ark. 2009, Köker ve Erdem 2016). Mastitis kontrol programlarının önemli bir basamağı da sağım öncesi ve sonrası *teat dipping* uygulamasıdır. Çevresel ve kontagiyöz etkenlere bağlı mastitislerin önlenmesinde sprey formundan ziyade daldırma metodu ile sağım öncesi ve sonrası *teat dipping* uygulamalarının çok etkili olduğu belirtilmektedir (Chambers 2002, Jayaro ve ark. 2004). Sunulan çalışmada işletme sahiplerine ve sağım süreci ile ilgilenen kişilere yapılan ankette, yukarıda belirtilen kontrol programları parametreleri hakkında sorular soruldu. Anket bulguları değerlendirildiğinde, işletmelerin genelinde yarı otomatik sağım sisteminin kullanıldığı, ayrı bir sağımhane bölümünün olmadığı, sağım öncesi meme başlarının yıkanma ve kurulanma oranının çok düşük olduğu, sağım öncesi ve sonrası *teat dipping* uygulamasının ise hiç yapılmadığı görüldü. Bu nedenle Tekirdağ ilinde bulunan aile işletmelerinin meme sağlığı kontrol programları hakkındaki bilgi düzeylerinin çok düşük olduğu ya da bilseler dahi uygulama konusunda isteksiz oldukları belirlendi. Mevcut anket sonuçları ile tank sütü SHS ve toplam canlı bakteri sayısı sonuçlarının birbiri ile uyum gösterdiği, standart değerlerin çok üzerinde bulunan SHS ve toplam bakteri sayılarının ahır şartları, sağım hijyeni ve sağım sistemlerinin bakımsızlığı gibi nedenlere bağlı olarak, daha önce yapılan araştırmaları da destekler nitelikte (Chambers 2002, Jayaro ve ark. 2004, Pantoja ve ark. 2009, Baştan 2010, Küplülü ve Vural 2016) insan sağlığı ve süt kalitesi yönünden uygun olmadığı tespit edildi.

Sonuç olarak, Tekirdağ ilinde bulunan küçük ve orta ölçekli aile tipi sütçü işletmelerde meme sağlığı kontrol programları hakkındaki bilgi ve uygulama düzeylerinin yetersiz olduğu ve buna bağlı olarak SHS ve toplam bakteri sayısının standart değerlerin üzerinde seyrettiği belirlendi. Tekirdağ ilinde gerek Tarım ve Orman Bakanlığı'nın ilgili bölümlerince, gerekse bölge üniversitelerinin ilgili bölümlerinde görevli öğretim üyeleri ve bölge Veteriner Hekimler Odaları tarafından meme sağlığını üst seviyelerde tutmak ve süt kalitesini en iyi düzeye getirebilmek amacıyla bu konuda yoğun eğitim seminerleri ve/veya bilgilendirme toplantılarının yapılmasının uygun olacağı kanaatine varıldı.

## TEŞEKKÜR

*Bu çalışma ilk yazarın Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.*

*Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 18.SAG.BİL.27).*

## KAYNAKLAR

- Akers RM.** Lactation and The Mammary Gland, 1st Edition. Blackwell Publishing Company, Iowa, USA, 2002.
- Akman N, Tuncel E, Tüzemen N, Kumlu S, Özder M, UlutaşZ.** Türkiye Sığırcılık İşletmelerinin Yapısı ve Geleceğin Sığırcılık İşletmeleri. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, Bildiriler Kitabı 2, 11-15 Ocak 2010, Ankara, s: 651-665.
- Barkema HW, Schukken YH, Lam TJGM, Beiboer ML, Benedictus G, Brand A.** Management Practices Associated with Low, Medium, and High Somatic Cell Counts in Bulk Milk, J Dairy Sci, 1998; 81(7): 1917-1927.
- Barnouin J, Chassagne M, Bazin S, Boichard D.** Management Practices from Questionnaire Surveys in Herds with Very Low Somatic Cell Score Through a National Mastitis Program in France. J Dairy Sci. 2004; 87:3989-3999.
- Baştan A.** İneklerde Meme Sağlığı ve Sorunları. Kardelen Ofset Matbaacılık, Ankara, 2010.
- Bava L, Zucalli M, Sandrucci A, Brasca M, Vanoni L, Zanini L, Tamburini A.** Effect of cleaning procedure and hygienic condition of milking equipment on bacterial count of bulk tank milk. J Dairy Res. 2011; 78: 211-219.
- Blowey R, Edmondson P.** Mastitis Control in Dairy Herds 2nd Edition. CAB International, Oxfordshire, UK, 2010.
- Boor KJ, Brown DP, Murphy SC, Kozlowski SM, Bandler DK.** Microbiological and chemical quality of raw milk in New York State. J Dairy Sci. 1998; 81(6): 1743-1748.
- Chambers, JV.** The Microbiology of Raw Milk in Dairy Microbiology Handbook. 3rd ed. R. K. Robinson. John Wiley & Sons, Inc., New York. 2002; pp: 39-90.
- Darbaz İ, Baştan A, Salar S.** Investigation of udder health and milk quality parameters of dairy farms in Northern Cyprus. Part I: SCC and bacteriologic examination. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 2018; 65:145-154.
- Elmadfa I, Meyer AL.** Animal proteins as important contributors to a healthy human diet. Annu Rev Anim Biosci. 2017; 5:4.1-4.21.
- Gleeson D, O'Brien B, Flynn J, O'Callaghan E, Galli F.** Effect of pre-milking teat preparation procedures on the microbial count on teats prior to cluster application. Irish Vet J. 2009; 62: 461- 467.
- Honkanen-Buzalski T, Pyörlä S.** Monitoring and Management of Udder Health at the Farm. In: Sandholm M, Honkanen-Buzalski THY Kaartinen L, Pyörlä S. Eds. The Bovine Udder and Mastitis. University of Helsinki, Finland, 1995; pp: 332-3378.
- Jansen, Schaik V, Renes RJ, Lam TJGM.** The effect of a national mastitis control program on the attitudes, knowledge, and behavior of farmers in the Netherlands. J Dairy Sci. 2010; 93: 5737-5747.
- Jayaro BM, Pillai SR, Sawant AA, Wolfgang DR, Hedge NV.** Guidelines for Monitoring Bulk Tank Milk Somatic Cell and Bacterial Counts. J Dairy Sci. 2004; 87: 3561-3573.
- Jones GM, Sumner S.** Testing Bulk Tank Milk Samples. Publication No.404-405, Virginia Coop. Ext., Virginia Tech, Blacksburg, 1999.
- Koçyiğit R, Yılmaz O, Özenç E, Uçar M.** Effect of some risk factors on subclinical mastitis in dairy cows. Kocatepe Vet J. 2016; 9(3): 185-193.
- Köker A, Erdem H.** Sağım ve Sağım Makinelerinin Temel İlkeleri. In: Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları, Eds: Kaymaz M, Fındık M, Rışvanlı A, Köker A. Medipres Yayıncılık, Malatya. 2016; s: 101-146.
- Küplülü Ş, Vural R.** Büyük Ruminantlarda Meme Sağlığı Kontrol Programları. In: Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları. Eds: Kaymaz M, Fındık M, Rışvanlı A, Köker A. Medipres Yayıncılık, Malatya. 2016; s: 261-294.
- Lam TJGM, Van den Borne BHP, Jansen J, Huijps K, Van Veersen JCL, Van Schaik G, Hogeveen H.** Improving bovine udder health: A national mastitis control program in the Netherlands. J Dairy Sci. 2013; 96: 1301-1311.
- Marshall RT.** Standard Methods for Examination of Dairy Products. 16th ed. Am Publ Health Assoc Inc., Washington, DC. 1992.
- Murphy SC, Martin NH, Barbano DM, Wiedmann M.** Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? J Dairy Sci. 2016; 99:10128-10149.
- National Mastitis Council.** Current Concepts of Bovine Mastitis. Natl Mastitis Council Inc., Madison, WI. 1996; pp: 40-41.
- Önal AR, Özder M.** Trakya'da özel bir süt işleme tesisi tarafından değerlendirilen çiğ sütlerin somatik hücre sayısı ve bazı bileşenlerinin tespiti. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi. 2007; 4(2): 195-199.
- Pantoja JCF, Reinemann DJ, Ruegg PL.** Associations among milk quality indicators in raw bulk milk, J Dairy Sci. 2009; 92: 4978-4987.
- Patur B, Can ÖP, Gürses M.** Farklı illerden toplanan çiğ inek sütlerinde somatik hücre sayıları. F Ü Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi. 2010; 24(2): 87-91.
- Petersson-Wolfe CS, Tholen AR, Currin J, Leslie KE.** Practical methods for mastitis control. WCDS Adv Dairy Technol 2013; 25: 341-358.
- Sharif A, Muhammad G.** Mastitis control in dairy animals. Pakistan Vet J. 2009; 29: 145-148.
- TÜİK 2019.** Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). Erişim Adresi: <http://www.tuik.gov.tr/> Erişim Tarihi: 17.05.2019.
- Wustenberg M.** Diagnosing Bulk Tank Milk Bacteria Counts. Tillamook Country Creamery Assoc, NMC Annual Meeting, 2009. Erişim Adresi: [https://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/dynamiques/PDF\\_AN/Diagnosis/DiagnosisBTMBacteriaCount.pdf](https://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/dynamiques/PDF_AN/Diagnosis/DiagnosisBTMBacteriaCount.pdf).
- Vural R, Ergün Y, Özenç E.** Büyük Ruminantlarda Mastitis. In: Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları. Eds: Kaymaz M, Fındık M, Rışvanlı A, Köker A. Medipres Matbaacılık. 2016; s:149-259.
- Zucalli M, Bava L, Tamburini A, Brasca M, Vanoni L, Sandrucci A.** Effects of season, milking routine and cow cleanliness on bacterial and somatic cell counts of bulk tank milk, J Dairy Res. 2011; 78: 436-441.

## Research on Occurrence of Mites in Cheese Consumed in Mamak District of Ankara Province

Ayda KARADERE<sup>1</sup>, Bilge KARATEPE<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Niğde Ömer Halisdemir University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Biology Department, 51240, Niğde, Turkey

<sup>2</sup>Niğde Ömer Halisdemir University, Bor Vocational School, 51700, Bor/Niğde, Turkey

### ABSTRACT

In this study, species of mite was investigated in the cheese consumed in Mamak district of Ankara. 119 cheese samples (50 kashar cheese samples, 69 tulum cheese samples) were collected in Mamak district between September 2011 and February 2012. The results show that mites were detected in 1 (0.84%) out of 119 cheese samples analyzed. Eggs and adult stages of the *A. siro* were seen in the cheese samples (2 male, 5 female), whereas no larva and nymph stages were found. Monthly prevalence of mites was determined as between 0-1% in the cheese samples. A prevalence was only detected in November (5%), whereas, in the other months infestation was not found. This study is the first one to identify the prevalence of mites in the cheese of Mamak district of Ankara. Also, the rate of mites in the cheese examined was established as 0.84%.

**Keywords:** *Acarus siro*, cheese, kashar cheese, mite, tulum cheese

\*\*\*

### Ankara'nın Mamak İlçesinde Tüketime Sunulan Peynirlerde Akar Varlığının Araştırılması

### ÖZ

Bu çalışma, Ankara'nın Mamak ilçesinde tüketime sunulan peynirlerde akar varlığının ortaya konulması amacı ile yapılmıştır. Çalışmada kullanılmak amacıyla Eylül 2011 ve Şubat 2012 tarihleri arasında 119 adet (50 adet kaşar, 69 adet tulum) peynir çeşidi toplanmıştır. Çalışma sonucunda incelenen 119 adet peynir numunesinin 1 (%0.84) tanesinde *Acarus siro* varlığı tespit edilmiştir. Peynir örneklerinde *A. siro*'nun yumurta ve erişkin dönemlerine (2 erkek, 5 dişi) rastlanırken larva ve nimf dönemleri belirlenmemiştir. Akarların peynirlerdeki aylık prevalansı %0-1 arasında saptanmıştır. Aylara göre *A. siro* prevalansı Kasım ayında %5 olarak saptanmış buna karşılık çalışma yapılan diğer aylarda enfestasyon tespit edilememiştir. Ankara'nın Mamak ilçesindeki akar varlığı ilk kez bu çalışma ile belirlenmiş ve incelenen peynirlerde %0.84 oranında akar enfestasyonu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Akar, *Acarus siro*, kaşar, peynir, tulum

To cite this article: Karadere A, Karatepe B. Research on Occurrence of Mites in Cheese Consumed in Mamak District of Ankara Province. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):300-304

Submission: 28.05.2019 Accepted: 01.08.2019 Published Online: 25.08.2019

ORCID ID; AK: 0000-0003-3436-8009, BK: 0000-0001-5612-2697

\*Corresponding author e-mail: bkaratepe@ohu.edu.tr

## GİRİŞ

İnsanların yaşam kalitesini olumsuz etkileyen atopik dermatit, konjuktivit, alerjik rinit ve astım gibi birçok alerjen kaynaklı hastalığa sebep olan akarlar (mite) insan sağlığı açısından *Arachnida* sınıfının en önemli alt sınıfını oluşturmaktadır (Cevizci ve ark. 2010). *Arachnida* sınıfında bulunan akarların 45000'i aşkın türü bulunmakta ve bunların 100'e yakını depo gıdaları ve peynir gibi gıda maddelerini enfeste etmektedir (Melnik ve ark. 2010).

Akarlı peynirler ekonomik zarara neden olarak ciddi kayıplara sebep olabilirler. Akarlarla enfeste olan peynirlerin kabuk kısmında kalınlaşma, renk ve görünümünde bozukluklar dikkat çekmektedir. Bu parazitler peynirin dış yüzeyinde bulunan patojen mikroorganizmaları da peynirin iç kısmına taşımaktadırlar (Tiğın ve Özer 1971, Yaman ve ark. 2000).

Akar varlığını etkileyen kritik faktörlerin ortam nemi ve sıcaklığı olduğu bildirilmiştir. İdeal olarak 20-30°C sıcaklıkta ve %60-80 nemli ortamlarda yaşamaktadırlar (Akdemir ve Gürdal 2004). Avrupa ülkeleri başta olmak üzere dünyada özellikle nemli bölgelerde akarlar yaygın olarak rastlanmaktadır. Dünyada akar varlığı ile ilgili yapılan araştırmalarda; Herms ve James (1961) *Acarus siro*'nun tane ve peynir akarı olduğunu, vanilya ile uğraşan insanların kırmızı lekeler ile karakterize edilen vanilizm hastalığına yakalandıklarını bildirmiştir. Sánchez-Ramos ve Castañera (2007) peynirlerde *Acarus farris* ve *Tyrophagus neiswanderi* türlerini bulmuşlardır. Türkiye'de de peynir akarlarıyla ilgili yapılan çalışmalarda *Acarus siro* başta olmak üzere çeşitli akar türleri tespit edilmiştir (Tiğın ve Özer 1971, Yaman ve ark. 2000, Mimioğlu 1959, Oytun 1969, Çobanoğlu ve Toros 1988, Aygun ve ark. 2007, Umur 1995, Aygün ve ark. 2007, Karatepe ve ark. 2017).

Bu çalışmada Ankara'nın Mamak ilçesinde tüketime sunulan peynirlerde akar varlığının saptanması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Çalışma Alanı

İç Anadolu Bölgesinde yer alan Ankara'da karasal iklim görülmekte, kışlar soğuk ve kar yağışlı, yazlar ise sıcak ve kurak geçmektedir. Çalışmanın yapıldığı 6 ay boyunca Ankara iline ait meteorolojik bilgiler elde edilmiştir (Tablo 1). Peynir numunelerinin toplandığı Mamak ilçesi Ankara şehir merkezine 7 km uzaklıkta bulunmaktadır.

### Saha Çalışması

Bu çalışmanın materyalini, Ankara ilinin Mamak ilçesinden toplanan peynir örnekleri oluşturmuştur. Bu amaçla, Eylül 2011 ve Şubat 2012 ayları arasında

119 adet (50 adet kaşar, 69 adet tulum) peynir çeşidi toplanmıştır. Peynirlerin özellikle renk değişimine uğramış, kokuşmuş ve küflenmiş kısımları örnek alınmış ve tercih edilmiştir.

Bu çalışmada; Eylül ayında 19, Ekim ayında 20, Kasım ayında 20, Aralık ayında 20, Ocak ayında 20 ve Şubat ayında 20 adet peynir örneğinin akar varlığı yönünden incelenmesi yapılmıştır.

### Laboratuvar Çalışması

Poşetlenerek protokol numarası verilen peynir örnekleri laboratuvara getirilmiştir. Bu peynirlerin üst kısmından ve iç tarafından kazıntı halinde petri kabı içerisine bir miktar örnek alınmıştır.

Kazıntı halinde hazırlanan peynirler petri kabı içerisinde daha iyi inceleme yapılması açısından daha küçük parçalar haline getirilmiştir. Hazırlanan laktofenol çözeltisi (44 ml laktik asit, 44 gr kristal fenol, 88 ml gliserin, 88 ml distile su) ezilmiş peynirler üzerine dökülmüştür. Peynirlerin üzerine laktofenol döküldükten sonra 24 saat saydamlaşması için bekletilmiştir.

Fiziksel ve kimyasal işlemlerden geçmiş olan peynirler son olarak stereo-mikroskop ile incelenmiştir. Peynir örneklerinden alınan mevcut akarlar ince uçlu öze ile lam üzerine alınmış ve üzeri kanada balzamu (Carlo Erba, Code No. 321553) dökülerek sabitleştirilmiştir. Lam üzerine lamel kapatılmış ve elde edilen preparatlar stereo-mikroskop (Nikon, SMZ-745T) altında incelenerek akarların tür tayinleri (Lee ve Choi 1980) ve önemli kısımlarının ölçümleri yapılarak fotoğrafları çekilmiştir.

## BULGULAR

Ankara'nın Mamak ilçesinden Eylül 2011-Şubat 2012 tarihleri arasında 6 ay boyunca toplanan 119 peynir (50 adet kaşar, 69 adet tulum) numunesinden, yalnızca Kasım ayına ait 1 adet tulum peyniri örneğinde (%0.84) *Acarus siro*'nun yumurta ve erişkin dönemine rastlanmıştır (Şekil 1-2). İncelenen numunelerde *A. siro*'nun larva ve nimflerine rastlanmamıştır. Akarların peynirlerdeki aylık prevalansı %0-1 arasında saptanmıştır (Tablo 2).

Dişi *Acarus siro*'ların büyüklüğü ortalama 550x232µm olarak ölçülmüş ve erkeklerden daha büyük olup genellikle yumurta taşıdıkları görülmüştür. Genital açıklık erkek genital açıklığına göre daha uzun ve genital kıvrımla örtülü olarak üçüncü ile dördüncü çift ayaklar hizasında ve merkezde yer aldığı görülmüştür. Erkek akarların birinci çift ayak femurunda görülen mahmuz şeklindeki yapı dişi akarlarda bulunmamaktadır. Erkek akarların ortalama büyüklüğü 399x190µm olarak ölçülürken akar yumurtalarının ortalama büyüklükleri 84x54µm olarak ölçülmüştür (Tablo 3).





Şekil 1. *Acarus siro* (dişi)  
Figure 1. *Acarus siro* (female)



Şekil 2. *Acarus siro* (erkek)  
Figure 2. *Acarus siro* (male)

**Tablo 1.** Ankara ilinin 2011 Eylül -2012 Şubat ayları arası meteorolojik bilgileri

**Table 1.** Meteorological information of Ankara province between September 2011 and February 2012

AYLAR	Yağış Miktarı (mm)	Ortalama Sıcaklık (° C)	Ortalama Nispi Nem (%)	En Düşük Sıcaklık (° C)	En Yüksek Sıcaklık (° C)
Eylül 2011	0.6	20.1	42.4	7.6	30.8
Ekim 2011	62.4	10.9	65.1	0.2	25.8
Kasım 2011	10.9	3.3	70.3	-7.1	15.2
Aralık 2011	39.3	3.8	74.9	-6.8	16.0
Ocak 2012	93.3	-0.9	87.1	-11.3	12.2
Şubat 2012	47.7	-1.9	83.7	-15.9	10.1
<b>ORTALAMA</b>	<b>42.3</b>	<b>5.8</b>	<b>70.5</b>	<b>-5.5</b>	<b>18.3</b>

**Tablo 2.** Aylara göre toplanan peynir ve akar varlığı**Table 2.** The presence of collected cheese and mite according to months

Aylar	Muayene Edilen	Enfeste	Enfestasyon Oranı (%)
	Peynir Sayısı	Peynir Sayısı	
Eylül 2011	19	0	0
Ekim 2011	20	0	0
Kasım 2011	20	1	5
Aralık 2011	20	0	0
Ocak 2012	20	0	0
Şubat 2012	20	0	0
<b>TOPLAM</b>	<b>119</b>	<b>1</b>	<b>0.84</b>

**Tablo 3.** Tespit edilen erkek ve dişi akar ile yumurtaların büyüklüğü**Table 3.** Size of detected male, female mite and eggs

	Erkek		Dişi		Yumurta	
	Boy (µm)	En (µm)	Boy (µm)	En (µm)	Boy (µm)	En (µm)
1	338	192	606	296	69	48
2	460	188	494	216	89	47
3			557	202	93	67
4			486	189		
5			605	259		

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Birçok gıda maddesi saklanmaları sırasında çeşitli akar türleri ile bulaşabilmektedir. Bunların başında kozmopolit bir akar olan *Acarus siro* gelmekte ve genellikle yağ ve protein içeriği yüksek peynir, yer fıstığı, un, tahıl gibi depolanmış gıda maddelerinin kontaminasyonu sonucu alerji oluşturmaktadır (Aygün ve ark. 2007). Dünyanın birçok ülkesinde sevilerek tüketilen peynir, %10-30 oranında protein içermektedir (Kaynar 2011). Peynirlerde sık rastlanılan *A. siro* un akarı olarak bilinmekte ve gelişme süresi ortalama 9-11 gün sürmekte, erişkinleri ise yaklaşık 30 günlük ömre sahiptir. *Acarus siro*'nun gelişimini sağlayabilmesi için, gıdaların bulunduğu ortamda optimum ısının 20-25°C, nispi nem oranının ise yaklaşık %65-80 olması gerekmektedir (Aygün ve ark. 2007). Akar yumurtalarının açılma ve genç dönemlerinin gelişme sürelerinin, ergin ömrü ve cinsiyet oranlarının sıcaklık ve nem arttıkça azaldığı gözlemlenmiştir (Toros ve Emekçi 1989).

Akarların, gıdaların üst kısımlarında biriktikleri ve bu kısımlarda bulunan maya ve mantarlarla beslendikleri bildirilmektedir (Aygün ve ark. 2007). Akar içeren gıdaları tüketen veya temas eden insanlar; dermatitis, konjunktivitis, akut enteritis ve ishal, idrar yolları ve anafilaktik bozuklukları içine alan çeşitli alerjik reaksiyonları kapsayan semptomlar göstermişlerdir (Aygün ve ark. 2007, Çobanoğlu 1996).

Peynir akarlarıyla ilgili ülkemizde yapılan çalışmalarda; Mimioğlu (1959) ve Oytun (1969) kaşar peynirlerinde *Tyroglyphus farinea*'nın zararlarından söz etmişlerdir. Tiğin ve Özer (1971) satışa sunulan kaşar peynirlerinde *Acarus siro* ve *Caloglyphus rhizoglyphoides*, Çobanoğlu ve Toros (1988) tüketime sunulan kaşar peynirlerinde *Acarus immobilis*, *Tyrophagus longior* ve *Glycophagus domesticus*, Aygün ve ark. (2007), Hatay yöresine özgü bir çökelek peynirinde *Tyrophagus putrescentia* tespit etmişlerdir. Umur (1995), Kars'ta 120 eski kaşar peynirinin %85'inde, Yaman ve ark. (2000), Konya'da 290 küflü peynirin %10.34'ünde ve 122 tulum peynirinin %3.27'sinde, Aygün ve ark. (2007), Erzurum'da 200 geleneksel civil peynirinin %0.05'inde ve Karatepe ve ark. (2017) Niğde yöresinde 226 adet peynirin %0.88'inde *Acarus siro*'nun varlığını saptadıklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise Ankara ilinden toplanan 119 adet peynir numunesinin sadece 1 (%0.84)'inde *Acarus siro* varlığı saptanmıştır. Türkiye'de yapılan diğer çalışmalar ile yaptığımız bu çalışmayı karşılaştırdığımızda; Umur (1995)'un Kars'ta tespit ettiği %85'lik ve Yaman ve ark. (2000)'nın Konya'da belirlediği %10.34'lük prevalans oranlarından daha düşük bulunurken, Aygün ve ark. (2007)'nin Erzurum'da tespit ettikleri %0.05'lik ve Karatepe ve ark. (2017)'nin Niğde'de tespit ettikleri %0.88'lik oran ile benzerlik taşımaktadır.

Ankara ilinin Mamak ilçesinde yapılan bu çalışmada akarların peynirlerdeki aylık prevalansı %0-1 arasında

oldukça düşük düzeylerde belirlenmiş olup, sadece Kasım ayına ait örneklerin bir tanesinde enfestasyon tespit edilmiştir. Bu durum, Ankara ilinin sahip olduğu sıcaklık (13-14°C) ve nispi nemin (%49.48) akar gelişimi için uygun olmadığını düşündürmektedir. Bununla birlikte ideal saklama koşullarının uygulanması ve üreticiden tüketiciye kadar geçen zamanda peynirlerin gördükleri işlemlerde hijyenik kurallara uyulması da düşük enfestasyon oranı ile ilişkili olabilir.

Sonuç olarak bu çalışma, Ankara ilinin Mamak ilçesinde kaşar ve tulum peynirlerinde akar varlığını gösteren ilk çalışmadır. Akarların neden olduğu astım, dermatit, konjunktivit, mide-barsak ve idrar yolları rahatsızlıkları, anafaksi ve alerjinin insan sağlığı yönünden ele alınması gerekmektedir (Cevizci ve ark. 2010). Ayrıca akar enfestasyonları peynirlerin dış görüntüsünü bozması sebebi ile ekonomiyi de olumsuz etkilemektedir. Hem sağlık açısından hem de ekonomik nedenlerden dolayı depo gıdalarının üretim, depolama ve pazarlama safhalarında çalışan elemanlar bilinçlendirilmelidir. Saklama koşullarına dikkat edilmeli nem ve sıcaklık oranları iyi ayarlanmalıdır. Halk sağlığı ve ülke ekonomisi açısından bu yöndeki çalışmalar artırılmalıdır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ayda KARADERE'nin Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.  
Bu çalışma 20. Ulusal Parazitoloji Kongresi'nde (25-29 Eylül 2017, Eskişehir) sunulmuştur.

## KAYNAKLAR

- Akdemir C, Gürdal H. Kütahya'da Ev Tozu Akarları. DPÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2004; 7: 27-34.
- Aygun O, Yaman M, Durmaz H. A survey on occurrence of *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae) in Surk, a traditional Turkish dairy product. J Food Eng. 2007; 78: 878-881.
- Aygün O, Yaman M, Durmaz H. Erzurum'da Tüketime Sunulan Geleneksel Civil Peynirinde Akar Varlığının Araştırılması. FÜ Sağ Bil Derg. 2007; 21: 41-43.
- Cevizci S, Gökçe S, Bostan K, Kaypmaz A. Depo gıdalarını ve peynirleri enfeste eden akarlar halk sağlığı açısından bakış. Türkiye Parazitol Derg. 2010; 34: 191-199.
- Çobanoğlu S. Edirne ilinde depolanmış ürünlerde saptanan zararlı ve yararlı Acarina türleri ve konukçuları. Türk Entomol Derg. 1996; 20(3): 199-210.
- Çobanoğlu S, Toros S. Kaşar peynirlerinde zararlı akarlar. Gıda. 1988; 13: 409-415.
- Herms WB, James MT. Medical Entomology. The Macmillan Company, New York, 1961.
- Karatepe M, Bağcı C, Karatepe B, Şenel T, Karadere A. Niğde'de Tüketime Sunulan Peynirlerde Akar Varlığının Araştırılması. Gıda. 2017; 42 (4): 431-436.
- Kaynar P. Ülkemiz peynirleri üzerine mikrobiyolojik araştırmalar. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2011; 41(1): 1-8.

- Lee WK, Choi WY. Studies on the mites (Order Acarina) in Korea, Korean J Parasitol. 1980; 18: 119-144.
- Melnyk JP, Smith A, Scoot-Dupree C, Marccone MF, Hill A. Identification of cheese mite species inoculated on Mimolette and Milkabense cheese through cryogenic scanning electronmicroscopy. J Dairy Sci 2010; 93(8): 3461-3468.
- Mimioğlu MM. Genel ve Özel Tıbbi Arthropodoloji (Tıbbi Entomoloji). AÜ Vet Fak Yay.111. Ders Kitabı 51. Desen Matbaası, 818, 1959.
- Oytun HŞ. Tıbbi Entomoloji, AÜ Tıp Fak Yay. Sayı:218, 552, 1969.
- Sánchez-Ramos I, Castañera P. Evaluation of low humidity treatments to control *Acarus farris* (Acari: Acaridae) in Cabrales cheese. Exp Appl Acarol. 2007; 41: 243-249.
- Tiğın Y, Özer İ. Kaşar peynirlerinde bulduğumuz akarlar, Ankara Üniv Vet Fak Derg. 1971; 18: 418-431.
- Toros S, Emekçi M. *Acarus siro* L. (Acarina, Acaridae)'nun değişik sıcaklık ve nem ortamlarındaki gelişmesi üzerindeki araştırmalar. Türk Entomol Derg. 1989; 13(4): 217-228.
- Umur Ş. Kars ili kaşar peynirlerinde *Acarus siro*'nun yaygınlığı, Türkiye Parazitol Derg. 1995; 19: 576-582.
- Yaman M, Sevinç F, Altınöz F, Uslu U. Küflü peynirlerde ve tulum peynirlerinde *Acarus siro* varlığının araştırılması. Türkiye Parazitol Derg. 2000; 24: 313-316.

## Could Antiparasitic Cure with Clinoptilolite be Achieved in Dogs Naturally Infected with *Giardia Duodenalis*?

Adnan AYAN\*<sup>1</sup>, Songül ERDOĞAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Genetics, 65080, Van, Turkey

<sup>2</sup>Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Aydın, Turkey

### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the antiparasitic efficacy of the natural zeolite component, clinoptilolite, against naturally occurring giardiasis in dogs. Seven infected dogs, aged 6-44 months of age, both sexually owned and diarrhea infected with *Giardia duodenalis* in the Aydın region were used in the study. Group I was administered clinoptilolite orally for 10 days at a dose of 2 g / kg. Group II dogs were provide to stay in the control group. The antiparasitic efficacy of clinoptilolite in dogs was evaluated by microscopic examination of stool samples collected at the beginning 0, 3rd, 7th and 10th day by rectal route. Considering the reduction in cyst excretion per gram feces, clinoptilolite used for anti-giardial purposes provided 99% efficacy in cyst excretion at 10th day. In the treatment group, the mean geometric averages of cyst counts were determined as 200552.4, 37.8, 113.3, 10.4, respectively, on days 0, 3, 7 and 10. On the other hand, in the control group, no significant change was observed in the geometric mean of cyst ruble excretion on day 0 (195099,4) 10 days (174436,1). It can be said that clinoptilolite effectively decreases cyst excretion in dogs with giardiasis and can be used in the recommended dose without causing any side effects.

**Keywords:** *Giardia duodenalis*, Clinoptilolite, Dog.

\*\*\*

### *Giardia Duodenalis* ile Doğal Enfekte Köpeklerde Klinoptilolit ile Antiparaziter Kür Sağlanabilir mi?

#### ÖZ

Bu çalışmanın amacı doğal zeolit bileşeni olan klinoptilolit köpeklerde doğal olarak şekillenen giardiazise karşı antiparaziter etkinliğinin belirlenmesidir. Aydın bölgesinde bulunan doğal olarak *Giardia duodenalis* ile enfekte olan sahipli ve ishali her iki cinsiyetten 6-44 aylık yaştaki 7 enfekte köpek çalışmada kullanıldı. İki ayrı gruba ayrılan çalışma materyali olarak I. gruptakilere 10 gün oral yolla 2 g/kg dozda klinoptilolit uygulanırken, II. grupta bulunan köpeklerin kontrol grubu olarak kalmaları sağlandı. Köpeklerde klinoptilolit antiparazitik etkinliği 0. 3. 7. ve 10. günlerde rektal yolla alınan dışkı örneklerinin mikroskopik incelenmesiyle değerlendirildi. Gram dışkı başına kist miktarındaki azalma göz önünde bulundurulduğunda anti-giardial amaçla kullanılan klinoptilolit 10. günde giardiazise karşı kist atılımında %99 etkinlik sağladığı belirlendi. Sağaltım grubunda sırası ile 0.,3., 7. ve 10. günlerde kist sayılarına ait geometrik ortalamalar 200552.4, 37.8, 113.3, 10.4 şeklinde belirlendi. kontrol grubunda ise 0. gün ile (195099,4) 10. günlerdeki (174436,1) kist atılımının geometrik ortalamalarındaki fazla değişimin göstermediği saptandı. Netice itibarı ile giardiazisli köpeklerde klinoptilolit kist atılımını etkin şekilde azalttığı ve önerilen dozda herhangi bir yan etkiye neden olmaksızın kullanılabileceği söylenebilir.

**Anahtar kelimeler:** *Giardia duodenalis*, Klinoptilolit, Köpek.

To cite this article: Ayan A, Erdoğan S. Could Antiparasitic Cure with Clinoptilolite be Achieved in Dogs Naturally Infected with *Giardia Duodenalis*? Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):305-309

Submission: 12.06.2019 Accepted: 25.08.2019 Published Online: 27.08.2019

ORCID ID; AA: 0000-0002-6564-3416, SE: 0000-0002-7833-5519

\*Corresponding author e-mail: adnanayan@yyu.edu.tr

## GİRİŞ

*Giardia duodenalis*, hayvanlarda (köpek, buzağı) ve insanlarda ishale neden olan enterik bir protozoan olup sık karşılaşılan patojenler arasındadır (Ballweber ve ark. 2010, Bouzid ve ark. 2015). Etkenin diğer konaklardakine benzer şekilde köpeklerde de asemptomatik, akut ve/veya kronik hastalık tabloları oluşturabilecek klinik görünümüleri mevcuttur (Tysnes ve ark. 2014, Westermarck, 2016). Hastalıkta bulaş genellikle fekal-oral kontaminasyona bağlı olarak gelişmektedir (Caccio ve ark. 2005). Giardiosis' e bağlı hastalıkların şekillendiği olgularda etkenin bağırsak lümenine zarar vererek malabsorbsiyon şekillenmesine neden olduğu bilinmektedir (Lunn ve Northrop 1992, Read ve ark. 2002). Ayrıca bu hastalıkta villöz atrofi ve mukozal hasar ile giardia'ya bağlı sekrotorik değişimlere bağlı olarak sodyum, glukoz emilim eksikliklerinin görüldüğü sıvı kayıplarına bağlı olarak da hastaların genel durumlarında ciddi bozulmalar görülmektedir (Buret 2008). Hastalığa maruz kalan hayvanların dışkılarında yüksek düzeyde kist atılımı söz konusu olduğundan enfekte hayvanlar gerek çevrenin gerekse de diğer hayvanların kontamine olmasına neden olmaktadır (Gökçe ve ark. 2010). Bu kapsamda zoonotik potansiyel açısından köpeklerin azımsanmayacak bir yerinin olduğu varsayılmaktadır (Thompson 2004). Hastalığın sağaltımında hekimlik alanlarının hemen hepsinde metronidazol, albendazol, dimetridazole ve nitazoxanide gibi farmasötik ajanlar yaygın bir şekilde kullanıldığı araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Baljer ve Wieler 1989, Aytuğ ve ark. 1990, Hall ve ark. 1996, Bilal 2005).

Klinopitolit üzerine yapılan araştırmalarda söz konusu mineralin antiviral, anti-diyaretik, antimikrobiyal, antikarsinojen, antioksidan, immunmodülatör ve ayrıca birçok maddeye bağlı gelişen toksikasyonların önlenmesinde etkinliğinin bulunduğu bildirilmektedir (Rodriguez-Fuentes ve ark. 1997, Zarcovic ve ark. 2003, Ivkovic ve ark. 2004, Top ve Ülkü 2004, Grce ve Pavelić 2005, Katic ve ark. 2006, Milenković ve ark. 2015). Söz konusu çalışmalara ilaveten Deligiannis ve ark. (2005) geliştirmekte olan kuzularda paraziter enfestasyonlarına azaltılmasında klinopitolitin etkin olduğunu özellikle rasyona %3 seviyesinde ilave edildiğinde gastrointestinal nematod yükünün azaldığını ve ookist saçılımında da azalmaların olduğunu belirtmektedir. Bu çalışmada klinopitolitin köpeklerde doğal olarak şekillenen Giardiazise karşı antiparaziter etkinliğinin belirlenmesi amaçlandı.

## MATERYAL YÖNTEM

### Hayvan materyali ve örneklerin alınması

Araştırmanın hayvan materyalini Aydın bölgesinde bulunan yaşları 6-44 aylık yaştaki her iki cinsiyetten (n=3'er dişi ve erkek), farklı ırklardan (1'er Golden

retriever, terrier, Labrador retriever ile 4 melez) *Giardia duodenalis* ile doğal enfekte (n=7), köpekler oluşturdu. Benzer yaş aralığındaki melez (n=7) ve her iki cinsiyetten anamnez ve klinik bulgular ışığında sağlıklı olduğu belirlenen köpekler sağlıklı kontrol grubu olarak dahil edildi. Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) 19.09.2013 tarihli (no:2013/076) belgesine dayandırılarak gerçekleştirildi. Çalışma materyal ve metodu takvimi önceki benzer bir çalışma (Alıç Ural ve ark. 2017) baz alınarak ve modifiye edilerek gerçekleştirildi. Gerek hasta gerekse sağlıklı köpeklerden fekal muayene örnekleme 0. 3. 7. ve 10. günlerde rektal tuşe sonrası steril dışkı kaplarının içerisine alındı.

### Dışkı analizleri

Hasta ve sağlıklı hayvanlardan toplanan dışkı örneklerinin giardia enfeksiyonunun varlığının belirlenmesinde direkt mikroskopik bakı yöntemi kullanılmıştır. Köpeklerden toplanan dışkı örneklerine mikroskopik inceleme yapıncaya kadar potasyum dikromat çözeltisi içerisinde saklandı. Daha sonra çinko sülfat flotasyon metoduna göre gram dışkıdaki kist sayısı (OPG) yönünden değerlendirildi. Daha sonra kist atılımındaki azalmanın yüzdesi (Geurden ve ark. 2010) ve Henderson-Tilton formülüne göre geometrik ortalamasının hesaplanması göre yapıldı (Henderson ve Tilton 1955).

### İstatistiksel analiz

Araştırma sonucunda sağlıklı ve *Giardia duodenalis* ile doğal enfekte köpeklerin OPG temelinde elde edilen değerlerin tanımlayıcı istatistiksel analizleri ile geometrik ortalaması hesaplandı.

Uygulama ve kontrol gruplarında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi amacıyla Mann Whitney U testi kullanılıp önemlilik düzeyi <0.05 olarak belirlendi. İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 22.0 (IBM, Amerika) programından yararlanılarak gerçekleştirildi.

## BULGULAR

Klinik olarak ishal semptomu gösteren köpeklerin tamamında dışkıda gerçekleştirilen analizleri sonucunda *Giardia duodenalis* ile enfekte olduğu saptandı. Örnekleme işleminin ardından hastalara yapılan ve etkinliği kuzularda Giardia enfeksiyonlarında ortaya konulan (Ural ve ark. 2014) zeolite kullanılarak başarılı bir şekilde sağlandı. Sağlıklı ve doğal enfekte hayvanlara istatistiksel anlamlı değişimlerin olduğu belirlendi (Tablo 1).

Kontrol ve sağaltım gruplarındaki köpeklerde 4 farklı zaman diliminde (0., 3., 7. ve 10. günlerde) tespit edilen kist atılımlarının geometrik ortalaması ile klinopitolit uygulandıktan sonra tespit edilen kist atılımındaki meydana gelen azalma yüzdesi Tablo 1'de aşağıda gösterildi. Kontrol ve sağaltım gruplarında 3.,

7. ve 10. günlerdeki karşılaştırmalarda istatistiksel olarak belirgin ve anlamlı farklılık ( $p=0,001$ ) belirlendi.

**Tablo 1.** Giardiasisli köpeklerde kontrol ve tedavi gruplarına ait ortalama kist sayılarının istatistiksel değerlendirmesi.  
**Table 1.** Statistical evaluation of mean number of cysts in control and treatment groups in dogs with giardiasis.

	0.gün	3. gün	7.gün	10.gün
<b>Kontrol</b>	195099,4	161039,8	131345,2	174436,1
<b>Tedavi</b>	200552,4	37,8	113,3	10,4
<b>P değeri</b>	0,898	0,001	0,001	0,001
<b>Kist atılımındaki azalma</b>		%99	%73	%99

## TARTIŞMA

*Giardia duodenalis* hayvan ve insanlar arasında çapraz enfeksiyonlar yapabilmektedir. Biyokimyasal ve morfolojik özellikleri benzerlik göstermektedir. Bu sebeple evcil hayvanların insanları enfekte edebilme potansiyelinin de bulunduğu bilinmektedir (Gaydos 1998). Bu nedenle hastalığın subklinik veya klinik olarak seyrettiği tüm hayvanlarda bulaşma kaynağının hemen ortadan kaldırılması amacı ile hastaların sağaltımlarının yapılması tavsiye edilmektedir (Geurden ve ark. 2011). Bu çalışmada *Giardia duodenalis* ile doğal enfekte köpeklerin tamamı klinoptilolit 2 g/kg dozunda 10 gün doz olacak şekilde sağaltılmış ve klinik iyileşmenin yanında enfekte hayvanların insan sağlığı açısından rezervuar teşkil etmemesi sağlanmıştır.

Köpeklerde Giardiazis sağaltımında günümüze kadar pirantel embonat, febantel ve prazikuantel 3'lü kombinasyonu, fenbendazol, prazikuantel, pirantel pamoat 3'lü kombinasyonu silimarin, ipronidazol, ronidazol, Enterococcus faecium SF68 probiyotik gibi çeşitli farklı etken maddeler denenmiştir. (Abbitt ve ark. 1986, Barr ve ark. 1998, Giangaspero ve ark. 2002, Payne ve ark. 2002, Chon ve Kim 2005, Miro ve ark 2007, Montoya ve ark. 2008, Bowman ve ark. 2009, Simpson ve ark. 2009, Fiechter ve ark. 2012). Bununla birlikte Giardiazisli köpeklerde 30 mg/kg tek doz seknidazol kullanımı ile kist saçılımının tedavi grubunda 3, 7 ve 10. günlerde anlamlı derecede ( $P<0.01$ ) azaldığı, kist atılımının geometrik ortalamasına bakıldığında % 100 azalma tespit edildiği bildirilmiştir (Karahallı ve Ural, 2017). Başka bir çalışmada oral yolla 30-50 mg/kg ronidazol' ün 7 gün uygulandığı 6 köpekte, olguların tamamının 7-26. güne kadar iyileştiği ve dışkı içerisinde giardia kistlerinin bulunmadığı bunun yanı sıra antijenik bakıda da negatif olduğu belirtilmektedir. Söz konusu çalışmada ayrıca ronidazol uygulaması ile birlikte ortamında klorheksidin ile dezenfeksiyonunun sağlanmasında oldukça etkin sonuçların elde edildiğini belirtmektedir (Fiechter ve ark 2012). Giardiazisin kontrolünde bahsedilen mevcut kemoterapötik

seçenekler etkin olarak gösterilse de sağaltım yetersizliklerine bağlı olarak persiste giardia kist saçılımlarında göz ardı edilmemelidir (Payne ve Artzer 2009, Fiechter ve ark. 2012). Bu sebeple sağaltımda meydana gelebilecek başarısızlıkların başında re-enfeksiyonların göz önünde tutulması gerektiği unutulmamalıdır (Payne ve Artzer 2009). Söz konusu durumunun özellikle barınak şartlarında barındırılan köpeklerde klinik öneminin bulunduğu gösterilmektedir (Thompson 2004). Bu bağlamda yalnızca etiyolojik ajana yönelik sağaltım uygulamaları değil çevresel sanitasyonun sağlanmasında farmasötik ajanlar ile ilişkili olarak gelişebilecek direnç sorununun da önüne geçebileceği düşünülmektedir (Payne ve Artzer 2009). Kistlerin su kaynaklarında 84 gün, nemli bölgelerde +4 derecede 11 haftaya kadar canlı kalabildiği (deReigner ve ark 1989, Olson ve ark 2004) düşünüldüğünde çalışmamız kapsamında klinoptilolit'in her ne kadar başarılı sağaltım etkinliği bulunsada sanitasyon koşullarının sağlanması ile ilişkili olarak gerekli önlemlerin alınmasına yönelik bildirimlerinde (Korich ve ark 1990, Betancourt ve Rose 2004) göz ardı edilmemesi gerektiği düşünüldü. Bu çalışmada klinoptilolit'in köpeklerde doğal yolla oluşan giardiazise karşı antiparaziter etkinliğinin bulunduğu ve önceki çalışmalarda oğlaklarda giardiazise karşı klinoptilolit ile 10. günde %95 etkinlik sağladığı bildirimini (Alç Ural ve ark. 2017) değerlendirdiğinde bu çalışmada 10. günde saptanan %99 etkinliğin önceki çalışmaya göre yüksek olduğu tespit edildi. Söz konusu oransal farklılıkların köpeklerin giardia ile doğal enfekte olmasına bağlı olarak kist atılımlarında meydana gelebilecek olan aralıklı saçılımı ile ilişkili olması ile açıklanabilir. Sonuç olarak köpeklerde klinoptilolit'in kist atılımını etkin şekilde azalttığı ve önerilen dozda herhangi bir klinik yan etkiye neden olmaksızın kullanılabileceği söylenebilir.

## KAYNAKLAR

Abbitt B, Huey RL, Eugster AK, Syler J. Treatment of giardiasis in adult Greyhounds, using ipronidazole-medicated water. JAVMA. 1986; 188:67-69.

- Aliç Ural D, Erdoğan H, Toplu S, Ayan A.** Application of Oral Clinoptilolite Intended For Prevention of Giardiasis in Goat Kids. *Kocatepe Vet J.* 2017; 10(3):158-163.
- Aytuğ N, Alaçam E, Özkoç Ü, Yalçın BC.** Koyun-Keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği, İstanbul: Teknografik Matbaası, 1990; 212-213.
- Baljer G, Wieler L.** Ätiologie, Pathogenese und Immunprophylaxe der neonatalen Durchfallerkrankungen der Kälber. *Vet.* 1989; 5:18-26.
- Ballweber LR, Xiao L, Bowman DD, Kahn G, Cama VA.** Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends Parasitol.* 2010; 26:180-9.
- Barr SC, Bowman DD, Frongillo MF, Joseph SL.** Efficacy of a drug combination of praziquantel, pirantel pamoate, and febantel against giardiasis in dogs. *Am J Vet Res.* 1998; 59:1134-1136.
- Betancourt WQ, Rose JB.** Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet Parasitol.* 2004; 126:219-234.
- Bilal T.** Koyun-Keçilerin İç Hastalıkları ve Beslenmesi. İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi Müdürlüğü, İstanbul, 2005.
- Bouzid M, Halai K, Jeffreys D, Hunter PR.** The prevalence of *Giardia* infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Vet Parasitol.* 2015; 207:181-202.
- Bowman DD, Liotta JL, Ulrich M, Charles SD, Heine J, Schaper R.** Treatment of naturally occurring, asymptomatic *Giardia* sp. in dogs with Drontal Plus flavour tablets. *Parasitol Res.* 2009; 105(1):125-134.
- Buret AG.** Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. *Parasite.* 2008; 15(3):261-265
- Caccio SM, Thompson RC, McLaughlin J, Smith HV.** Unraveling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 2005; 21:430-437.
- Chon SK, Kim NS.** Evaluation of silymarin in the treatment on asymptomatic *Giardia* infections in dogs. *Parasitol Res.* 2005; 97:445-451
- Deligiannis K, Lainas T, Arsenos G, Papadopoulos E, Fortomaris P, Kufidis D, Stamataris C, Zygoiannis D.** The effect of feeding clinoptilolite on food intake and performance of growing lambs infected or not with gastrointestinal nematodes. *Livest Prod Sci.* 2005; 96:195-203.
- DeReigner DP, Cole L, Schupp DG, Erlandsen SL.** Viability of *Giardia* Cysts Suspended in Lake, River, and Tap Water. *Appl Environ Microbiol.* 1989; 55(5):223-229
- Fiechter R, Deplazes P, Schnyder M.** Control of *Giardia* infections with ronidazole and intensive hygiene management in a dog kennel. *Vet Parasitol.* 2012; 187(1-2):93-98.
- Gaydos J.** *Giardia* and Wildlife South Coop Wild Dis St Br. 1998; 14:2.
- Geurden T, Pohleb H, Sarrea C, Dreesena L, Vercruysea J, Claerebouta E.** The efficacy of a treatment with fenbendazole against an experimental *Giardia duodenalis* infection in lambs. *Small Rum Res.* 2011; 96(2-3):211-215.
- Geurden T, Vandenhoute E, Pohle H, Casaert S, De Wilde N, Vercruysea J, Claerebout E.** The effect of a fenbendazole treatment on cyst excretion and weight gain in calves experimentally infected with *Giardia duodenalis*. *Vet Parasitol.* 2010; 169(1-2):18-23.
- Gianguaspero A, Traldi G, Paoletti B, Traldi G, Bianciardi P.** Efficacy of pyrantel embonate, febantel and praziquantel against *Giardia* species in naturally infected adult dogs. *Vet Rec.* 2002; 150:184-186.
- Gökçe E, Ünver A, Erdoğan HM.** İshalli neonatal kuzularda enterik patojenlerin belirlenmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2010; 16:717-722.
- Grce M, Pavelić K.** Antiviral properties of clinoptilolite. *Micropor Mesopor Mat.* 2005; 79(1):165-169.
- Hall GA, Jones PW, Morgan JH.** Calf diarrhoea. *Bovine Medicine, In: Diseases and Husbandry of Cattle*, Ed; Andrews AH. Berlin: Blackwell, 1996; pp.154-180.
- Henderson CF, Tilton EW.** Tests with acaricides against the brow wheat mite. *J Econ Entomol.* 1955; 48:157-161.
- Ivkovic S, Deutsch U, Silberbach A, Walraph E, Mannel M.** Dietary supplementation with the tribomechanically activated zeolite clinoptilolite in immunodeficiency: effects on the immune system. *Adv Ther.* 2004; 21(2):135-147.
- Karahallı C, Ural K.** Single dose secnidazol treatment efficacy against naturally occurring *Giardia duodenalis* infection in dogs. *Magy Allatorvosok.* 2017; 139(10):621-630.
- Katic M, Bosnjak B, Gall-Troselj K, Dikic I, Pavelic K.** A clinoptilolite effect on cell media and the consequent effects on tumor cells in vitro. *Front Biosci.* 2006; 11(2):1722-1732.
- Korich DG, Mead JR, Madore MS, Sinclair NA, Sterling CR.** Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl Environ Microbiol.* 1990; 56:1423-1428.
- Lunn B, Northrop A.** Symposium on 'parasitism and protein and energy metabolism and animals'. The impact of gastrointestinal parasites on protein-energy malnutrition in man. *Proc Nutr Soc.* 1992; 52:101-111.
- Milenković JK, Hrenović JJ, Goić-Barišić IS, Tomić MD, Rajić NZ.** Antibacterial activity of copper-containing clinoptilolite/PVC composites toward clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J Serb Chem Soc.* 2015; 80(6):819-826.
- Miro G, Mateo M, Montoya A, Vela E, Calonge R.** Survey of intestinal parasites in stray dogs in the Madrid area and comparison of the efficacy of three anthelmintics in naturally infected dogs. *Parasitol Res.* 2007; 100:317-320.
- Montoya A, Dado D, Mateo M, Espinosa C, Miró G.** Efficacy of Drontal® Flavour Plus (50 mg praziquantel, 144 mg pyrantel embonate, 150 mg febantel per tablet) against *Giardia* sp in naturally infected dogs. *Parasitol Res.* 2008; 103:1141-1144.
- Olson ME, O'Handley RM, Ralston BJ, McAllister TA, Thompson RCA.** Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends in Parasitol.* 2004; 20:185-191.
- Payne PA, Artzer M.** The biology and control of *Giardia* spp. and *Trichostrongylus axei*. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2009; 39:993-1007.
- Payne PA, Ridley RK, Dryden MW, Bathgate C, Milliken GA, Stewart PW.** Efficacy of a combination febantel-praziquantel-pyrantel product, with or without vaccination with a commercial *Giardia* vaccine, for treatment of dogs with naturally occurring giardiasis. *JAVMA.* 2002; 220:330-333.

- Read C, Walters J, Robertson I, Thompson R.** Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. Int J Parasitol. 2002; 32:229-231.
- Rodriguez-Fuentes G, Barrios MA, Iraizoz A, Perdomo I, Cedre B.** Enterex: Antidiarrheic drug based on purified natural clinoptilolite. Zco. 1997; 19(5-6):441-448.
- Simpson KW, Rishniw M, Bellosa M, Liotta J, Lucio A, Baumgart M, Czarnecki-Maulden G, Benyacoub J, Bowman D.** Influence of *Enterococcus faecium* SF68 Probiotic on Giardiasis in Dogs. J Vet Intern Med. 2009; 23(3):476-481.
- Thompson RCA.** The zoonotic significance and molecular epidemiology of Giardia and Giardiasis. Vet Parasitol. 2004; 126:15-35.
- Top A, Ülkü S.** Silver, zinc, and copper exchange in a Na-clinoptilolite and resulting effect on antibacterial activity. Appl Clay Sci. 2004; 27(1-2):13-19.
- Tysnes KR, Skancke E, Robertson LJ.** Subclinical Giardia in dogs: a veterinary conundrum relevant to human infection. Trends Parasitol. 2014; 30:520-7.
- Ural K, Aysul N, Voyvoda H, Ulutas B, Aldemir OS, Eren H.** Single dose of secnidazole treatment against naturally occurring *Giardia duodenalis* infection in Sakiz lambs. Revista MVZ Córdoba. 2014; 19(1):4023-4032.
- Westermarck E.** Chronic diarrhea in dogs: what do we actually know about it? Top Companion Anim Med. 2016; 31:78-84.
- Zarcovic N, Zarcovic K, Kralj M, Borovic S, Sabolovic S, Blazi MP, Pavelic K.** Anticancer and antioxidative effects of micronized zeolite clinoptilolite. Anticancer Res. 2003; 23(2):1589-1596.



## Evaluation of Calf Management and Livability in Dairy Farms in Afyonkarahisar

Kemal YILDIRIM<sup>1</sup>, Serdar KOÇAK<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Agriculture and Rural Development Support Institution, Afyonkarahisar Province Unit, Expert, Afyonkarahisar, Turkey

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Breeding and Husbandry, ANS Campus, Afyonkarahisar, Turkey

### ABSTRACT

This study was carried out in order to examine the factors affecting the survival of calves with rearing, feeding and management of calves in dairy cattle farms in Afyonkarahisar province. The research was conducted in 25 dairy farms in center Afyonkarahisar and districts, and used 400 head Simmental calves and 117 head Holstein calves which are birth in 7 farms which have regular records for their livability of calves in 2016 and 2017. The survival rates were  $0,920\pm 0,021$ ,  $0,896\pm 0,023$ ,  $0,874\pm 0,025$  and  $0,857\pm 0,025$  at 30, 60, 75 and 90 days of life in the Simmental calves, respectively. The effects of dairy farm and birth season at 30, 60, 75 and 90 days of survival rates, effect of age of dam at 60, 75 and 90 days of survival rates and effect of gender at 75 days of survival rates in the Simmental calves were significant ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ). The survival rates were  $0,918\pm 0,027$ ,  $0,918\pm 0,027$ ,  $0,918\pm 0,027$  and  $0,893\pm 0,029$  at 30, 60, 75 and 90 days of life in the Holstein calves, respectively. The effects of gender at 30, 60, 75 and 90 days for survival rates, effect of birth season at 30, 60 and 75 days of survival rates in Holstein calves were significant ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ). As a result, it was concluded that the survival rates in the Simmental and Holstein calves is low in terms of optimal productivity and ideal values, and the quality and management of colostrum should be taken into consideration.

**Keywords:** Calf, dairy cattle, livability, management

\*\*\*

### Afyonkarahisar Damızlık Süt Sığırı İşletmelerinde Buzağı Bakımı ve Yaşama Gücünün Değerlendirilmesi

#### ÖZ

Bu çalışma, Afyonkarahisar İlinde bulunan damızlık süt sığırı işletmelerindeki buzağı bakımı ve yönetimi ile buzağılarda yaşama gücü ve etkileyen faktörlerin incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Araştırma, Afyonkarahisar merkez ve ilçelerinde bulunan 25 adet damızlık süt sığırı işletmesinde yürütülmüş olup yaşama gücü için 7 adet işletmenin 2016 ve 2017 yıllarında doğan 400 baş Simental ve 117 baş Holştayn buzağısı kullanılmıştır. Simental buzağılarda yaşama gücü ortalamaları 30., 60., 75. ve 90. günde sırasıyla;  $0,920\pm 0,021$ ,  $0,896\pm 0,023$ ,  $0,874\pm 0,025$  ve  $0,857\pm 0,025$  olarak tespit edilmiştir. Simental buzağılarda yaşama gücüne 30., 60., 75. ve 90. günde işletme ve doğum mevsiminin, 60., 75. ve 90. günde ana yaşının ve 75. günde ise cinsiyetin etkisinin önemli ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ) olduğu belirlenmiştir. Holştayn buzağılarda yaşama gücü ortalamaları 30., 60., 75. ve 90. günde sırasıyla;  $0,918\pm 0,027$ ,  $0,918\pm 0,027$ ,  $0,918\pm 0,027$  ve  $0,893\pm 0,029$  olarak hesaplanmıştır. Holştayn buzağılarda 30., 60., 75. ve 90. günde yaşama gücüne cinsiyetin, 30., 60. ve 75. günde ise doğum mevsiminin etkisinin önemli ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ) olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, Simental ve Holştayn buzağılarda yaşama gücünün optimal verimlilik ve ideal değerler bakımından düşük olduğu, kolostrum kalitesi ve yönetimine önem verilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Buzağı, süt sığırcılığı, yaşama gücü, yönetim

To cite this article: Yıldırım K. Koçak S. Evaluation of Calf Management and Livability in Dairy Farms in Afyonkarahisar. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):310-316

Submission: 18.07.2019 Accepted: 12.08.2019 Published Online: 27.08.2019

**ORCID ID;** KY: 0000-0002-7743-3897, SK: 0000-0002-7832-887X

\*Corresponding author e-mail: serkocak@yahoo.com

Sığır yetiştiriciliğinde optimum karlılık ve sürdürülebilirlik için her inekten yılda bir buzağı alınması ve buzağılarda yaşama gücünün yüksek olması önemlidir. Buzağılarda yaşama gücü, belli bir döneme kadar yaşayan buzağı sayısının canlı doğan hayvan sayısına bölünmesiyle hesaplanmaktadır. Doğum sonrası yaşama gücü, yeni doğan buzağuların çevre şartlarına adaptasyonunun belirlenmesinde ve işletmelerin karlılığı açısından oldukça önemlidir (Akçapınar ve Özbeyaz 1999). Sığırcılık işletmelerinde buzağular bireysel veya grup halinde kapalı yâda açıkta yetiştirilmektedir. Gerek bireysel buzağı kulübelerinde gerekse grup buzağı alanlarında kullanılan altlıklar ve değiştirme sıklığı önem arz etmektedir. Buzağı barınaklarında zeminin kuru olması, yeterli havalandırma, hareket olanağı, yem ve su imkânı ile stressiz ortam gereklidir. Son yıllarda ahşap, plastik ve metalden buzağı barınakları yapılmaktadır (Özyürek ve ark. 2013).

Buzağılara zamanında, kaliteli ve yeterli kolostrum verilmesi ile büyüme, hastalık insidansı ve yaşama gücü üzerine olumlu etki yaptığı bildirilmektedir (Yüceer ve Özbeyaz 2010). Buzağılarda yaşama gücünü etkileyen faktörler genel olarak ırk, besleme, iklim, hastalıklar, barınak, hijyen, doğum tipi ve cinsiyettir (Özyürek ve ark. 2013).

Buzağılarda yaşama gücünün incelendiği çalışmalarda 1 aylık yaşa kadar yaşama gücü Norveç'te % 95,4, Fransa'da % 93,3 ve İran'da % 93,51 olarak bildirilmektedir. (Gulliksen ve ark. 2009, Azizzadeh ve ark. 2012, Raboisson ve ark. 2013). Türkiye'de düzenlenen buzağı kayıpları sempozyumunda buzağılarda yaşama gücünün İtalya'da % 75,00 (De Amicis ve ark. 2017), İngiltere'de % 92,58 - % 97,53 (Gates 2013), ABD'de ise % 93,60 (APHIS 2010) olduğu ifade edilmiştir (Anonim 2017). Ayrıca Türkiye'deki buzağılarda yaşama gücünün bölge ve işletmelere göre farklılık göstermekle beraber % 85-90 arasında olduğu bildirilmiştir (Anonim 2017).

Türkiye'de yapılan çalışmalarda Holştayn buzağuların 30.gün, 60.gün, 75.gün ve 90.günde yaşama gücü sırasıyla; % 93,83- 97,00; % 93,83- 94,20; % 95,93- 96,34 ve % 85,90-95,00 arasında, Simental buzağuların ise 30. ve 90 günde yaşama gücü % 98,00 ve %92,00-%98,80 arasında olduğu bildirilmektedir (Deliömeroğlu ve ark. 1995, Akbulut 1998, Başpınar ve ark. 1998, Karakaş 2002, Koçak ve ark. 2007, Koçak ve ark. 2008, Bayrıl ve Yılmaz 2010, Yüceer ve Özbeyaz 2010, Ayaşan ve ark. 2016).

Bu çalışma, Afyonkarahisar ilinde bulunan damızlık süt sığırı işletmelerindeki buzağı bakımı, beslenmesi ve yönetimi bilgileri ile buzağılarda yaşama gücü ve etkileyen faktörlerin incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

## Materyal

Bu araştırma, Afyonkarahisar merkez ve ilçelerinde bulunan 25 adet damızlık süt sığırı işletmesinde yürütülmüştür. İşletmelerden elde edilen veriler incelenerek buzağı kayıtları düzenli olan 7 işletmede 01.01.2016-31.12.2017 arasında doğan 400 baş Simental ve bir işletmedeki 117 baş Holştayn ırkı olmak üzere toplam 517 baş buzağının verileri değerlendirilmiştir.

## Metod

Bu çalışma için işletmeler ziyaret edilerek buzağı bakımı, yetiştirilmesi ve ölümleri ile ilgili veriler geliştirilen forma kayıt edilmiştir. İşletmelerde sürü büyüklüğü, buzağının anasından ayrılma zamanı, kolostrumun ilk verilme zamanı, sıklığı ve miktarı, göbek kordonu dezenfeksiyonu ve sıklığı, buzağı barınak tipi, kullanılan altlığın çeşidi, miktarı ve değişim sıklığı, suluğun çeşidi, sütten kesime kadar verilen yemlerin çeşidi, miktarı ve öğün sayısı, sütle besleme şekli (anasını emzirme, biberon, emzikli kova), sütten kesim yaşı, buzağuları izleme yöntemi, sıklığı ve süresine ait bilgiler incelenmiştir. Buzağılarda yaşama gücünün değerlendirildiği 7 işletmede sütten kesim yaşı 60-75 gün arasındadır. Buzağılarda yaşama gücü; 30., 60., 75. ve 90. gün olmak üzere 4 dönemde değerlendirilmiştir. Haile-Mariam (1998) ve Riley ve ark. (2004)'nın bildirişleri doğrultusunda bu dönemlerde yaşayan buzağılara "1" ölenlere ise "0" kodu verilmiştir.

İstatistiki analizlerde; Simental ve Holştayn buzağular ayrı ayrı olmak üzere işletme (1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7), doğum yılı (2016 ve 2017), doğum mevsimi (sonbahar-kış, ilkbahar-yaz), cinsiyet (erkek ve dişi) ve ana yaşının (2, 3, 4 ve 5 ≤) etkisinin belirlenmesinde varyans analizi, aralarındaki farklılık önemli bulunan grupların karşılaştırılmasında Duncan testi kullanılmıştır. Analizlerde PASW Statistics 18.0.0 programından yararlanılmıştır.

## BULGULAR

### Buzağı Bakımı ve Yönetimi

Bu araştırma kapsamında Afyonkarahisar ve ilçelerinde bulunan 25 adet damızlık süt sığırı işletmesinde Simental, Holştayn ve Esmer ırklarının bulunduğu, ağırlıklı olarak Simental ırkının (21 işletmede) tercih edildiği ve kapasitelerinin 90-270 baş arasında olduğu belirlenmiştir. İşletmelerde düve ve ineklerin tohumlanmasında genellikle suni tohumlamanın tercih edildiği, iki işletmenin ise boğa kullandığı ifade edilmiştir. Doğumdan sonra buzağıyı anasından ayırma zamanı yirmi iki işletmede 1-3 saat içinde, iki işletmede 6-12 saat içinde, bir işletmede ise doğumdan 3 gün sonra yapıldığı belirtilmiştir. İşletmelerde kolostrumun doğumdan sonraki ilk 1-2 saat içinde, 3 gün süreyle günde 2-3 litre olmak üzere

2-4 kez/gün içirildiği ifade edilmiştir. Buzağuların göbek kordonu dezenfeksiyonu ilki doğumdan sonraki 3 saat içerisinde olmak üzere 3 gün süreyle günde 2 kez yapıldığı bildirilmiştir. İncelenen işletmelerde buzağı barınakları genellikle seyyar buzağı kulübesi (22 işletme), üç işletmede ise bireysel kapalı bölmeler şeklindedir. Buzağı barınaklarında kullanılan altlık, sap (19 işletme), odun talaşı (2 işletme) ve ızgaralı sistemdir (4 işletme). Buzağı bölmelerinde kullanılan altlığın değişim sıklığının genellikle 3 günde bir kez, bir işletmede haftada bir kez, bir işletme ise ayda bir kez yapıldığı ifade edilmiştir. Buzağuların sütle beslenmesinde üç işletmenin sadece süt, diğerlerinin ise sütün yanında kesif ve kaba yem verdiği belirlenmiştir. Sütle besleme döneminde verilen besinin öğün sayısı genellikle iki olup sadece bir işletmede 3 öğündür. Sütle besleme süresinin ziyaret edilen yirmi beş işletmenin on sekizinde 60-75 gün, yedi işletmede ise 90 gün olduğu tespit edilmiştir. İşletmelerde suluk olarak kulübe suluğu, sütle besleme için ise biberon kullanılmaktadır. Buzağuların takibi, on işletmede gözlem ve kamera birlikte, on beş işletme ise sadece gözlem yoluyla yapılmaktadır. İşletmelerde aydınlatma amacıyla projektör, floresan ve LED kullanıldığı belirlenmiştir.

### **Buzağularda Yaşama Gücü ve Etkileyen Faktörler**

Afyonkarahisar merkez ve ilçelerde bulunan Simental ve Holştayn buzağularda yaşama gücüne ait ortalamalar ve standart hataları Tablo 1 ve 2' de sunulmuştur. Ayrıca 30., 60., 75. ve 90. günde Simental ve Holştayn buzağuların yaşama gücü genel ortalamaları Şekil 1'de verilmiştir.

Bu çalışmanın yürütüldüğü işletmelerde bulunan Simental buzağularda 30., 60., 75. ve 90. günde yaşama gücü genel ortalaması sırasıyla; % 92,0; % 89,6; % 87,4 ve % 85,7 olarak hesaplanmıştır. Simental buzağularda yaşama gücüne 30. günde işletme ve doğum mevsiminin, 60. günde işletme, doğum mevsimi ve ana yaşının, 75. günde işletme, doğum mevsimi, cinsiyet ve ana yaşının, 90. günde işletme, doğum mevsimi ve ana yaşının etkisinin önemli ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ) olduğu tespit edilmiştir.

Holştayn buzağularda yaşama gücü genel ortalamaları 30., 60., 75. ve 90. günde sırasıyla; % 91,8; % 91,8; % 91,8 ve % 89,3 olarak tespit edilmiştir. 30., 60. ve 75. gündeki yaşama gücüne cinsiyet ve doğum mevsimi faktörünün etkisi önemli ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ), doğum yılı ve ana yaşının ise önemsiz ( $p>0,05$ ) olduğu tespit edilmiştir. 90. gündeki yaşama gücüne cinsiyetin etkisi önemli ( $p<0,01$ ), doğum yılı, doğum mevsimi ve ana yaşının etkisinin ise önemsiz ( $p>0,05$ ) olduğu bulunmuştur.

### **Buzağı Bakımı ve Yönetimi**

Afyonkarahisar merkez ve ilçelerinde ziyaret edilen 25 işletmede Simental, Holştayn ve Esmer ırklarının bulunduğu ve yaygın olarak Simental'in tercih edildiği belirlenmiştir. Etçi-sütçü kombine verimli bir ırk olan Simental ırkının Afyonkarahisar'da yoğun olarak yetiştirildiği görülmektedir. Bu durum ırkın besi kabiliyetinin yanında tatminkâr süt verimine sahip olmasından kaynaklanmış olabilir.

Düve ve ineklerin tohumlanmasında işletmelerin 23'ü suni tohumlama, 2'si ise doğal aşım yapmaktadır. Buzağuların analarından ayrılması ise bir işletme hariç geri kalanında 1-12 saat içinde, bir işletmede ise 3 gün sonra yapıldığı tespit edilmiştir. Buzağuların annelerinden erken ayrılması ile anneden geçebilecek hastalıklar önlenmiş olmaktadır. İşletmelerde buzağulara kolostrumun doğumdan sonraki ilk 1-2 saat içinde verildiği ve 3 gün süreyle günde 2-3 litre olmak üzere 2-4 kez/gün kolostrum içirildiği belirlenmiştir. Tümer (1998), yeni doğan buzağıya kolostrumun ilk iki saat içinde en az 2 litre, ilk üç gün ise kolostrum veya bunu takip eden geçiş sütünden günde 3,5 - 4 litre olmak üzere günde 3-4 öğünde içirilmesi gerektiğini ifade etmiştir. İşletmelerde buzağulara kolostrum verme zamanının uygun olduğu görülmektedir. Buzağulara verilen kolostrumun kalitesinin tespitine ilişkin bir uygulamanın yapılmadığı tespit edilmiştir. Bu durum işletmeler için riskli olup düşük kaliteli kolostrumun yaşama gücünü düşürebileceği değerlendirilmektedir. Buzağularda göbek kordonu dezenfeksiyonunun doğumdan sonraki ilk 3 saat içerisinde olmak üzere genellikle 3 gün süreyle günde 2 kez yapıldığı ifade edilmiştir. Patojen mikroorganizmaların göbek kordonu yoluyla bulaşabileceği ve bulaşmayı önlemek için göbek kordonunun doğum sonrası ilk 3 günde 12 saat arayla dezenfeksiyonunun yapılmasının önemli olduğu bildirilmektedir (Anonim, 2019). Bu çalışmanın yürütüldüğü işletmelerde göbek kordonunun dezenfeksiyonuna önem verildiği tespit edilmiştir. Nitekim işletmelerin kayıtlarında göbek kordonu enfeksiyonuna rastlanmamıştır.

Bu çalışmanın yürütüldüğü işletmelerdeki buzağuların, yirmi iki işletmede seyyar buzağı kulübelерinde, üç işletmede ise bireysel kapalı bölmelerde barındırıldığı, buzağı bölmelerinde kullanılan altlık tipinin ise on dokuz işletmede sap, iki işletmede odun talaşı ve dört işletmede ise ızgara bulunduğu tespit edilmiştir. Buzağı bölmelerinde kullanılan altlığın değişim sıklığı genellikle üç günde bir kez, bir işletmede yedi günde bir ve bir işletmede ise otuz günde bir yapılmaktadır. Moore ve ark. (2007) buzağuların bireysel kulübelerde barındırılmasının temel amacının hastalıkların yayılmasını önlemek olduğunu, buzağı ishallerine neden olan patojenlerin yayılması bireysel kulübelerde daha yavaş olarak gerçekleştiğini ifade etmektedir.

Ziyaret edilen işletmelerde bireysel kulübelerin kullanılması ve bu kulübelerin yetiştirme koşullarına uygun olması işletmeler açısından önemli bir avantaj olarak değerlendirilmektedir.

Buzağların sütle besleme döneminde üç işletmede sadece süt, diğerlerinde ise süt ile birlikte (7-30 gün sonra) kesif ve kaba yem verildiği tespit edilmiştir. Sütle besleme döneminde verilen besinin öğün sayısı, bir işletmede 3 öğün diğerlerinde 2 öğün olduğu ve sütle besleme için ise biberon kullanıldığı belirlenmiştir. İşletmelerde buzağların sütle besleme süresi 60-90 gün arasında değişmektedir. İşletmelerde seyyar kulübe suluklarının kullanıldığı tespit edilmiştir. Araştırmanın yürütüldüğü işletmelerde buzağların on işletmede gözlem ve kamera ile izlendiği, on beş işletmede ise sadece gözlem yoluyla takip edildiği tespit edilmiştir. Buzağların günlük takiplerini kamera ve gözlem yöntemlerinin birlikte yapılmasının yaşanabilecek sorunlarda daha erken müdahale imkânı sağlayacaktır. İşletmelerde aydınlatma olarak projektör, floresan ve LED aydınlatma kullanılmaktadır. İşletmelerin aydınlatma tercihlerinin yeterli olduğu düşünülmektedir.

#### **Buzağlarda Yaşama Gücü ve Etkileyen Faktörler**

Araştırmanın yürütüldüğü işletmelerde 2016 ve 2017 yıllarında doğan Simental buzağların 30., 60., 75. ve 90. günde yaşama gücü genel ortalaması sırasıyla; % 92,0; % 89,6; % 87,4 ve % 85,7 olarak tespit edilmiştir. Bu değerler (30. ve 60.gün yaşama gücü), Kaygısız ve Harmandar (2018) tarafından yapılan çalışma (%87,6) dışında bazı araştırmalarda Simental buzağlar için bildirilen değerlerden (%92,0-98,8) daha düşüktür (Deliömeroğlu ve ark. 1995, Akbulut 1998, Koçak ve ark. 2008). Yaşama gücü arasındaki farklılıkların işletme koşullarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim diğer araştırmaların önemli bir kısmı Tarım ve Orman Bakanlığına bağlı işletmelerde yürütülmüştür. Bu çalışma ise yetiştirici koşullarında yapılmıştır.

Simental buzağlarda yaşama gücüne 30. günde işletme ve doğum mevsiminin, 60. günde işletme, doğum mevsimi ve ana yaşının, 75. günde işletme, doğum mevsimi, cinsiyet ve ana yaşının, 90. günde işletme, doğum mevsimi ve ana yaşının etkisinin önemli ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ) olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada işletme faktörünün buzağlarda yaşama gücüne etkisi incelendiğinde bütün dönemlerde en düşük yaşama gücü 6 numaralı işletmede, en yüksek ise 4 numaralı işletmede doğan Simental buzağlarda tespit edilmiştir. Bu durum özellikle 6 numaralı işletmede gebe düve ile yetiştirmeye başlanması, kolostrum kalitesinin düşük olması ve buzağı yönetimindeki aksaklıklardan kaynaklanmış olabilir. Ayrıca işletmelerdeki bakım, besleme ve buzağı idaresindeki farklılıklarında yaşama gücünü etkilediği değerlendirilmektedir. Simental buzağlarda yaşama gücü, doğum mevsimi bakımından incelendiğinde,

ilkbahar ve yaz mevsiminde doğan buzağlarda yaşama gücü sonbahar ve kış mevsiminde doğanlara göre daha yüksek olmuştur. Doğum mevsiminin yaşama gücüne etkisinin Koçak ve ark. (2008)'nın bildirişlerinin aksine önemli ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ) olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Ünal ve ark. (2001) tarafından Simental buzağlarda yapılan bir araştırmada 3 aya kadar yaşama gücü tüm mevsimlerde doğan buzağlarda % 100 olarak bildirilmiş olup buzağı ölümleri 3-6 ay arasında gerçekleştiği ifade edilmiştir.

Simental buzağlarda yaşama gücü cinsiyet bakımından değerlendirildiğinde incelenen bütün dönemlerde dişi buzağların yaşama gücünün erkeklerden daha yüksek olduğu ve aralarındaki farklılıkların sadece 75. günde istatistiki olarak önemli ( $p<0,05$ ) olduğu tespit edilmiştir. Koçak ve ark. (2008) tarafından Holştayn, Simental ve Esmer ırk buzağlarda yapılan bir araştırmada da benzer bulgular bildirilmiştir. Dişi buzağlarda yaşama gücünün daha yüksek olması damızlık adayı olan dişi buzağlara daha fazla özen gösterilmesinden kaynaklanmış olabilir.

Simental buzağlardaki yaşama gücüne ana yaşının etkisi incelendiğinde 60., 75. ve 90. günde buzağların yaşama gücü ortalamaları arasındaki farklılıkların istatistiki olarak önemli ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ) olduğu, 4 yaşlı ineklerden doğan buzağların yaşama gücü en düşük, 5 ve üzeri yaşlı ineklerden doğan buzağlarda ise en yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada Holştayn buzağlardaki yaşama gücü genel ortalamaları 30., 60., 75. ve 90. günde sırasıyla; % 91,8; % 91,8; % 91,8 ve % 89,3 olarak tespit edilmiştir. Bu değerler, Karakaş (2002) tarafından yapılan bir çalışma (% 85,9) ile Kaygısız ve Harmandar (2018)'ın bildirimlerinden (% 89,7) yüksek, bazı çalışmalarda Holştayn buzağlar için bildirilen yaşama gücü değerlerinden (%92,6-% 97,0) ise daha düşük olmuştur (Başpınar ve ark. 1998, Koçak ve ark. 2007, Bayrıl ve Yılmaz 2010, Ayaşan ve ark. 2016). Bu durum, araştırmaların yürütüldüğü işletme koşullarındaki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir.

Holştayn buzağlarda 30., 60. ve 75. günde yaşama gücüne cinsiyet ve doğum mevsiminin etkisi önemli ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ), doğum yılı ve ana yaşının ise önemsiz ( $p>0,05$ ), 90. günde yaşama gücüne cinsiyetin etkisi önemli ( $p<0,01$ ), doğum yılı, doğum mevsimi ve ana yaşı etkisinin ise önemsiz ( $p>0,05$ ) olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada Holştayn buzağlardaki yaşama gücü doğum mevsimi bakımından incelendiğinde ilkbahar ve yaz mevsiminde doğanların yaşama gücünün sonbahar ve kış mevsiminde doğanlara göre daha yüksek olmuştur. Bu çalışmadaki bulgulara benzer şekilde Başpınar ve ark. (1998)'da kış aylarında doğan buzağların yaşama gücünün diğer mevsimlerde doğanlara göre daha

düşük olduğunu bildirmiştir. Bu araştırmadan farklı olarak bazı çalışmalarda buzağılama mevsiminin yaşama gücüne etkisinin istatistiki olarak önemli olmadığı bildirilmiştir (Koçak ve ark. 2007, Bayrıl ve Yılmaz 2010). Holştayn dişi buzağılarda yaşama gücü, incelenen tüm dönemlerde erkekler göre daha yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde Holştayn buzağılarda yapılan bazı araştırmalarda dişi buzağılarda yaşama gücünün erkeklerden daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Koçak ve ark. 2007, Koçak ve ark. 2008, Yüceer ve Özbeyaz 2010; Ayaşan ve ark. 2016). Dişi buzağılarda yaşama gücünün daha yüksek olması damızlık adayı olan dişi buzağılara daha fazla özen gösterilmesinden kaynaklanmış olabilir.

Holştayn buzağılardaki yaşama gücüne ana yaşının etkisi incelendiğinde 2 yaşlı ineklerden doğan buzağılarda yaşama gücü en düşük, 4 yaşlı ineklerden doğan buzağılarda ise en yüksektir. Ana yaşı faktörünün buzağılarda 30., 60., 75. ve 90. gün yaşama gücüne etkisi istatistiki yönden önemsiz ( $p>0,05$ ) olmuştur. Benzer şekilde Koçak ve ark. (2008)'da ana yaşının buzağılarda yaşama gücüne etkisinin istatistiki düzeyde önemli olmadığını bildirmiştir. Ayrıca Bayrıl ve Yılmaz (2010), ana yaşının Holştayn buzağılarda süttten kesimde (2. ay) yaşama gücü üzerine etkisinin önemli ( $p<0,01$ ) olduğunu ifade etmektedir.

**Tablo 1.** Simental Buzağılarda Yaşama Gücüne Ait Ortalamalar ve Standart Hataları

**Table 1.** Least squares means and standard errors for survival rate in Simmental calves

		30. gün	60. gün	75. gün	90. gün
Faktörler	n	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$
$\mu$	400	0,920 $\pm$ 0,021	0,896 $\pm$ 0,023	0,874 $\pm$ 0,025	0,857 $\pm$ 0,025
<b>İşletme</b>		<b>**</b>	<b>**</b>	<b>**</b>	<b>**</b>
1	25	0,928 $\pm$ 0,053 <sup>a</sup>	0,921 $\pm$ 0,058 <sup>a</sup>	0,885 $\pm$ 0,063 <sup>a</sup>	0,873 $\pm$ 0,065 <sup>a</sup>
2	81	0,940 $\pm$ 0,034 <sup>a</sup>	0,921 $\pm$ 0,037 <sup>a</sup>	0,921 $\pm$ 0,040 <sup>a</sup>	0,908 $\pm$ 0,041 <sup>a</sup>
3	29	0,930 $\pm$ 0,058 <sup>a</sup>	0,869 $\pm$ 0,063 <sup>a</sup>	0,824 $\pm$ 0,068 <sup>ab</sup>	0,809 $\pm$ 0,070 <sup>ab</sup>
4	92	0,984 $\pm$ 0,031 <sup>a</sup>	0,964 $\pm$ 0,034 <sup>a</sup>	0,961 $\pm$ 0,037 <sup>a</sup>	0,960 $\pm$ 0,038 <sup>a</sup>
5	58	0,976 $\pm$ 0,041 <sup>a</sup>	0,956 $\pm$ 0,045 <sup>a</sup>	0,948 $\pm$ 0,048 <sup>a</sup>	0,925 $\pm$ 0,050 <sup>a</sup>
6	77	0,813 $\pm$ 0,041 <sup>b</sup>	0,785 $\pm$ 0,044 <sup>b</sup>	0,756 $\pm$ 0,048 <sup>b</sup>	0,735 $\pm$ 0,050 <sup>b</sup>
7	38	0,866 $\pm$ 0,043 <sup>ab</sup>	0,854 $\pm$ 0,047 <sup>ab</sup>	0,821 $\pm$ 0,050 <sup>ab</sup>	0,791 $\pm$ 0,052 <sup>ab</sup>
<b>Doğum Yılı</b>					
2016	104	0,934 $\pm$ 0,031	0,910 $\pm$ 0,033	0,882 $\pm$ 0,036	0,874 $\pm$ 0,037
2017	296	0,906 $\pm$ 0,021	0,882 $\pm$ 0,023	0,865 $\pm$ 0,025	0,841 $\pm$ 0,026
<b>Doğum Mevsimi</b>		<b>*</b>	<b>**</b>	<b>**</b>	<b>**</b>
Sonbahar-Kış	232	0,885 $\pm$ 0,026 <sup>b</sup>	0,852 $\pm$ 0,028 <sup>b</sup>	0,824 $\pm$ 0,031 <sup>b</sup>	0,801 $\pm$ 0,032 <sup>b</sup>
İlkbahar-Yaz	168	0,954 $\pm$ 0,026 <sup>a</sup>	0,939 $\pm$ 0,028 <sup>a</sup>	0,924 $\pm$ 0,031 <sup>a</sup>	0,914 $\pm$ 0,032 <sup>a</sup>
<b>Cinsiyet</b>				<b>*</b>	
Erkek	223	0,905 $\pm$ 0,024	0,878 $\pm$ 0,026	0,844 $\pm$ 0,021 <sup>b</sup>	0,834 $\pm$ 0,030
Dişi	177	0,934 $\pm$ 0,025	0,914 $\pm$ 0,027	0,903 $\pm$ 0,029 <sup>a</sup>	0,881 $\pm$ 0,030
<b>Ana Yaşı</b>			<b>*</b>	<b>*</b>	<b>**</b>
2	217	0,938 $\pm$ 0,021	0,933 $\pm$ 0,023 <sup>a</sup>	0,912 $\pm$ 0,025 <sup>ab</sup>	0,911 $\pm$ 0,026 <sup>a</sup>
3	82	0,938 $\pm$ 0,032	0,899 $\pm$ 0,035 <sup>a</sup>	0,853 $\pm$ 0,037 <sup>ab</sup>	0,844 $\pm$ 0,039 <sup>ab</sup>
4	24	0,827 $\pm$ 0,055	0,778 $\pm$ 0,059 <sup>b</sup>	0,769 $\pm$ 0,064 <sup>b</sup>	0,728 $\pm$ 0,067 <sup>b</sup>
5 ≤	77	0,976 $\pm$ 0,037	0,972 $\pm$ 0,040 <sup>a</sup>	0,962 $\pm$ 0,044 <sup>a</sup>	0,948 $\pm$ 0,045 <sup>a</sup>

\* :  $p<0,05$ ; \*\* :  $p<0,01$

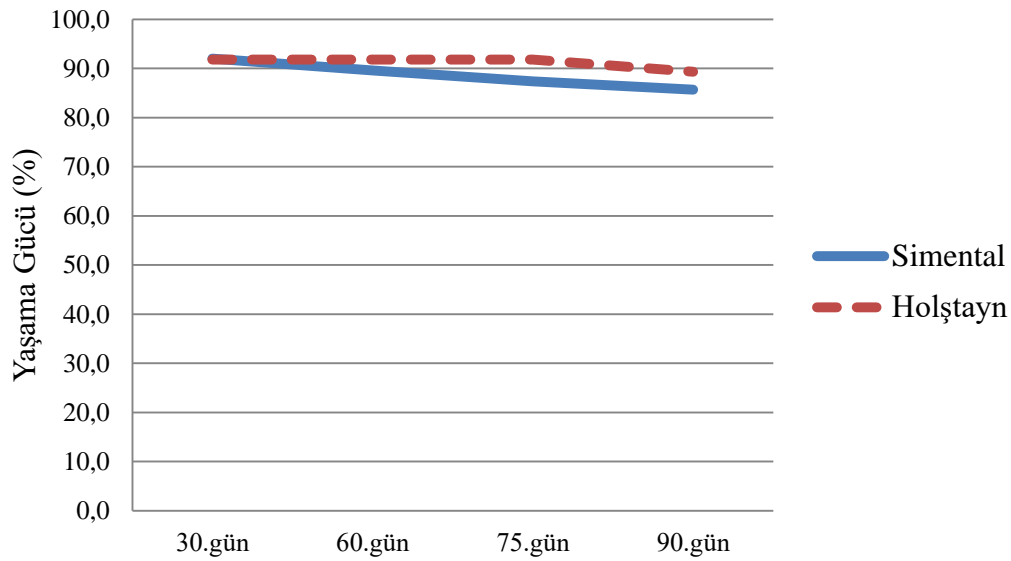
<sup>a, b</sup>.: Aynı sütunda her alt grupta farklı harfleri taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir ( $p<0,05$ ).

**Tablo 2.** Holştayn Buzağlarında Yaşama Gücüne Ait Ortalamalar ve Standart Hataları  
**Table 2.** Least squares means and standard errors for survival rate in Holstein calves

		30. gün	60. gün	75. gün	90. gün
<b>Faktörler</b>	<b>n</b>	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$
$\mu$	117	0,918±0,027	0,918±0,027	0,918±0,027	0,893±0,029
<b>Doğum Yılı</b>					
2016	61	0,949±0,037	0,949±0,037	0,949±0,037	0,940±0,040
2017	56	0,887±0,037	0,887±0,037	0,887±0,037	0,846±0,040
<b>Doğum Mevsimi</b>					
		*	*	*	
Sonbahar-Kış	61	0,855±0,037 <sup>b</sup>	0,855±0,037 <sup>b</sup>	0,855±0,037 <sup>b</sup>	0,843±0,040
İlkbahar-Yaz	56	0,981±0,039 <sup>a</sup>	0,981±0,039 <sup>a</sup>	0,981±0,039 <sup>a</sup>	0,943±0,042
<b>Cinsiyet</b>					
		**	**	**	**
Erkek	57	0,845±0,038 <sup>b</sup>	0,845±0,038 <sup>b</sup>	0,845±0,038 <sup>b</sup>	0,806±0,041 <sup>b</sup>
Dişi	60	0,990±0,037 <sup>a</sup>	0,990±0,037 <sup>a</sup>	0,990±0,037 <sup>a</sup>	0,980±0,040 <sup>a</sup>
<b>Ana Yaşı</b>					
2	28	0,889±0,054	0,889±0,054	0,889±0,054	0,876±0,058
3	28	0,934±0,053	0,934±0,053	0,934±0,053	0,910±0,058
4	17	0,942±0,066	0,942±0,066	0,942±0,066	0,883±0,072
5 ≤	44	0,906±0,042	0,906±0,042	0,906±0,042	0,903±0,045

\* : p<0,05; \*\* : p< 0,01

<sup>a, b</sup>.: Aynı sütunda her alt grupta farklı harfleri taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir (p<0,05).



**Şekil 1.** Simmental ve Holştayn Buzağlarında Yaşama gücü değerleri  
**Figure 1.** Survival rate in Simmental and Holstein calves

## SONUÇ

Sonuç olarak incelenen işletmelerde Simental ve Holştayn buzağularının yaşama gücü genel ortalaması 30.günde % 92,0 ve % 91,8 düzeyinde, 90.günde ise % 85,7 ve % 89,3 olarak tespit edilmiştir. İşletmelerde buzağı bakım ve yönetimine önem verildiği, Simental ve Holştayn buzağularında yaşama gücünün optimal verimlilik ve ideal değer bakımından düşük olduğu, sütle besleme döneminde kolostrum kalitesi ve yönetimine dikkat edilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

## TEŞEKKÜR

*Bu çalışma Kemal Yıldırım'ın yüksek lisans tezinden özetlenmiş olup Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 24.10.2017 tarih ve 49533702/166 sayılı yazısı ile etik prensiplere uyumlu bulunmuştur. Yazarlar araştırmanın yürütülmesinde yardımlarından dolayı işletme sahiplerine teşekkür ederler.*

## KAYNAKLAR

- Akbulut Ö.** Simental sığırların Türkiye'de verim performansı üzerine bir değerlendirme. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 1998; 29 (1): 43-49.
- Akçapınar H, Özbeyaz C.** Hayvan yetiştiriciliği temel bilgileri. Kariyer matbaacılık, Ankara, 1999.
- Anonim.** Önsöz, Buzağı Kayıpları Sempozyumu. 21-22 Aralık 2017, Kırkkale.
- Anonim.** Buzağı Bakım ve Beslenmesi. Erişim: [https://www.tarimorman.gov.tr/HAYGEM/Belgeler/Hayvanc%C4%B1%C4%B1k/B%C3%BCy%C3%BCKba%C5%9F%20Hayvanc%C4%B1%C4%B1k/2016%20Y%C4%B1%C4%B1/Buza%C4%9F%C4%B1%20Bak%C4%B1m%20ve%20Beslenmesi.pdf] Erişim Tarihi:21.02.2019.
- APHIS.** Mortality of Calves and Cattle on U.S. Beef Cow-calf Operations,May2010. Erişim:[https://www.aphis.usda.gov/animal\_health/nahms/beefcowcalf/downloads/beef0708/Beef0708\_is\_Mortality.pdf] Erişim Tarihi: 05.01.2019.
- Ayaşan T, Hızlı H, Asarkaya A, Coşkun MA.** Siyah Alaca buzağularında büyüme performansı ve yaşama gücü. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 2016; 3 (3): 223-228.
- Azizzadeh M, Shooroki HF, Kamalabadi, AS, Stevenson MA.** Factors affecting calf mortality in Iranian Holstein dairy herds. Preventive Veterinary Medicine, 2012; 104 (3-4): 335-340.
- Başpınar H, Oğan M, Batmaz ES, Balcı F, Karakaş E, Baklacı C.** Esmer ve Holştayn buzağularının büyüme ve yaşama gücüne etki eden bazı çevresel faktörler. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 1998; 38 (2): 19-31.
- Bayrıl T, Yılmaz O.** Kazova Vasfı Diren Tarım İşletmesinde yetiştirilen siyah alaca buzağularında büyüme performansı ve yaşama gücü. Yüzcüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2010, 21 (3): 169 – 173.
- De Amicis I, Veronesi, MC, Robbe D, Gloria A, Carluccio A.** prevalence, causes, resolution and consequences of bovine dystocia in Italy. Theriogenology, 2017, 107: 104-108.

**Deliömeroğlu Y, Alpan O, Bakır A.** İthal Simental sığırların Kazova tarım işletmesi şartlarında büyüme ve yaşama gücü. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 1995, 35 (3-4): 1-15.

**Gates MC.** Evaluating there productive performance of British beef and dairy herds using national cattle movement records. Vet. Rec., 2013, 173 (20): 499.

**Gulliksen S M, Lie KI, Loken T, Osteras O.** Calf mortality in Norwegian dairy herds. Journal of Dairy Science, 2009, 92 (6): 2782-2795.

**Haile-Mariam M.** Factors influencing preweaning calf survival rate and cow productivity index in Ethiopian Boran Cattle. 6th International Committee for World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Armadale, NSW Australia, 1998, pp.203-206.

**Karakaş E.** Bursa-Yenişehir ilçesinde yetiştirilen Holştayn buzağularının doğum ağırlığı, süten kesim yaşı, süt tüketimleri ve yaşama güçleri. Uludağ Univ J Fac Vet Med, 2002, 21: 77-81.

**Kaygısız A, Harmandar A.** Kahramanmaraş ilindeki iki özel işletmede kültür ırkı sığırların adaptasyon düzeylerinin sigorta hasar tazminatı alma kriteri bakımından karşılaştırılması. KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi, 2018, 21 (2): 215-219.

**Koçak S, Tekerli M, Özbeyaz C, Yüceer B.** Environmental and genetic effects on birth weight and survival rate in Holstein Calves. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 2007, 31 (4): 241-246.

**Koçak S, Tekerli M, Özbeyaz C, Demirhan İ.** Lalahan Merkez Hayvancılık Araştırma Enstitüsünde yetiştirilen Holştayn, Esmer ve Simental sığırlarda bazı verim özellikleri. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 2008, 48 (2): 51-57.

**Moore DA, Heaton K, Poisson S, Sischo WM.** Dairy calf housing and environment. The Science Behind Housing and on-Farm Assessments. National Integrated Food Safety Initiative 2007-01877.

**Özyürek S, Koçyiğit R, Tüzemen N.** Buzağı yetiştiriciliğinde buzağı barınaklarının önemi. Alınları Zirai Bilimler Dergisi, 2013, 24: 46-52.

**Raboisson D, Delor F, Cahuzac E, Gendre C, Sans P, Allaire G.** Perinatal, neonatal, and rearing period mortality of dairy calves and replacement heifers in France. Journal of Dairy Science, 2013, 96 (5): 2913-2924.

**Riley DG, Chase CC, Olson TA, Coleman SW, Hammond AC.** Genetic and nongenetic influences on vigor at birth and preweaning mortality of purebred and high percentage Brahman Calves. J. Anim. Sci., 2004, 82: 1581-1588.

**SPSS Inc.** PASW Statistical Program. Version 18.0.0., 2009, Chicago, IL, USA: SPSS Inc.

**Tümer S.** Buzağuların bakım ve beslenmesi. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Çiftçi Broşürü, 1998, No: 87.

**Ünal N, Ertuğrul O, Alpan O.** Growth and survival of Simmental calves reared outdoors in individual hutches. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences,2001,25:789-795.

**Yüceer B, Özbeyaz C.** Kolostrum almış buzağularında bağışıklığın, büyüme, hastalık insidansı ve yaşama gücü üzerine etkisi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2010; 57: 185-190.

## Incidence of Fascioliasis Invasion and The Effect of The Disease on Some Hematological and Blood Biochemical Parameters in Sheep Breeding in Afyonkarahisar Province

Bülent ELİTOK\*

*Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine-03200, Afyonkarahisar - Turkey*

### ABSTRACT

This study was carried out in forty-six sheep aged between 1 and 4 years old breeding in Afyonkarahisar Province. Totally 23 animals that were found to have fascioliasis as a result of the stool examinations of 127 animals assigned as the study group, while clinically healthy 23 animals at the same age served as control group. All the clinical, hematological and biochemical parameters were measured in all the animals. As a result of the measurements showed that there was no statistically significant difference between the groups in terms of body temperature, whereas, mean heart and respiratory frequencies, eosinophil count, aspartate aminotransferase, gamma-glutamyl transferase, total and direct bilirubin levels were higher in animals with fascioliasis, while glucose, albumin and total protein levels were decreased. At the end of the study, it was concluded that despite all treatment options, fascioliasis still had a high incidence, and hematological and biochemical parameters could make important contributions to the early diagnosis and treatment of the disease.

**Keywords:** Biochemistry, fascioliasis, findings, hematology, sheep

\*\*\*

### Afyonkarahisar İlinde Yetiştirilen Koyunlarda Fascioliasis İnvazyonun Görülme Sıklığı ile Enfeksiyonun Bazı Hematolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi

#### ÖZ

Bu çalışma Afyonkarahisar İlinde yetiştirilen, yaşları 1-4 arasında değişen, 127 baş koyunda yapılmıştır. Yapılan dışkı muayenelerinde fascioliasis etkeni barındırdıkları tespit edilen 23 hayvan çalışma grubunu oluştururken, klinik olarak sağlıklı oldukları tespit edilen aynı yaşlardaki 23 koyun ise kontrol grubunu oluşturmuştur. Hayvanların tümünde bazı klinik, hematolojik ve biyokimyasal parametrelerin ölçümleri yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda; vücut sıcaklığı açısından gruplar arasında istatistiki açıdan önemli bir fark gözlenmezken, kalp ve solunum frekansları ortalamaları, eozinofil sayısı, aspartat aminotransferaz, gamma-glutamil transferaz, total ve direk bilirubin düzeylerinin fascioliasisli hayvanlarda yüksek, buna karşılık glukoz, albümin ve total protein düzeylerinin ise azalmış olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın sonunda; fascioliasisin tüm tedavi imkanlarına rağmen hala yüksek sayılabilecek bir insidansa sahip olduğu, hematolojik ve biyokimyasal parametrelerin hastalığın erken tanı ve tedavisi açısından önemli katkılar sağlayabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Biyokimya, bulgular, fascioliasis, hematoloji, koyun

*To cite this article: Elitok B. Incidence of Fascioliasis Invasion and The Effect of The Disease on Some Hematological and Blood Biochemical Parameters in Sheep Breeding in Afyonkarahisar Province. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):317-321*

Submission: 10.06.2019

Accepted: 16.07.2019

Published Online: 29.08.2019

ORCID ID; BE: 0000-0003-3336-4479

\*Corresponding author e-mail: elitok1969@hotmail.com



## GİRİŞ

Fascioliasis tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de koyunlar başta olmak üzere, sığır, keçi, manda ve daha bir çok hayvan türünde karşılaşılan, sporadik olarak insanlarda görülebilen (Özkan ve ark. 2005, Moghadami ve Mardani 2008, Emir ve ark. 2013, Odabaşı ve ark. 2014), *Lymnea truncatula* adlı arakonakçısı bulunan, yaprak veya kelebek şeklindeki helmintlerin oluşturduğu bir enfeksiyondur (Kleigman ve ark. 2007, Blood ve Radostits 2007, Tınar 2011). Akut ve kronik seyrebilen enfeksiyon sırasında koyunlarda fascioliasis etkenleri (*Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*) büyüme geriliği, canlı ağırlık ve verim kayıpları, immün sistemin baskılanması ve ileri olgularda ölüme yol açabilmektedir (Hawkins 1984, Mulcahy ve ark. 1999, Paz-silva ve ark. 2003). Ağız yoluyla alınarak duodenuma gelen metaserkerlerden serbest kalan trematodlar, barsak duvarına penetre olarak karaciğer kapsülü ve safra sistemine yerleşmektedirler. Fascioliasisin seyri sırasında ateş, hepatomegali, kilo kaybı, anemi ve eozinofili sıkça karşılaşılabilen bulgulardandır. Tedavi edilmeyip kronikleşen vakalarda ishal, kusma, kolestaz ve buna bağlı olarak gelişen sarılık gibi belirtiler gözlenebilmektedir (Vercelli-Retta ve ark. 2002, Akıs ve ark. 2004, Emir ve ark. 2013).

Klinik bulgulara göre hastalıktan şüphe duyulduğunda, dışkı muayeneleri yapılarak etkenlerinin yumurtalarının saptanmasıyla kesin tanı konulmaktadır (Blood ve Radostits 2007). Hematolojik ve kan biyokimyasal muayenelerinde eozinofili ve yüksek GGT düzeylerinin saptanması sıklıkla tespit edilen bulgulardandır (Matanovic ve ark. 2007, Kleigman ve ark. 2007).

Bu çalışma, Afyonkarahisar İli'nde yetiştirilen koyunlarda fascioliasisin görülme sıklığı ile enfekte hayvanlarda oluşturduğu patolojik etkileri klinik, hematolojik ve biyokimyasal parametrelerle ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada, Afyonkarahisar İli'nde yetiştirilen yaşları 1-4 arasında değişen, 127 baş hayvanda yaptığımız dışkı taramaları sonucunda fascioliasisli oldukları saptanan 23 baş koyun çalışma grubunu (ÇG) oluştururken, yapılan dışkı muayenelerinde fascioliasis etkeni tespit edilmeyen ve klinik muayeneler sonucunda sağlıklı oldukları saptanan ve aynı yetiştirme koşullarında barındırılan toplam 23 koyun ise kontrol grubunu (KG) oluşturmuştur. Bu çalışma AKUHADYEK B.30.2.AKU.0.A2.00.00/204 sayılı referans numarasıyla, Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (AKUHADYEK) etik kuralları çerçevesinde yürütülmüştür.

## Klinik Muayeneler

Her iki gruptaki hayvanlarda yöntemine (Blood ve Radostits 2007) uygun olarak rutin klinik muayeneler (vücut sıcaklığı, kalp ve solunum frekansları) yapılmış ve elde edilen veriler kaydedilmiştir.

## Hematolojik Muayeneler

KG ve ÇG grubu hayvanların vena jugularis'lerinden kan örnekleri alınarak hematolojik muayeneleri yapılmıştır. Hematolojik muayenelerde; eritrosit (RBC), total lökosit (WBC), hematokrit (HCT), hemoglobin (HB), lenfosit (LENF), nötrofil (NOTR), eozinofil (EOZ), monosit (MON) ve bazofil (BAZ) gibi hematolojik muayeneler kan sayım cihaz ile ticari test kitleri kullanılarak ölçülmüştür.

## Kan Biyokimyasal Analizleri

Çalışmanın materyalini oluşturan hayvanların tümünde alınan kan örneklerinde aspartat aminotransferaz (AST), gamma-glutamil transferaz (GGT), total protein (TP), albumin (ALB), kan üre nitrojeni (BUN), kreatinin (KREA), glukoz (GLU), total bilirubin (TB) ve direk bilirubin (DB) düzeyleri otoanalizatörde ticari test kitleri kullanılarak ölçülmüştür.

## Dışkı Muayeneleri

Dışkıda fasciolia yumurtalarının mikroskopik tespiti Cawdery ve Ruane (1971) tarafından daha önceleri bildirildiği şekilde sedimantasyon yöntemi kullanılarak yapılmış ve bu işlem için ışık mikroskobu kullanılmıştır.

## İstatistiksel Analizler

Çalışmanın materyalini oluşturan gruplar açısından klinik, hematolojik ve kan biyokimyasal parametreleri arasındaki farklılıklar bağımsız örneklem için t-testi (independent samples t-test) kullanılarak, SPSS 18.01. for Windows paket programında yapılmış, p<0.05 istatistiki olarak önemli kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Hayvanlara ait klinik, hematolojik ve kan biyokimyasal muayene sonuçları Tablo 1-3'te gösterilmiştir.

## Klinik Bulgular

Gruplara ait klinik bulgular Tablo 1'de gösterilmiştir. Tablo 1 incelendiğinde; ishal, öksürük, burun akıntısı gibi semptomlar KG ve ÇG hayvanların hiç birinde saptanmadığı, konjunktiva ve mukozaların muayenesinde grupların hiç birinde belirgin bir sarılık bulgusuna rastlanmadığı, ancak fascioliasis ile enfekte hayvanların canlı ağırlık kazanımlarının daha az olduğu gözlenmiştir. Alınan anamnez bulguları fascioliasisli dişi hayvanların süt verimlerinin de düşük olduğu şeklindeydi. Vücut sıcaklığı bakımından KG ile ÇG hayvanlar karşılaştırıldığında, istatistiki bir fark oluşmamasına rağmen, ÇG hayvanların vücut sıcaklığı ortalamalarının numerik olarak daha yüksek olduğu,

buna karşılık solunum ve kalp frekansları ortalamalarının ÇG hayvanlarda istatistiksel açıdan önemli derecede ( $p<0.05$ ) yüksek olduğu gözlenmiştir.

### Hematolojik Muayene Bulguları

Çalışmada kullanılan hayvanların hematolojik muayene bulguları Tablo 2'de gösterilmiştir. Tablo 2 incelendiğinde; daha düşük LENF yüzdeleri ortalamasına karşılık WBC, EOZ, MON ve NOTR düzeyleri ortalamalarının ÇG hayvanlarda istatistiksel açıdan önemli derecede yüksek, RBC, HB, HCT

ortalamalarının ise KG hayvanlardaki ortalamalarından anlamlı derecede ( $p<0.05$ ) düşük olduğu gözlenmiştir.

### Biyokimyasal Analiz Bulguları

KG ile karşılaştırıldığında, ölçümü yapılan AST ve GGT enzim düzeyleri ile TB ve DB konsantrasyonu ortalamalarının ÇG hayvanlarda yüksek, buna karşılık GLU, TP, ALB, BUN ve KREA düzeylerinin ise düşük ve aradaki farkların istatistiki açıdan önemli ( $p<0.05$ ) olduğu saptanmıştır (Tablo 3).

**Tablo 1.** Klinik muayene bulguları

**Table 1.** Findings of the clinical examinations

Grup/Semptom	KG (n=23)	ÇG (n=23)	P değeri
Çene veya karın altında ödem	-	-	-
İshal	-	+, (n=1)	-
Dışkıda <i>Fasciola spp.</i> varlığı	-	+, (n=23)	-
Vücut sıcaklığı ortalamaları (T°C)	38.1± 0.20	38.5± 0.00	
Kalp frekansı ortalamaları (frekans/dk)	68.2± 3.00	77.2± 4.00	*
Solunum frekansı ortalamaları (frekans/dk)	25.2± 0.20	34.3± 1.20	*

\*:  $p<0.05$ , KG: Kontrol grubu, ÇG: Çalışma grubu, (-): Tespit edilmedi, (+): Tespit edildi.

**Tablo 2.** Gruplara ait hematolojik muayene bulguları

**Table 2.** Hematologic examination findings of the groups

Grup/ Parametre	WBC (/mm <sup>3</sup> )	RBC (/mm <sup>3</sup> )	HB (g/dl)	HCT %	LENF %	NOTR %	EOZ %	MON %	BAS %
	Mean± SEM	Mean± SEM	Mean± SEM	Mean± SEM	Mean± SEM	Mean± SEM	Mean± SEM	Mean± SEM	Mean± SEM
KG	8.23±1.16	8.24±1.46	10.20±1.18	27.20±1.32	56.18±2.10	41.10±2.30	2.00±1.00	1.00±0.00	0.01±0.00
ÇG	11.04±1.34	5.21±1.18	6.28±2.10	18.32±2.22	33.24±3.10	54.24±3.10	8.20±2.10	4.20±1.10	0.01±0.00
<b>P değeri</b>	***	***	***	**	***	***	***	***	*

\*:  $p>0.05$ , \*\*:  $p<0.05$ , \*\*\*:  $p<0.01$ , KG: Kontrol grubu, ÇG: Çalışma grubu

**Tablo 3.** Gruplara ait kan biyokimyasal analiz bulguları

**Table 3.** Blood biochemical analysis findings of the groups

Grup/ Parametre	AST (IU/L)	GGT (IU/L)	TP (g/L)	ALB (g/L)	GLU (g/L)	BUN (mmol/L)	KREA (µmol/L)	TB (µmol/L)	DB (µmol/L)
	Mean± SEM	Mean± SEM	Mean± SEM	Mean± SEM	Mean± SEM	Mean± SEM	Mean± SEM	Mean± SEM	Mean± SEM
KG	84.16±10.20	36.24±3.18	78.12±2.34	33.43±0.44	64.48±2.24	1.58±0.32	56.13±2.22	2.85±0.40	1.12±0.04
ÇG	178.18±12.30	74.02±4.16	65.47±3.26	21.60±0.28	43.38±3.14	2.22±0.30	74.32±3.16	4.02±0.53	2.68±0.05
<b>P değeri</b>	***	***	**	**	***	*	**	**	*

\*:  $p>0.05$ , \*\*:  $p<0.05$ , \*\*\*:  $p<0.01$ , KG: Kontrol grubu, ÇG: Çalışma grubu

## TARTIŞMA

Çalışmamızın başlangıcında fascioliasis etkenleri tespit etmek amacıyla dışkı taramaları yaptığımız 127 hayvandan 23 tanesinde etken tespit etmemiz, hastalığın görülme sıklığının %18.1'lik bir oranda olduğunu göstermektedir. Küçük çapta bir prevalans çalışması olarak kabul edildiğinde, çalışmanın yapıldığı bölgede daha önceleri koyunlarda yapılan prevalans çalışmasına rastlayamadığımızdan, elde ettiğimiz bu oranı, karşılaştırma imkanımız da olmamıştır. Ancak gaita muayenesi ile fascioliasis etkeni tespitine dayalı daha önceleri yapılan çalışmalarda hastalığın görülme sıklığı; İstanbul, Samsun ve Ordu, Konya, Elazığ, Van, Trakya bölgesi, Kırıkkale, Şanlıurfa bölgelerinde sırasıyla %6, %18.1-30.2, %12.9, %16.1, %0.3-15.9, %3.9-95, %0.6 ve %1.9 olarak bildirilmiştir (Denizhan ve Biçek 2018). Bu verilerden de anlaşılacağı üzere enfeksiyonun prevalansı bölgelere göre büyük farklılıklar göstermektedir. Bu farklılığın en önemli nedenleri hayvanların yetiştirme tarzı ve barındırıldıkları alan, iklim ve mevsimdir (Blood ve Radostits 2007). Nitekim, yağışlı mevsimlerden sonra, sular altında kalan meralarda, 10 ila 25 °C arasındaki sıcaklıkta ve düşük rakımda yetiştirilen hayvanlarda yapılan bir araştırmada (Andrews, 1999), anılan koşullarda arakonakçılarının popülasyonlarının arttığı ve bu meralarda yetiştirilen hayvanlarda fascioliasisin yüksek insidenste seyrettiği bildirilmiştir. *Fasciola spp.* prevalansının yağmurları takiben kanal boylarında yetişen otlara tutunan serkerlerin ve salyangoz sayılarının artmasıyla doğrudan ilişkilidir (Paz-Silva ve ark. 2003). Yağmurlu havaların hüküm sürdüğü iklimlerde fascioliasisin prevalansı hakkında farklı veriler rapor edilmekle birlikte, etkenlerin ve arakonakçıların özellikle nemli ve bulutlu iklim koşullarında daha uzun süre yaşadıkları bildirilmiştir (Mamun ve ark. 2011). Çalışmanın yapıldığı Afyonkarahisar İli önceleri kurak bir iklime sahip olmakla birlikte, özellikle son zamanlarda yapılan baraj sayısındaki artışa ve iklimsel değişikliklere paralel olarak, sürekli yağmurların hüküm sürdüğü ve bulutlu havaların yoğun görüldüğü bir yer haline gelmiştir. Ayrıca, çalışmanın materyalini oluşturan hayvanların otlaklara salınması ve bu otlakların su kaynaklarına yakın olmaları, bu parazit ile ilgili saptadığımız prevalansı açıklamaya yardımcı olmaktadır.

Yaptığımız çalışmada KG ve ÇG arasında vücut sıcaklığı açısından istatistiki açıdan önemli bir fark gözlenmemekle birlikte, kalp ve solunum frekanslarının istatistiksel açıdan önemli derecede artmış olması, solunumun kompenzasyonuna bağlanabilir. Nitekim, hematolojik muayenelerde RBC sayısı ortalamasının ÇG hayvanlarda önemli derecede düşük ve buna HB ve HCT düzeylerinin eşlik ettiği açıkça görülmektedir. Bizim bulduğumuz sonuçlara benzer şekilde, fascioliasisle doğal enfekte 214 koyunda yapılan bir çalışmada, Haroun ve ark. (2009), RBC, HCT ve HB sayılarının azaldığı, normositik-

nomrokronik bir anemi ve bu hayvanlarda lökositoz ile birlikte eozinofili tablosunun geliştiğini bildirmişlerdir.

Araştırmamızda KG ile karşılaştırıldığında, WBC, NOTR, MON ve EOZ düzeylerinin ÇG grubu hayvanlarda oldukça yüksek olduğu ve eozinofili tablosunun hakim olduğu dikkati çekmiştir. Öyle ki, Akisü ve ark. (2004), fascioliasis enfestasyonunda EOZ sayısındaki artışını, oldukça yüksek bir oranda, %50 olarak bildirmişlerdir. (2009). Ayrıca bu çalışmadan elde ettiğimiz tüm bu hematolojik bulgular, fascioliasisli hayvanlarda LENF düzeylerinin azaldığı, buna karşılık EOZ, NOTR, MON ve WBC düzeylerinin artış gösterdiğini bildiren araştırmacıların (Resende ve ark. 2007) saptadıkları bulgular ile tam bir uyum içerisinde.

Bu çalışmada KG hayvanlar ile karşılaştırıldığında; AST ve GGT enzim düzeyleri ile TB ve DB konsantrasyonları ortalamalarının ÇG hayvanlarda anlamlı derecede yüksek, buna karşılık GLU, BUN, KREA, TP ve ALB düzeyleri ortalamalarının ise önemli derecede düşük olduğu saptanmıştır. Matanovic ve ark. (2007), ölçümünü yaptığımız bazı parametreler açısından elde ettiğimiz bulgulara benzer sonuçlar bildirmelerine rağmen, farklı olarak, AST düzeyinde anlamlı bir azalma şekillendiğini iddia etmişlerdir. Hodzic ve ark. (2013) ise, fascioliasis olgularında AST düzeylerinin önemli bir değişim göstermediğini bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz yüksek AST düzeyleri bu yönüyle, bu araştırmacıların bulguları ile farklılık arz ederken, fascioliasis enfeksiyonu sırasında AST dahil karaciğer enzimlerinde yükselme olabileceğini bildiren diğer araştırmacıların (Scott ve ark. 2005, Mert ve ark. 2006, Emir ve ark. 2013) bulgularıyla uyum göstermektedir.

Swarupd ve ark. (1986), fascioliasis invazyonu sırasında TP düzeylerinin değişmediğini bildirmelerine rağmen, yaptığımız çalışmada KG ile karşılaştırıldığında enfekte hayvanların TP düzeylerinin önemli derecede azaldığı saptanmış ve bu azalmanın sebebi olarak, TP fraksiyonlarından birisini oluşturduğu için, ALB düzeylerindeki azalmaya bağlanmıştır.

Mevcut çalışmamızda klinik bakıda sarılık tablosu gözlenmemesine ve biyokimyasal muayenelerde her iki grup ortalamalarının fizyolojik sınırlar içerisinde (Blood ve Radostits 2007) bulunmasına rağmen, TB ve DB düzeyleri ortalamalarının ÇG hayvanlarda istatistiksel açıdan önemli derecede yüksek olduğu gözlerden kaçmamıştır. Benzer bulguları daha önceleri tespit eden Hodzic ve ark. (2013), bu durumun fascioliasis etkenlerinin salgıladıkları hemolitik toksinlerden ve hastalığın seyri sırasında safra sisteminin gördüğü hasardan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

## SONUÇ

Bu çalışmada elde ettiğimiz bulgular ışığında, koyunlarda fascioliasis enfeksiyonu ile ilgili klinik bulguların hastalığın tanısında her zaman yeterli olamayacağı, ayrıca iklimsel değişiklikler göz önüne alındığında, fascioliasisin tüm tedavi imkanlarına rağmen hala yüksek sayılabilecek bir insidansa sahip olduğu, hayvanların sağlık durumlarının tespitinde ve enfeksiyondan ne derecede etkilendiğinin belirlenmesinde, fasciolazisin erken tanı, tedavi ve prognozunda hematolojik ve biyokimyasal parametrelerin ölçümlerinin oldukça değerli katkılar sağlayabileceği sonucuna varılmıştır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma AKUHADYEK B. 30. 2. AKU.0.A2.00.00/204 sayılı referans numarasıyla, Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (AKUHADYEK) etik kuralları çerçevesinde yürütülmüştür.

## KAYNAKLAR

- Akısü Ç, Meral M, Delibaş SB, Güngör Ö, Aksoy Ü, Sağol Ö, Tankurt E. Fasciolosis; a case with eosinophilic granuloma in the liver . Türkiye Klinikleri J Gastroenterohepatol. 2004; 15: 89-92.
- Andrews SJ. The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: Dalton J. (Ed.). Fasciolosis. CAB International, New York, USA, 1999; pp.1-20.
- Blood DC, Radostits OM. Veterinary Medicine. Bailliere Tindall, London, UK, 2007.
- Cawdery M, Ruane M. Sedimentation method for the demonstration of the eggs of *Fasciola hepatica* in faeces. Lab Pract. 1971; 20: 935-941.
- Denizhan V, Biçek K. Van İli ve Bazı İlçelerinde Koyunlarda *Fasciola hepatica*'nın Seroprevalansı. Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg. 2018; 13(3): 278-284.
- Emir S, Yazar MF, Sözen S, Altınsoy HB, Bulut HT , Özkan Z. *Fasciola Hepatica*'ya bağlı olarak gelişen akut kolanjit ve pankreatit: Olgu Sunumu. ADÜ Tıp Fak Derg. 2013; 14(3):27-29
- Haroun EM, Gadir AH, Gameel AA. Studies on naturally-occurring ovine fascioliasis in the Sudan. J Helminthol. 1986; 60(1): 47-53.
- Hawkins CD. The use of haemoglobin, packed-cell volume and serum sorbitol dehydrogenase as indicators of the development of fascioliasis in sheep. Vet Parasitol. 1984; 15:125-133.
- Hodzic A, Zuko A, Avdic R, Alic A, Omeragci J, Jazic A. Influence of *Fasciola hepatica* on serum biochemical parameters and vascular and biliary system of sheep liver. Iranian J Parasitol. 2013; 8(1):92-98.
- Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF. Nelson textbook of pediatrics, 18th ed. WB Saunders Elsevier, Philadelphia, USA, 2007.
- Mamun MA, Bhuiyan MJU, Zinnah MA, Hassan MM, Atikuzzaman M, Uddin MB. Ruminantlarda *Fasciola sp.* enfeksiyonunun prevalansı. Eurasian J Vet Sci. 2011; 27(4): 241-244.

Matanovic K., Severin K., Martinkovic F. Simpraga M, Janicki Z. Barisic J. Hematological and biochemical changes in organically farmed sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. Parasitol Res. 2007; 101: 1657-61.

Mert H, Kozat S, Ekin S, Mert N, Yörük I. Serum sialic acid, lipid-bound sialic acid levels in sheep naturally chronic infected with *Fasciola hepatica*. Sag Bil Derg. 2006; 9: 40-46.

Moghadami M, Mardani M. *Fasciola hepatica*: a cause of obstructive jaundice in an elderly man from Iran. Saudi J Gastroenterol . 2008;14(4): 208-210.

Mulcahy G, O'Connor F, Clery D, Hogan SF, Dowd AJ, Andrews SJ, Dalton JP. Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. Res Vet Sci. 1999; 67:27-33.

Odabaşı H, Yıldız M, Eriş C, Abuoğlu H, Günay E, Özkan E, Müftüoğlu T. *Fasciola hepatica* tanısında endosonografinin rolü. Gastrointest Endosc. 2014; 22 (1):21-24.

Özkan AT, Korkmaz M, Kuman A, Ayçiçek H, Tanyüksel M. Fascioliasis tanısında erişkin antijeni ile PBS ve RPMI 1640'da elde edilen ekskresyon/sekresyon antijenlerinin Elisa yöntemiyle karşılaştırılması. Türk Hij Den Biyol Derg. 2005; 62 (1-3):1 -26.

Paz-Silva A, Sanchez-Andrade R, Suarez JL, Pedreira R, Arias M, Lopez C, Panadero R, Diaz P, Diez Bonos P. Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. Parasitol Res. 2003; 91: 328.

Resende COT, Hirsch CS, Toossi Z, Dietze R, Ribeiro-Rodrigues R. Intestinal helminth co-infection has a negative impact on both anti-*Mycobacterium tuberculosis* immunity and clinical response to tuberculosis therapy. Clin Experim Immunol. 2007; 147(1): 45-52.

Scott PR, Sargison ND, Macrae A, Rhind SR. An outbreak of subacute fasciolosis in Soay sheep: Ultrasonographic biochemical and histological studies. The Vet J. 2005; 170(3): 325-331

Swarup D, Upadhyays DS, Pachauri SP. Some biochemical indices in naturally occurring fascioliasis in goats. Res Vet Sci. 1986; 40(2): 276-277.

Tınar R. Veteriner Helmintholoji. Dora Basım-Yayın Ltd. Şti., Bursa, 2011.

Vercelli-Retta J, Lagios MD, Chandrasoma P. *Fasciola hepatica* and parasitic eosinophilic granuloma of the liver. Am J Surg Pathol 2002; 26(9): 1238.

## Effects of Prepartally Supplements of Vitamins and Trace Elements on Total Antioxidant and Oxidant Status and Udder Health Parameters on Day 14 Postpartum in Holstein-Friesian Cows

Serdal KURT<sup>1</sup>, Seçkin SALAR<sup>1</sup>, Şükrü KÜPLÜLÜ<sup>1</sup>, Ayhan BAŞTAN<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, 06110, Ankara, Turkey

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of prepartally injections of antioxidants on total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) and udder health parameters on day 14 postpartum in Holstein-Friesian cows. Sixty-eight multiparous cows were divided into treatment (TRE; n=33) and control (CON; n=35) groups. Injections of vitamins (A, D and E) and trace elements (Se, Cu, Zn and Mn) were administered intramuscularly to cows into the TRE group on 21±5 and 10±5 days prepartum. Blood and milk samples were collected to evaluate beta-hydroxybutyric acid (BHBA), TAS, TOS and udder health (somatic cell count (SCC), total bacterial count (individual bacteria count (IBC) and colony formation unit (CFU)). TAS levels were higher in the TRE group than the CON group. And TOS levels were lower in the TRE group than the CON group (P<0.001). Cows in the TRE group had lower SCC than the cows in the CON group (p=0.042). In conclusion, prepartally supplements of antioxidants were effectively reduced levels of serum TOS and SCC and increased levels of serum TAS. But, it was detected that it did not affect on IBC and CFU levels.

**Keywords:** Antioxidant, cows, somatic cell count, total bacteria count, udder health.

\*\*\*

### Holstein-Friesian İneklerde Prepartal Vitamin ve İz Element Takviyelerinin Postpartum 14. Günde Toplam Antioksidan ve Oksidan Durumları ve Meme Sağlığı Parametreleri Üzerine Etkileri

### ÖZ

Bu çalışmanın amacı, Holstein-Friesian ırkı ineklerde prepartal vitamin ve iz element enjeksiyonlarının postpartum 14. günde toplam antioksidan ve oksidan seviyeleri (TOS ve TAS) ile meme sağlığı parametreleri üzerine etkilerinin değerlendirilmesiydi. Altmış sekiz multipar inek tedavi (TED; n=33) ve kontrol (KON; n=35) grubu olarak ikiye ayrıldı. TED grubundaki ineklere prepartum 21±5 ve 10±5 günlerde intramuskuler vitamin (A, D, E) ve iz element (Cu, Zn, Se, Mn) enjeksiyonları yapıldı. Beta hidroksi bütirik asit (BHBA), TOS ve TAS ile meme sağlığını (somatik hücre sayısı (SHS)), toplam bakteri sayısı (bireysel bakteri sayısı (BBS) ve koloni oluşturan birim (KOB)) değerlendirmek için kan ve süt örnekleri toplandı. TAS seviyesi kontrol grubuna göre tedavi grubunda daha yüksek bulunurken TOS seviyesi daha düşük bulundu. Tedavi grubundaki ineklerin SHS'leri, kontrol grubundakilerden daha düşüktü (p=0.042). Sonuç olarak, prepartal antioksidan takviyelerinin serum TOS ve süt SHS seviyelerini etkili bir şekilde düşürdüğü ve serum TAS seviyesini artırdığı görüldü. Ancak BBS ve KOB seviyelerine etki etmediği tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan, inek, meme sağlığı, somatik hücre sayısı, toplam bakteri sayısı.

To cite this article: Kurt S, Salar S, Küplülü Ş, Baştan A. Effects of Prepartally Supplements of Vitamins and Trace Elements on Total Antioxidant and Oxidant Status and Udder Health Parameters on Day 14 Postpartum in Holstein-Friesian Cows. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):322-328

Submission: 21.05.2019 Accepted: 23.08.2019 Published Online: 29.08.2019

ORCID ID; SK: 0000-0002-0191-3245, SS: 0000-0001-9303-6253, ŞK: 0000-0001-7488-9736, AB: 0000-0001-8291-1147

\*Corresponding author e-mail: abastan@ankara.edu.tr

## INTRODUCTION

Vitamins and trace elements are antioxidant substances and they play a role in the body's antioxidant defense system (Sen and Chakraborty 2011). Antioxidants are defined as substances that inhibit oxidative damage (Abuelo et al. 2015) and are obtained in two different ways as endogenous (enzymatic and non-enzymatic) and exogenous (Sen and Chakraborty 2011). The most common antioxidant substances which exogenously obtained are vitamin A, vitamin E, vitamin D, vitamin C, selenium (Se), copper (Cu), manganese (Mn) and zinc (Zn) (Mavangira and Sordillo 2018). Exogenous antioxidant substances have also clinical importance because they are used in the structure of endogenous antioxidants (superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) and catalase (CAT)) (Sen and Chakraborty 2011). Oxidant substances (free radicals) generally classified into two categories as reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) (Lykkesfeldt and Svendsen 2007). They are produced as natural by-products during the conversion of foods into a form of ATP using O<sub>2</sub> in the mitochondria (Mavangira and Sordillo 2018). But, ROS (such as RO<sub>2</sub>·, RCOO<sub>2</sub>·, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HO<sub>2</sub>·, HO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, O<sub>3</sub>) are the most abundant oxidant substances in biological systems (Puppel et al. 2015). ROS are reduced to a new molecule such as H<sub>2</sub>O by antioxidant substances, or they are enzymatically repaired by antioxidants. ROS are reduced to a new molecule such as H<sub>2</sub>O or they are enzymatically repaired by antioxidants (Sordillo and Aitken 2009). But, when the production of free radicals exceeds the antioxidants defense capacity, oxidative stress occurs (Batistel et al. 2018). It has been reported that oxidative stress impairs cells' structures (especially immune cells) by damaging their macro components such as DNA, lipid and protein (Kuhn et al. 2018). In addition, it is known that excessive oxidative stress can cause pathologic disorders of tissue and organ. These pathologic disorders begin with function, activity and immunological deficits particularly in the heart, skeletal muscle, liver and blood cells that require high energy (Puppel et al. 2015). The periparturient periods are critical for oxidative stress in dairy cows. The use of O<sub>2</sub> during the transition period in the cows increases due to the acceleration of metabolic activities (Castillo et al. 2005). Moreover, the cows enter a negative energy balance (NEB) because of increased metabolic demands in this period (Abuelo et al. 2015). NEB induces more lipolysis that gives rise to increased ROS production and results in enhanced blood non-esterified fatty acids (NEFA) (Song et al. 2014) and beta-hydroxybutyric acid (BHBA) concentrations (Wankhade et al. 2017). Therefore, the oxidant concentration significantly increases while the total antioxidant capacity decreases with antioxidant

overuse during this period (Mavangira and Sordillo 2018). It was reported that inadequate levels of antioxidants result in leukocyte dysfunction and then health problems are enhanced (Sordillo and Aitken 2009, Mavangira and Sordillo 2018). Furthermore, it is known that udder health is affected negatively in the case of oxidative stress (Abuelo et al. 2015).

For these reasons, antioxidant administrations have clinical importance in the periparturient period (Spears and Weiss 2008). Therefore, this study was aimed to evaluate the effect of prepartally injections of some vitamins and trace elements on total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) of serum samples and udder health parameters involving in SCC and total bacteria count (individual bacteria count (IBC) and colony formation unit (CFU)) on day 14 postpartum in Holstein-Friesian cows.

## MATERIAL and METHODS

### Animals, Housing, Diets and Management

Sixty-eight pregnant multiparous Holstein-Friesian dairy cows were used in this study. The farms were visited before starting the study and the cows used were selected from the Holstein-Friesian cows which in the dry period and without any clinical disease, then they were divided into treatment (TRE; n=33) and control (CON; n=35) groups by the randomized grouping method. The cows were managed in free-stall barns, were fed according to their individual needs with a total mix ration (TMR) and had free access to water. Chemical analysis of TMR into far-off, close up and fresh periods were done according to the AOAC method (Joel, 1990; Table 1). Milk yield of the previous lactation (305-d) and lactation number of the cows in both groups were similar (p>0.05; Table 2). The cows were milked with an automatic milking system twice daily. The herds had periodic systematic vaccination and controlled health monitoring programs.

### Experimental Design

This study was conducted between December 2018 and March 2019. In this study, 8 ml of solution (Ademin®, Ceva) containing vitamins A, D and E (500,000 I.U. of vitamin A, 75,000 I.U. of vitamin D and 50 mg of vitamin E per ml) and 10 ml of solution (Activate®, Alke) containing Se, Cu, Zn and Mn trace elements (2.5 mg of copper gluconate, 1.25 mg of sodium selenite, 5 mg of manganese gluconate, 5 mg of zinc gluconate per ml) were administered intramuscularly (im) using a 18-G cannula to each cow into the TRE group on 21±5 and 10±5 days before expected parturition (280 days) (Figure 1). In the CON group, it was performed the same amounts of saline injections as a placebo to each cow.

### Sampling and Laboratory Analysis

Blood samples (9 ml) were collected from the coccygeal vein into vacutainer tubes (Hema & Tube®) containing clot activator at postpartum 14<sup>th</sup> days. The blood samples were centrifuged (Nüve, NF 200 centrifuge®) at 1.500g and 4°C for 10 min within 1 h after the sampling and serum were stored at -20°C until analyses. Milk samples (10 ml) were collected to a sterile falcon equally from 4 lobes of udder on 14th days postpartum. The samples were kept chilled on ice-packs immediately during collection and were transported to the laboratory +4°C for analyses within 8 hours. TOS and TAS were measured using autoanalyzer (Erba XL 600®) and commercial kits (LOT: OK18104O and OK18095A respectively, Rel Assay Diagnostics, Gaziantep). Milk SCC and total bacterial count (IBC and CFU) was determined by an automated fluorescent microscopic somatic cell counter (Bentley IBC-M®; Bentley Instruments Inc., Chaska, MN, USA). And also, BHBA levels were measured instantly using a hand-held meter (Vet TD-4235, Hasvet®, Turkey)  $\beta$ -ketone monitoring system and commercial kits (LOT: WK18D923-B0E) on day 14th postpartum.

### Statistical Analysis

Kolmogorov-Smirnov and Levene test were used for normality and homogeneity of variance of data, respectively. When data were not distributed normally, logarithmic conversions ( $\log_{10}$ ) were done. Independent sample t-test was used to compare means of all variables. Results were presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean ( $\bar{x} \pm$  SEM). SPSS 14.01 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA; License No: 98692604) software package program was used for all statistical analyses.  $P < 0.05$  was considered as significant.

## RESULT and DISCUSSION

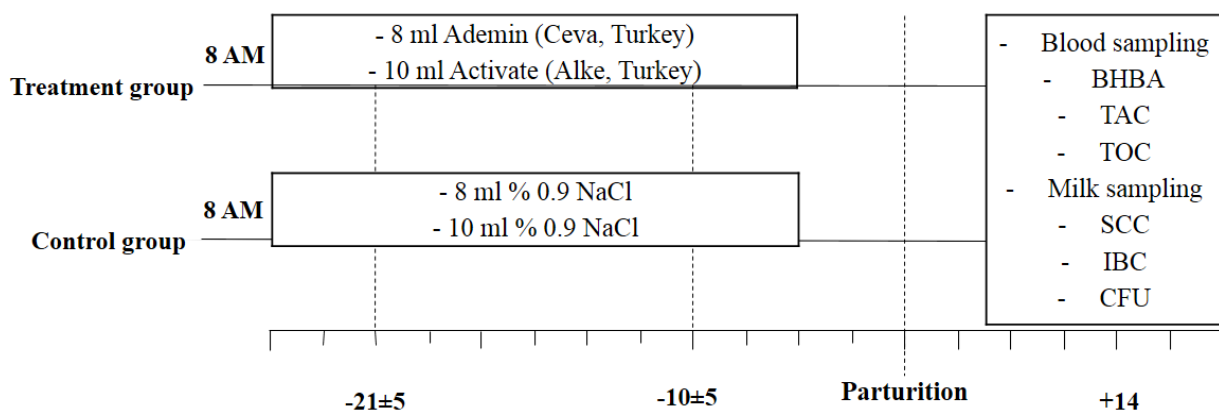
Beta-hydroxybutyric acid levels were found similar in the TRE ( $0.66 \pm 0.08$  mmol/L) and CON ( $0.88 \pm 0.19$  mmol/L) groups ( $p = 0.186$ ). Results from this study showed that prepartally supplements of vitamins and trace elements were effectively decreased levels of TOS ( $p < 0.001$ ) and were effectively increased levels of TAS ( $p = 0.036$ ; Table 3). And also, it was detected that it can be used to reduce the incidence and damage of oxidative stress in dairy cows.

The SCC level in the TRE group ( $559.94 \pm 199.88$  cells/ml) had lower than the CON group ( $1173.03 \pm 321.32$  cells/ml) ( $p = 0.042$ ). However, IBC level in the TRE group ( $771860.82 \pm 324756.90$ ) was similar compare to the CON group ( $658889.71 \pm 289864.33$  IBC/ml). Also, CFU levels were found similar the TRE group ( $228.58 \pm 93.38$ ) and the CON group ( $186.17 \pm 80.19$  CFU/ml) ( $p > 0.05$ ; Table 4).

Free radicals play an important role in the host immune system and low levels of ROS are required for antibacterial activities of neutrophils (Andrei et al. 2011). It was reported that when more than normal of ROS is produced if there are not enough antioxidant substances in the body, pathologies of organ and tissue occur as a consequence of oxidative damage (Lykkesfeldt and Svendsen 2007). *Dairy cows are vulnerable to oxidative stress, particularly during the transition period.* Some researchers described that the production of ROS and the use of antioxidants substances are importantly increased due to increased metabolic activity in the periparturient period (Spears and Weiss 2008, Sordillo and Aitken 2009). Moreover, Song et al., (2014) reported that ROS generation increases due to increased lipolysis as a consequence of NEB during the transition period. Blood concentration of BHBA is directly proportional to NEB (Barletta et al. 2017). In our study, however, BHBA levels were found similar in the TRE and CON group ( $p = 0.186$ ). Therefore, this result showed that the effect of lipolysis on the production of ROS was homogenous in both groups. Antioxidant supplementation has improving effects on the health and performance of dairy cows (Spears and Weiss 2008, Abuelo et al. 2016). In other words, antioxidant administrations can be used to diminish the destructive effects of excessive ROS generation (Abuelo et al. 2016). For this reason, antioxidant supplementation can be performed by the addition of vitamins, minerals and trace elements to the diet of the cows, especially in the form of premixes added to the TMR. Besides, it can be done with commercial vitamins and trace element injections for facilitating the supplementation without requiring particular management (Abuelo et al. 2015). Many researchers have reported that when trace elements are used as feed additives in organic form, more positive results are obtained than other approaches (Ballantine et al. 2002, Andrieu 2008, DeFrain et al. 2009). It is stated that this is due to interactions in the gastrointestinal tract (Gressley 2009). Previous studies showed that positive results were obtained with parenteral supplementation of commercial formulations of vitamins and trace elements with antioxidant properties in dairy cows. However, in order to compare the effectiveness of administration of the organic or inorganic forms as well as of feed additives or injections, more detailed studies on antioxidant supplementation methods should be carried out especially during the transition period in which changes in the gastrointestinal environment and pH due to ration changes. Although it is suggested that TAS and TOS can be effective in monitoring the feeding status (Mandebvu et al. 2003) and some diseases in dairy cows (Atakisi et al. 2010), the results may vary depending on the measurement method (Andrei et al. 2016) and the feeding differences (Mandebvu et al. 2003). TAS represents the sum of all the antioxidants present in serum (Castillo et al. 2005,

Lykkesfeldt and Svendsen 2007). TAS levels significantly decrease during early lactation and dairy cows have a low antioxidant defense in this period (Gong and Xiao 2016). It was reported that prepartum antioxidant administrations increase serum TAS in cows (Omur et al. 2016). Omur et al. (2016) reported that administration of vitamin (A, D and E) and trace element (Se, Cu, Mn, Zn) combinations in three weeks before parturition caused an increase in the total antioxidant capacity and a decrease in the total oxidant capacity in three weeks after parturition. In our study, it was found that administrations of vitamins and trace elements on  $21\pm 5$  and  $10\pm 5$  days before parturition were increased the level of TAS ( $P=0.036$ ) while decreasing TOS ( $P<0.001$ ) level in two weeks after parturition. Oxidative stress is associated with many health disorders and it may cause impairment of udder health which has economic importance in dairy cows (Turk et al. 2017). It was reported that milk SCC reflects udder health and administration of trace elements parenterally (Se, Cu, Zn and Mn) improve udder health by reducing SCC in dairy cows. (Abuelo et al. 2015). Yang and Li (2015) reported that supplements of some antioxidant (vitamin A, B, C, E and  $\beta$ -carotene, Se, Zn and Cu) successfully prevent mastitis. Antioxidant administrations increase the bactericidal and phagocytic activity of immune cells and decrease the SCC rate in dairy cows (Yang and Li 2015). It was stated that injections of vitamin E about 10 and 5 d before parturition increased neutrophil  $\alpha$ -tocopherol concentrations in the periparturient period in cows. In addition, it was also reported that vitamin E and Se supplementations improve the bactericidal activity of neutrophils and at the same time, Se administration reduce the bacterial CFU in milk (Hogan et al. 1993).

The administration of combinations or separately of vitamins and trace elements has significant effects synergistically on the improvement of udder health (Yang and Li 2015). In our study, it was determined that prepartally supplementation of vitamins and trace elements decreased SCC (47.73%) significantly in the TRE group compared to the CON group ( $P = 0.042$ ) and therefore it had a positive effect on udder health. In contrast to similar studies, however, no significant difference was found in levels of milk IBC and CFU ( $p>0.05$ ) when compared the TRE group to the CON group. The reason for this situation is thought that the dominant type of bacteria responsible for mastitis is *Staphylococcus aureus*. Reduction in the SCC may be interpreted as a decrease in the severity of inflammation due to intramammary infection rather than bacteriological recovery. Although antioxidant supplementations can improve the function of immune system cells, the bacteriological recovery rate is insufficient because bacteria such as *S. aureus* have the ability to escape from immune system cells and even the ability living intracellularly in macrophages and in alveolar cells (Batistel et al. 2018). In addition, the SCC level according to the bacterial species is significantly different. Therefore, the SCC threshold value has a different level of specificity and sensitivity depending on the type of bacteria (Petzer et al. 2017). Similarly, SCC is an effective indicator in determining the presence of intramammary infection, but it is not sufficient to the evaluation of the difference in mastitis pathogen because correlation level of differences between SCC and total bacterial count (IBC and CFU) varies according to the type of pathogen (Junior et al. 2012).



**Figure 1.** Prepartum supplements of vitamins and trace elements and parameter measurement on day 14th postpartum in Holstein dairy cows



**Table 1.** Ration content (100% dry matter basis) of cows in two groups in the dry period (Far-off and Close-up) and fresh period

	Far-off	Close-up	Fresh
Crude Protein	14,29	16,53	16,48
Crude Ash	6,76	6,68	7,04
Fiber	20,46	21,20	20,93
Fat	2,90	2,34	2,59
Starch	6,76	20,37	22,78
Nel	1495,56	1508,93	1513,39
Ndf	38,80	38,23	36,85
ADF	20,27	18,03	20
ADL	5,79	5,84	5,93
MEX1	2540,42	2553,62	2564,54

Nel: Dietary value of net energy, Ndf: Neutral detergent fiber, ADF: Acid detergent fiber, ADL: Acid detergent insoluble lignin, MEX1: Energy that can be metabolized.

**Table 2.** Comparison of descriptive data in both groups

	Treatment (n:33; Mean±SEM)	Control (n:35; Mean±SEM)	P
Milk yield of the previous lactation (L)	10374.88±452.13	11374.26±582.92	0.184
Number of lactation	3±0.21	3.51±0.21	0.097

**Table 3.** Comparison of the levels of total oxidant status (TOS) and total antioxidant status (TAS) of serum samples in both groups

	Treatment (n:33; Mean±SEM)	Control (n:35; Mean±SEM)	P
TOS (µmol/L)	9.65±0.51	13.6±0.46	<0.001
TAS (mmol/L)	2.46±0.02	2.39±0.02	0.036

**Table 4.** Comparison of udder health parameters in both groups

	Treatment (n:33; Mean±SEM)	Control (n:35; Mean±SEM)	P
SCC (x10 <sup>3</sup> cells/ml)	559.94±199.88	1173.03±321.32	0.042
IBC (ibc/ml)	771860.82±324756.90	658889.71±289864.33	0.554
CFU (cfu/ml)	228.58±93.38	186.17±80.19	0.674

SCC: Somatic cell count, IBC: Individual bacteria count, CFU: Colony formation unit.

## CONCLUSION

Cows supplemented parentally with vitamin (A, D and E) and trace elements (Se, Zn, Cu and Mn) before parturition showed improved udder health, TAS and TOS levels in the second weeks of lactation, thus decreasing effects of oxidative stress on health in

dairy cows. But, milk bacteria count was not affected by antioxidant administrations. Further studies are needed to investigate in more detail the effects of antioxidant administrations on milk bacterial populations.

## ACKNOWLEDGEMENT

Ankara University-Scientific Research Projects (BAP)  
Coordinator project number: 18L0239022.

This article was produced from the Ph.D. thesis titled  
*Investigation Effect of Prepartum Antioxidant  
Administration on Oxidative Stress Energy Metabolism and  
Colostrum Quality in Cows' which belongs to Serdal Kurt.*

This article was presented as abstract in 1st International  
Congress of Farm Animal Medicine

Ethical Committee: 2019-7-79

## REFERENCES

- Abuelo A, Hernandez J, Benedito JL, Castillo C.** The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period: revisiting antioxidant supplementation. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2015; 99(6): 1003-1016.
- Abuelo A, Alves-Nores V, Hernandez J, Muino R, Benedito JL, Castillo C.** Effect of parenteral antioxidant supplementation during the dry period on postpartum glucose tolerance in dairy cows. *J vet Intern Med.* 2016; 30(3): 892-898.
- Andrei S, Matei S, Fit N, Cernea C, Ciupe S, Bogdan S, Groza IS.** Glutathione peroxidase activity and its relationship with somatic cell count, number of colony forming units and protein content in subclinical mastitis cows milk. *Rom Biotech Lett.* 2011; 16(3): 6209-6217.
- Andrei S, Matei S, Rugină D, Bogdan L, Ștefanuț C.** Interrelationships between the content of oxidative markers, antioxidative status, and somatic cell count in cow's milk. *J Anim Sci.* 2016; 61(9): 407-413.
- Andrieu S.** Is there a role for organic trace element supplements in transition cow health? *Vet J.* 2008; 176(1): 77-83.
- Atakisi O, Oral H, Atakisi E, Merhan O, Pancarci SM, Ozcan A, Kaya S.** Subclinical mastitis causes alterations in nitric oxide, total oxidant and antioxidant capacity in cow milk. *J Vet Res.* 2010; 89(1): 10-13.
- Ballantine HT, Socha MT, Tomlinson DAD, Johnson AB, Fielding AS, Shearer JK, Van Amstel SR.** Effects of feeding complexed zinc, manganese, copper, and cobalt to late gestation and lactating dairy cows on claw integrity, reproduction, and lactation performance. *PAS.* 2002; 18(3): 211-218.
- Barletta RV, Maturana Filho M, Carvalho PD, Del Valle TA, Netto AS, Renno FP, Sartori R.** Association of changes among body condition score during the transition period with NEFA and BHBA concentrations, milk production, fertility, and health of Holstein cows. *Theriogenology.* 2017; 104(1): 30-36.
- Batistel F, Arroyo JM, Garces CIM, Trevisi E, Parys C, Ballou MA, Loor JJ.** Ethyl-cellulose rumen-protected methionine alleviates inflammation and oxidative stress and improves neutrophil function during the periparturient period and early lactation in Holstein dairy cows. *J Dairy Sci.* 2018; 101(1): 480-490.
- Castillo C, Hernandez J, Bravo A, Lopez-Alonso M, Pereira V, Benedito JL.** Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Vet J.* 2005; 169(2): 286-292.
- DeFrain JM, Socha MT, Tomlinson DJ, Kluth D.** Effect of complexed trace minerals on the performance of lactating dairy cows on a commercial dairy. *PAS.* 2009; 25(6): 709-715.
- Gong J, Xiao M.** Selenium and antioxidant status in dairy cows at different stages of lactation. *Biol Trace Elem Res.* 2016; 171(1): 89-93.
- Gressley TF.** Zinc, copper, manganese, and selenium in dairy cattle rations, In: *Proceedings of the Mid-Atlantic Nutrition Conference*, Ed; Zimmermann NG, 7<sup>th</sup> Ed., College Park, USA. 2009; pp. 56-71.
- Hogan JS, Weiss WP, Smith KL.** Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. *J Dairy Sci.* 1993; 76(9): 2795-2803.
- Joel MP.** Animal feed, In: *Official Methods of Analysis of The Associations of Official Analytic Chemists*, Ed; Kenneth H, 15<sup>th</sup> Ed., Arlington, USA. 1990; pp. 69-88.
- Junior L, Ferreira JE, Lange CC, Brito MAVP, Santos FR, Silva MAS, Souza GND.** Relationship between total bacteria counts and somatic cell counts from mammary quarters infected by mastitis pathogens. *Cienc Rural.* 2012; 42(4): 691-696.
- Kuhn MJ, Mavangira V, Gandy JC, Sordillo LM.** Production of 15-F2t-isoprostane as an assessment of oxidative stress in dairy cows at different stages of lactation. *J Dairy Sci.* 2018; 101(10): 9287-9295.
- Lykkesfeldt J, Svendsen O.** Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J.* 2007; 173(3): 502-511.
- Mandebvu P, Castillo JB, Steckley DJ, Evans E.** Total antioxidant capacity: A tool for evaluating the nutritional status of dairy heifers and cows. *Can Anim Sci.* 2003; 83(3): 605-608.
- Mavangira V, Sordillo LM.** Role of lipid mediators in the regulation of oxidative stress and inflammatory responses in dairy cattle. *Research in veterinary science.* 2018;116(1): 4-14.
- Omur A, Kirbas A, Aksu E, Kandemir F, Dorman E, Kaynar O, Ucar O.** Effects of antioxidant vitamins (A, D, E) and trace elements (Cu, Mn, Se, Zn) on some metabolic and reproductive profiles in dairy cows during transition period. *Pol J Vet Sci.* 2016; 19(4): 697-706.
- Petzer IM, Karzis J, Donkin EF, Webb EC, Etter E.** Validity of somatic cell count as indicator of pathogen-specific intramammary infections. *F S Afr Vet Assoc.* 2017; 88(1): 1-10.
- Puppel K, Kapusta A, Kuczynska B.** The etiology of oxidative stress in the various species of animals, a review. *J Sci Food Agric.* 2015; 95(11): 2179-2184.
- Sen S, Chakraborty R.** The role of antioxidants in human health. *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy.* *JACS* 2011; 1083(1): 1-37.
- Song Y, Li X, Li Y, Li N, Shi X, Ding H, Wang Z.** Non-esterified fatty acids activate the ROS-p38-p53/Nrf2 signaling pathway to induce bovine hepatocyte apoptosis in vitro. *Apoptosis.* 2014; 19(6): 984-997.
- Sordillo LM, Aitken SL.** Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet Immunol Immunop.* 2009; 128(1): 104-109.
- Spears JW, Weiss WP.** Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet J.* 2008; 176(1): 70-76.
- Turk R, Koledic M, Macesic N, Benic M, Dobranic V, Duricic D, Samardzija M.** The role of oxidative stress

and inflammatory response in the pathogenesis of mastitis in dairy cows. *MLJEAU*. 2017; 67(2): 91-101

**Wankhade PR, Manimaran A, Kumaresan A, Jeyakumar S, Ramesha KP, Sejian V, Varghese MR.** Metabolic and immunological changes in transition dairy cows: A review. *Vet World*. 2017; 10(11): 1367.

**Yang FL, Li XS.** Role of antioxidant vitamins and trace elements in mastitis in dairy cows. *J Adv*. 2015; 2(1): 1-9.

## The Effect of Different Additives on Semen Freezing of Aksaray Malaklı Shepherd Dog

Caner ÖZTÜRK<sup>1\*</sup>, Şükrü GÜNGÖR<sup>2</sup>, Halit Furkan DEMİR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine, Reproduction and Artificial Insemination Department, 68100, Aksaray, Turkey

<sup>2</sup>Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Reproduction and Artificial Insemination Department, 15030, Burdur, Turkey

<sup>3</sup>Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine, 68100, Aksaray, Turkey

### ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the spermatological parameters of Aksaray Malaklı shepherd dog after freeze-thawing semen with various additives. Study groups were set up as Tris-based extender (TBE)+trehalose (10mM), TBE+methionine (2mM) and control. Sperm was collected by bulbus glandis massage (Digital Manipulation). Diluted semen samples were aspirated into 0,25 ml French straws and equilibrated at 5 °C for 1,5 h. After equilibration, the straws were frozen in liquid nitrogen vapor, plunged into liquid nitrogen for storage. For determination the sperm volume, grade semen collecting tubes were used and the results were recorded in milliliters. The sperm concentration was determined with hemocytometric method as mm<sup>3</sup>. Eosin-nigrosine staining method was used for live sperm percentages. The HOS-test was performed to determine the ratio of intact spermatozoa membrane. When the freeze-thawing results are statistically examined with one-way analysis of variance, methionine group, motility (52,5%±2,7) and HOS test analysis (43,1%±2,9), (41,5%±3,1; 33,2%±2,9) shown significant differences compared control (41,5%±3,1; 33,2%±2,9) group (p < 0,05). The best result in the live sperm percentages was observed in methionine group but there was no statistically significant difference between the groups (p > 0,05). In the trehalose group, motility, HOS test and live sperm percentages results were 50,0% ± 3,9; 60,6% ± 3,7; 38,4 ± 3,6%, respectively. As a result of the study, it was determined that methionine 2 mM added to tris-based diluent in Aksaray Malaklı shepherd dog sperm was beneficial on spermatological parameters. The cryoprotective effect of methionine was found to be stronger than trehalose and control group.

**Keywords:** Malaklı, methionine, sperm, trehalose

\*\*\*

### Farklı Katkı Maddelerinin Aksaray Malaklı Çoban Köpeği Spermasının Dondurulmasına Etkisi

#### ÖZ

Bu çalışmanın amacı, Aksaray Malaklı çoban köpeği spermasının farklı katkı maddeleri içeren sulandırıcılar ile dondurulup çözümü sonu spermatolojik parametrelerin araştırılmasıdır. Çalışma grupları, Tris ana stok (TAS)+trehaloz (10 mM), TAS+metiyonin (2 mM) ve kontrol olarak oluşturuldu. Köpeklerden sperma digital manipülasyon yöntemi ile alındı. Sulandırma işlemi tamamlanan sperma örnekleri 0,25 ml lik payetlere çekildi. Payetlenen spermalar 1,5 saat +5°C'ta ekilibrasyona tabi tutuldu. Ekilibrasyon sonrası payetler sıvı azot buharında donduruldu ve sıvı azot içerisinde saklandı. Sperma hacminin belirlenmesinde dereceli sperma toplama tüpleri kullanıldı ve sonuçları mililitre olarak kaydedildi. Hemositometrik yöntem ile spermatozoon konsantrasyonu belirlenerek mm<sup>3</sup> olarak kaydedildi. Ölü canlı spermatozoa muayenesi için eosin-nigrosin boyama yöntemi kullanıldı. Spermatozoa plazma membran bütünlüğü oranını belirlemek için Hipo osmotik şişirme (HOS) testi yapıldı. Sonuçlar istatistiksel açıdan tek yönlü varyans analizi ile incelendiğinde çözüm sonu metiyonin grubunda motilite (%52,5±2,7) ve HOS test parametreleri açısından (%43,1±2,9), kontrol grubuna (%41,5±3,1; %33,2±2,9) göre istatistiksel farklılık gözlemlendi (p < 0,05). Çözüm sonu canlı spermatozoa oranına en yüksek metiyonin grubunda ulaşılmasına rağmen gruplar arası istatistiksel farklılık bulunamadı (p > 0,05). Trehaloz grubunda ise motilite, HOS test ve canlı spermatozoa oranı sırasıyla %50,0±3,9; %60,6±3,7; %38,4±3,6 olarak bulundu. Çalışmanın sonucunda Aksaray Malaklı çoban köpeği spermasında tris bazlı sulandırıcıya eklenen metiyonin 2mM dozunun spermatolojik parametreler üzerine faydalı olduğu belirlenmiştir. Metiyoninin kriyoprotektif etkinliğinin trehaloz ve kontrol grubuna göre daha güçlü olduğu kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Malaklı, metiyonin, sperma, trehaloz

To cite this article: Öztürk C. Güngör Ş. Demir H.F. The Effect of Different Additives on Semen Freezing of Aksaray Malaklı Shepherd Dog. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):329-335

Submission: 19.07.2019 Accepted: 23.08.2019 Published Online: 29.08.2019

ORCID ID; CÖ: 0000-0003-0566-0684, SG: 0000-0003-3460-522X, HFD: 0000-0002-6437-2183

\*Corresponding author e-mail: canerozturkvt@gmail.com

## GİRİŞ

Ülkemizde çoban köpekleri Akbaş ve Karabaş olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır. Kangal ırkı köpekler grubunun en ünlü üyesi olmakla beraber Malaklı, Karabaş ve Karakaya ırkı köpeklerde mevcuttur. Malaklı özellikle Aksaray, Şereflikoçhisar ve Nevşehir olmak üzere Türkiye'nin değişik bölgelerinde bulunmaktadır. Malaklı Karabaş köpekleri Kangal ırkına kıyasla daha iri yapılı, kısa kıllı, kuyruk yapısının Kangal köpeğinde olduğu kadar kıvrık olmadığı, insana ve diğer köpeklere karşı daha saldırgan olduğu yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (Atasoy ve ark. 2014). Saf köpek yetiştiriciliğine olan ilginin artmasıyla birlikte yardımcı üreme teknikleri küçük hayvanlarda uygulaması talep edilen yöntemlerden olmuştur (Peña ve ark. 2006). Diğer hayvanlarda olduğu gibi köpek yetiştiriciliğinde de genetik yapının ve gen kaynaklarının korunması büyük önem taşımaktadır. Bunun sağlanabilmesi için ırkın spermatolojik özelliklerinin belirlenmesi ve spermanın katkı maddeleri ile dondurulması çalışmaları uzun yıllardır yapılmaktadır (Tosun ve Uysal 2007).

Dondurulmuş sperma ile suni tohumlama diğer hayvan türlerinde olduğu gibi köpek spermasında da uygulanmaktadır. İlk başarılı dondurma denemesi 1954 yılında Rowson tarafından gerçekleştirilmiştir (England 1992). Köpek spermasının dondurulmasına karşı günümüzde artan bir ilgi gözlenmektedir (Peña ve ark. 2006). Dondurulmuş sperma ile yetiştirme programlarının birçok faydası bulunmaktadır. Bunların en önemlisi üstün ırk özelliklerini taşıyan köpeklerin genetik materyalinin uzun süre saklanabilmesidir (Neagu ve ark.2010). Diğer evcil hayvanlarda olduğu gibi spermanın uzun süreli saklanabilmesi için sıvı nitrojen ile dondurulması en iyi yöntemdir. Bu yöntemle dondurulan spermanın çözüm sonu motilitesi %60-70 arasında değişmekte ve fertilite oranı %60 civarında olmaktadır (Alamo ve ark. 2005).

Serbest radikallerin hücrede artışı ve hücre fonksiyonları üzerinde yaptıkları olumsuz etki (oksidatif hasar) 'oksidatif stres' olarak adlandırılır (Tekcan 2009). Sperma hücrelerinin membran yapısı protein, glikoprotein ve glikolipit içeren iki sıralı fosfolipit katmandan oluşan akıcı mozaik tarzındadır. Bu yapının %70 oranında doymamış fosfolipit içermesi, spermanın dondurulması sırasında dönüşümsüz sıvı fazdan jel fazına geçmesine neden olmaktadır. Bu değişim canlılığı azaltmakta ve sonucunda soğuk şoku ve oksidatif stres kökenli hasarlar gelişmektedir. Oksidatif stres, spermatozoa plazma membran kaybına, fonksiyonlarının zarar görmesi sonucunda motilite ve fertilite düşüşlerine neden olmaktadır (Watson 2000).

Spermatozoonlar normal şartlar altında az miktarda reaktif oksijen türleri (ROT) üretmektedir. ROT'un

spermatozoonun kapasitasyonu, hiperaktivasyonu ve sperma-oosit füzyonu için gerekli olduğu belirtilmektedir. Spermatozoonun sitoplazması düşük miktarda enzim içerdiği için plazma membranı yüksek miktarda doymamış yağ asidi içermektedir (Agarwal ve ark. 2008). Spermatozoon membranlarında yüksek miktarda bulunan doymamış yağ asitleri akışkanlık sağlaması ve spermatozoonun zona pellusidaya bağlanması için gereklidir. Bunun yanı sıra ROT saldırısına karşı hücreyi savunmasız bırakmaktadır (Agarwal ve ark. 2014). ROT oluşumu ve membran lipit peroksidasyonu sperm canlılığı ve fertilitesi için önemli bir problemdir (Guthrie ve Welch 2012). Lipitlerin peroksidasyonu, serbest radikallerin hücre membranına saldırması sonucu gerçekleşir. Serbest radikaller, hücre membranının dengesini ortadan kaldırarak, hızlı hücre ve doku hasarına sebep olurlar. Lipit peroksidasyon spermanın motilitesini düşürücü etki göstermektedir (Agarwal ve ark. 2008, Tekcan 2009).

Spermatozoa seminal plazmada bulunan antioksidanlar ile kendisini oksidatif strese karşı korumaya çalışmaktadır (Kim ve Parthasarathy 1998). Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize eden antioksidanlar oluşturmaktadır. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge olması gereklidir. Böylece hücre serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunmaktadır. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa, üretimden daha yavaş nötralize edilirse, hücrede serbest radikallerin miktarı yükselir. Hücreler hafif oksidatif stresi tek başlarına giderebilseler de genellikle antioksidan enzim sistemlerini kullanırlar. Ancak, hücre içi savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda, oksidan hasara duyarlı DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi hücresel makromoleküller hasar görmektedir (Sabuncuoğlu ve Özgüneş 2011). Dondurulup-çözdürülen sperm hücrelerinde antioksidan kapasitenin azalması, reaktif oksijen radikal oluşumunun artması spermatolojik parametreler ve fertilitayı olumsuz etkilemektedir. Çözdürülmüş sperma hücreleri, taze spermaya göre peroksidasyona karşı daha hassastır (Kulaksız ve Daşkın 2009). Tüm bu etmenlerden dolayı yapılan araştırmalar spermanın dondurulması sırasında sulandırıcılara antioksidan özelliği yüksek maddelerin ilave edilmesi üzerine yoğunlaşmıştır.

Metiyonin, esansiyel amino asitlerden bir tanesidir ve glutatyon için bir öncü amino asit görevi görür. Bu özellikleri sayesinde, ROT azalır ve kriyoprezervasyon sırasında hücreleri oksidatif strese karşı korur. İçeriğindeki tiyol gurubu sayesinde metiyonin kurşun ile şelat oluşturur ve hücrelerden uzaklaşmasını sağlar. Metiyonin ayrıca poliaminler (spermin ve spermidin) sentezini sağlar (Reed 1990, Patra ve ark. 2001, Bouyeh 2012). Trehaloz hücre içindeki suyun dış

ortama çıkışını sağlayarak dondurma sırasında meydana gelen buz kristali oluşumunu azaltır. Enerji kaynağı olarak ve ozmotik basıncı düzenleyerek kriyoprotektif etkinlik gösterir (Garcia ve Graham 1989, Abdelhakeam ve ark.1991). Şekerlerin dondurma-çözdürme sırasında meydana gelen soğuk şokunun önlenmesinde antioksidatif ve kriyoprotektan özelliklerinin olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir (Woelders ve ark. 1997, Malo ve ark. 2010). Trehaloz ve taurin sulfonik amino asit grubundan olup enzimatik olmayan antioksidanlar olarak bilinmektedir (Reddy ve ark. 2010). Disakkaritler spermanın dondurulması sürecinde ozmotik değişimlere karşı membranın fosfolipit bağlarına etki ederek hücre hasarının önüne geçmeye çalıştığı bildirilmektedir (Molinia ve ark.1994, Liu ve ark. 1998, Gungor ve ark. 2018). Trehalozun koç, boğa ve fare spermasının dondurulmasında başarılı bir kriyoprotektan etki gösterdiği belirtilmektedir (Storey ve ark.1998, Bilodeau ve ark. 2001, El-Alamy ve Foote 2001) Köpek spermasının kısa süreli saklanması ve dondurulmasına ilişkin çeşitli antioksidanlar ile yapılmış birçok araştırma mevcuttur (Uysal ve ark.2005, Martins-Besa ve ark.2007, Michael ve ark.2009, Bencharif ve ark. 2012, İnanç ve ark. 2018). Bu çalışmada, Aksaray Malaklı Çoban köpeği spermasında metiyonin ve trehaloz içeren sulandırıcıların çözüm sonu sperm motilite, ölü canlı ve plazma membran bütünlüğü üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Hayvanların seçimi

Aksaray ilinde halk elinde yetiştiriciliği yapılan 2-5 yaş aralığında 10 baş erkek Aksaray Malaklısı Çoban Köpeği (Türk Mastifi) kullanıldı. Sunulan çalışma için Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli izin (2016/217) alındı.

### Sperma sulandırıcısının hazırlanması

Çalışmada temel sperma sulandırıcı olarak Tris Ana Stok (TAS) solüsyonu (tris 297.58 mM, sitrik asit 96.32 mM, fruktoz 82.66 mM) kullanıldı (Güngör ve Bucak 2016). Bunun üzerine (sperma alınacağı gün) %15 oranında taze yumurta sarısı eklendi ve 15 dakika 6000 devirde santrifüj işlemi uygulanarak supernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra %6 oranında gliserol eklenerek hazır hale getirildi. Daha önceki çalışmalar ışığında, metiyonin ve trehaloz grupları belirlendi (Akalın ve ark.2015) ve TAS (Kontrol), TAS+ trehaloz (10 mM), TAS+ metiyonin (2 mM) şeklinde çalışma grupları oluşturuldu

### Spermanın toplanması

Köpeklerden sperma, bulbus glandise masaj yapılarak dijital manipülasyon yöntemi ile alındı. Bulbus glandis şişmeye başladığında prepusyum geri çekilerek penis prepusyumdan çıkartıldı masaja devam edilirken penis arka bacaklar arasından geriye çevrildi ve sperma

alındı. Uygulamada her köpekten haftada iki kez olmak üzere toplam 6 ejakülata spermadan zengin 2. Fraksiyonu kullanıldı. %80 ve üzeri motilite ile mililitrede en az  $400 \times 10^6$  sperma konsantrasyonuna sahip ejakülatlar bireysel olarak donduruldu.

### Spermada hacim, motilite ve yoğunluk muayenesi

Spermanın hacminin belirlenmesi için dereceli sperma toplama kadehlerinden faydalandı ve elde edilen sonuç mililitre birimi ile belirlendi. Motilitenin tespitinde Sıcaklığı 37°C ye ayarlanmış faz-kontrast mikroskopun 400x büyütmesinde lam-lamel arasına alınan bir damla sperma numunesi en az 5 mikroskop sahası incelenerek, başı yönünde ileriye doğru düzgün doğrusal hareket eden spermatozoonların tümüne oranı belirlendi. Motilite değerlerinin ortalaması % motilite oranı olarak kaydedildi. Sperma yoğunluk muayenesi ise hemositometrik yöntem ile ml'de bulunan spermatozoon konsantrasyonu olarak belirlendi (Tekin 1994).

### Ölü-Canlı Muayenesi

Spermatozoa canlılık oranı tespitinde Eosin-Nigrosin boyama yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde bir damla sperma ile bir damla Eosin boyası ve karışımın üzerinden bir damla Nigrosin boyası eklendi ve sürme froti hazırlanarak, mikroskopun 400x büyütmesinde 300 hücre sayılarak spermatozoonun baş kısmı boya almayanlar canlı olarak kaydedildi ve sonuç % canlı oranı olarak belirlendi (Watson 1975).

### Hipo Osmotik Şişirme (HOS) Testi

Sperma, 100 mOsm hazırlanmış HOS solüsyonu (0,9 gram fruktoz 0,49 gram trisodyum sitrat, 100 ml'ye tamamlanarak) içerisinde tespit edilen numunelerden preperat 30 dakika 37°C'ta inkübasyonu sonrası faz-kontrast mikroskopun 400x büyütmesinde 300 hücre sayılarak spermatozoa membranlarının düşük ozmotik basınçta bütünlüğü incelendi. Kuyruğu kıvrık olan spermatozoonlar membran bütünlüğü sağlam olarak belirlendi (Tekin 1994, Kulaksız 2009).

### İstatistiksel analizler

Çalışmadan elde edilen veriler önemlilik testlerinden önce, tüm değişkenler parametrik test varsayımlarından normallik yönünden Shapiro Wilks ve Kurtosis test ile, varyansların homojenliği yönünden ise Levene's testi ile incelendi. Normal dağılım gösteren değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan değerlendirilmesi tek yönlü varyans analizi (One Way Anova) ile yapıldı. Gruplar arası farklılığın belirlenmesinde ileri aşama (post-hoc) testi olarak Duncan testi kullanıldı ve sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi. IBM SPSS 21.0 paket programından yararlanıldı.

## BULGULAR

Araştırma kapsamında hayvanlardan alınan ortalama sperma hacimleri ve ml deki spermatazoon sayısı Tablo 1’de belirtilmiştir.

Metiyonin grubunda çözüm sonu motilite ve HOS test analizlerinde kontrol grubu ile istatistiksel farklılık tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Canlılık muayenesinde en

iyi sonuca yine metiyonin grubunda ulaşılmasına rağmen gruplar arası istatistiksel farklılık bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). Plazma membran bütünlüğü analizinde (HOS test) Trehaloz 10 mM kontrol grubuna karşı sayısal üstünlük elde edilirken bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ).

**Tablo 1.** Aksaray Malaklı köpeklerinde ortalama sperma miktarı ve yoğunluğu

**Table 1.** Mean of sperm volume and concentration of dogs which were used in the study

Hayvan No	Sperma Miktarı (ml)	Sperma Yoğunluğu (mm <sup>3</sup> /ml)
1. Hayvan	1,5±0,22	440±21,6x10 <sup>6</sup>
2. Hayvan	1,65±0,24	615±28,57x10 <sup>6</sup>
3. Hayvan	2,15±0,12	610±49,67x10 <sup>6</sup>
4. Hayvan	2,2±0,14	410±10,8x10 <sup>6</sup>
5 Hayvan	1,7±0,25	520±43,2x10 <sup>6</sup>
6. Hayvan	1,4±0,14	465±36,29x10 <sup>6</sup>
7. Hayvan	2,2±0,21	505±20,41x10 <sup>6</sup>
8. Hayvan	1,8±0,14	595±42,62x10 <sup>6</sup>
9. Hayvan	1,9±0,16	560±35,59x10 <sup>6</sup>
10. Hayvan	1,5±0,33	555±30,82x10 <sup>6</sup>

**Tablo 2.** Aksaray Malaklı Köpeklerinde Metiyonin ve Trehalozun çözüm sonu spermatolojik parametrelere etkisi

**Table 2.** Evaluation of additives on dog sperm parameters (Motility, Live-Dead, HOS test) after thawing

Gruplar	Motilite (%)	Canlı Spermatozoa (%)	HOS Test (%)
Kontrol	41,5±3,1 <sup>b</sup>	57,8±2,3	33,2±2,9 <sup>b</sup>
Trehaloz (10 mM)	50,0±3,9 <sup>ab</sup>	60,6±3,7	38,4±3,6 <sup>ab</sup>
Metiyonin (2mM)	52,5±2,7 <sup>a</sup>	63,6±2,2	43,1±2,9 <sup>a</sup>
p	0,05*	-	0,05*

<sup>a-b</sup>: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak farklıdır ( $p < 0,05$ ).

<sup>a-b</sup>: Different superscripts within the same column demonstrate significant differences ( $p < 0,05$ ).

## TARTIŞMA

Köpek spermasının dondurulması, hem üreme amaçlı hem ticari amaçlı köpekler için önem kazanmaktadır. Köpekler de dahil olmak üzere, memeli spermatozoalarının dondurulması, sperma fertilitesi üzerinde bazı olumsuz etkiler yaratması bu tekniğin daha az kullanılmasına neden olmaktadır (Singh ve ark. 2012, Bucci ve ark. 2019). Kriyoprezervasyon, tüm memeli türlerinin sperm membranlarını etkilemesi sebebiyle kapsamlı kimyasal ve fiziksel hasara neden olmaktadır (Watson 2000). Hasarın nedeni, lipid fazdan geçiş esnasında ROS tarafından indüklenen membran lipid peroksidasyonunda (LPO), ozmotik stres ve sıcaklık değişimlerinden dolayı hücre zarları üzerindeki mekanik strese bağlı olarak değişebilir (Ortega Ferrusolave ark. 2009, Câmara ve ark. 2011). Bu çalışmada, sulandırıcıya eklenen metiyonin ve trehalozun köpek spermasında çözüm sonu motilite, ölü-canlı ve HOS test sonuçları üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Walczak Jedrzejowska ve ark. (2012) in vitro ve in vivo çalışmalarda, birçok antioksidan faktörün sperm, gebelik oranı ve canlı doğum oranları üzerine yararlı etkileri olduğunu belirtmişlerdir. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize eden antioksidanlar meydana getirmektedir. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge olması gereklidir. (Tekcan 2009). Sperma sulandırıcısına antioksidan ilavesi, çözüm sonu sperm parametrelerinin iyileştirilmesi için en umut verici tekniklerden birisi olduğu birçok araştırmacı tarafından belirtilmektedir. (Peña ve ark. 2006, Oगतave ark. 2015). Demirtaş ve Üntan (2011) antioksidanların spermatozoayı serbest oksijen radikalleri (SOR) üreten anormal spermatozoalardan koruduğunu, lökositlerin oluşturduğu SOR’u temizlediğini, DNA kırılmalarını ve erken sperm olgunlaşmasını engellediğini, soğuk şokuna karşı spermatozoayı koruduğunu ve destekleyerek üreme tekniklerinin başarısını yükselttiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada, köpek sperma sulandırıcısına eklenen Metiyonin 2 mM’ ın çözüm sonu motilite ve plazma

membran bütünlüğüne olumlu etki gösterdiği belirlendi. Buna karşılık, çözüm sonu canlı spermatozoa oranına belirli ölçüde fayda sağlamakla birlikte istatistiksel fark oluşturmamıştır. Çalışmada ön değerlendirme amacıyla alınan spermaların bireysel yoğunluk değerleri İnanç ve ark. (2018) Aksaray malaklısı çalışmasından yüksek elde edildi. Elde edilen bu sonucun diğer çalışmada yaş gruplarına göre oluşturulmuş olan gruplardan dolayı oluşacağı kanısına varıldı. Çalışmamızdaki kontrol grubunda elde edilen çözüm sonu motilite ve canlılık değerleri İnanç ve ark. (2018) çözüm sonu sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Bunun yanı sıra elde edilen bu sonuçlar, Anadolu çoban köpeklerinin spermasının dondurulması sonucunda çözüm sonu motilite ve canlı spermatozoa oranları benzer bulunmuştur (Güngör ve Bucak 2016).

Trehaloz, sperma hücrelerini, ROS'un olumsuz etkilerinden nonenzimatik bir temizleyici gibi etki göstererek korur (Badr ve ark. 2010) ve uygun seviyelerde dondurulmuş sperm hücrelerinin çözüm sonu motilitesini ve membran bütünlüğünü korumak için gerekli olan enerjiyi sağlar (Flores ve ark. 2010). El-Badry ve ark.(2017) nin yapmış olduğu çalışmadan farklı olarak bu çalışmada, sperma sulandırıcısına 10 mM trehaloz eklenmesi, membran bütünlüğü üzerine kontrol grubuna kıyasla olumlu etki gösterirken istatistiksel fark oluşturmamıştır. Motilite ve canlı sperma oranlarında faydalı olmasına rağmen Trehalozun spermatolojik parametreler üzerine etkisini inceleyen bazı araştırmacılar, koç (Sharawy ve ark. 2015), bufalo (Iqbal ve ark.2016), horoz (Mosca ve ark. 2016) ve boğa (El-Sheshtawy ve ark. 2015) spermasında çözüm sonu değerlerinde iyileşme olduğunu belirtmişlerdir. Benzer sonuçların sulandırıcıya katkı maddesi eklenerek dondurulan Aksaray Malaklı spermasında da İnanç ve ark. (2018) tarafından elde edildiği belirtilmiştir.

Metiyonin, esansiyel bir amino asittir. Glutasyon öncüsü olması ile ROS'u azaltan ve böylece hücreleri oksidatif strese karşı koruyan bir tripeptid olduğu için antioksidan özelliklere sahiptir. Ayrıca, çekirdek ve hücre bölünmesi olaylarında yer alan poliaminlerin (spermin ve spermidin) ve DNA ve diğer moleküllerin metilasyon reaksiyonları için metil grubu sentezinde metiyonin gerekir (Bouyeh 2012).Metiyonin, metiyonin sülfoksit oluşturmak için oksidanlarla kolayca reaksiyona girerek antioksidan savunmasında önemli bir rol oynamaktadır (Livine ve ark. 1999).Yapılan çalışmalarda sulandırıcıya 2 mM Metiyonin ilavesi, çözüm sonu sperma motilitesini kontrol grubuna kıyasla arttırdığı belirlenmiştir (Çoyan ve ark. 2010, Bucak ve ark.2012). Ayrıca, Tuncer ve ark. (2010) tarafından metiyonin üç farklı dozunun (2,5,5 ve 10 mM akrozom bütünlüğünü soğuk şokundan başarıyla korunduğu belirtilmiştir.

Yapılan bu çalışma ile metiyonin 2 mM ve trehalozun 10 mM dozlarının çözüm sonu spermatolojik parametreleri koruduğu metiyoninin kontrol grubu ile istatistiksel fark oluşturacak şekilde olumlu etki sağladığı sonucuna varılmıştır. Köpek sperması kriyoprezervasyonunda metiyonin ve trehaloz içeren sulandırıcıların kullanılması ve yapılacak yeni çalışmalar ile farklı dozların denenmesi önerilebilir.

## TEŞEKKÜR

*Bu çalışma Tübitak 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri tarafından (Proje no: 1919B011602713) desteklenmiştir ve 9. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tobumlama Bilim Kongresi'nde sunulmuştur. Sunulan çalışma için Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli izin (2016/217) alındı.*

## KAYNAKLAR

- Abdelhakeam AA, Graham EF, Vazquez IA, Chaloner KM.** Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Development of an extender for freezing: Effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution. *Cryobiology*. 1991; 28: 43-49.
- Agarwal A, Cocuzza M, Abdelrazik H, Sharma RK.** "Oxidative stress measurement in patients with male or female factor infertility". *Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment*. 2008; 195-218.
- Agarwal A, Durairajanayagam D, Halabi J, Peng J, Vazquez-Levin M.** Proteomics, oxidative stress and male Infertility. *Reproductive BioMedicine Online*. 2014; 29: 32-58.
- Akalın PP, Başpınar N, Çoyan K, Bucak MN, Ataman MB, Ömür AD, Bilgili A, Güngör Ş, Sarıözkan S, Öztürk C, Bodu M, Acibaeva B.** Metiyonin ve Trehaloz İçeren Sulandırıcıların Koç Spermasının Dondurma-Çözdürme Sonrası Sperm Akrozom Bütünlüğü ve Biyokimyasal Parametreleri Üzerine Etkileri. *Bahri Dağdaş Hayvancılık Araştırma Dergisi*. 2015; 3(1): 7-15.
- Álamo D, Batista M, González F, Rodríguez N, Cruz G, Cabrera F, Gracia A.** Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152°C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology*. 2005; 63(1): 72-82.
- Atasoy F, Erdoğan M, Özarslan B, Yüceer B, Kocakaya A, Akçapınar H.** Malaklı Karabaş köpeklerde bazı morfolojik ve genetik özellikler. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*. 2014; 61: 125-132.
- Badr MR, Abd El- Malak MG, Hassan HM.** Effect of trehalose on cryopreservation, oxidative stress and DNA integrity of buffalo spermatozoa. *J Reprod Infertil*. 2010; 1: 50-57.
- Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois M, Barriere P, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Tainturier D.** The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS egg yolk and Equex STAMP extenders in the cryopreservation of canine sperm. *Research in Vet Science*. 2012; 93: 440-447.



- Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon IC, Sirard MA.** Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*.2001; 56: 275-286.
- Bouyeh M.** Effect of excess lysine and methionine on immune system and performance of broilers. *Ann Biol Res*. 2012;3(7): 3218-3224.
- Bucak MN, ÇoyanK, Öztürk C, Güngör Ş, Ömür AD.** Methionine supplementation improves ram sperm parameters during liquid storage at 5 C. *Cryobiology*.2012; 65(3): 335-337.
- Bucci D, Cunto M, Gadani B, Spinaci M, Zambelli D, Galeati G.** Epigallocatechin-3-gallate added after thawing to frozen dog semen: Effect on sperm parameters and ability to bind to oocytes' zona pellucida. *Reproductive biology*.2019; 19(1): 83-88.
- Câmara DR, Silva SV, Almeida FC, Nunes JF, Guerra MM.** Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozenthawed ram semen. *Theriogenology*.2011; 76: 342-350.
- Çoyan K, Başpınar N, Bucak MN, Akalın PP, Ataman MB, Ömür AD, Güngör Ş, Küçükğünay S, Özkalp B, Sarıözkan S.** Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Research in Veterinary Science*.2010; 89(3): 426-431.
- Demirtaş A, Üntan İ.** Seminal sıvı ve spermde oksidatif stres ve antioksidanlar. *Türk Ürol Sem*.2011; 2: 24-30.
- El-Alamy MA, Foote RH.** Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Anim Reprod Sci*.2001; 65: 245-254.
- El-Badry DA, El-Maaty AMA, Gamal A.** The effect of trehalose supplementation of INRA-82 extender on quality and fertility of cooled and frozen-thawed stallion spermatozoa. *Journal of equine veterinary science*.2017; 48: 86-92.
- El-Sheshtawy RI, Sisy GA, El-Nattat WS.** Effects of different concentrations of sucrose or trehalose on the post-thawing quality of cattle bull semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction*.2015; 4(1): 26-31.
- England GC.** Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of reproduction and fertility*. 1992; 47: 243-255.
- Flores JA, Fernández A, Huamán U, Ruiz G, Santiani A.** Refrigeration of canine semen using glucose, fructose, trehalose or sucrose to extend sperm survival. *Rev Inv Vet Perú*. 2010; 21: 26-34.
- Garcia MA, Graham EF.** Development of a buffer system for dialysis of bovine spermatozoa before freezing. II. Effect of sugars and sugar alcohols on postthaw motility. *Theriogenology*.1989; 31: 1029-1237.
- Gungor S, Bucak MN.** Basal medium eagle solution may improve the post-thaw parameters of Kangal dog semen. *Eurasian J Vet Sci*. 2016; 32: 193-199.
- Gungor S, Ata A, Inanc ME.** Effects of trehalose and catalase on the viability and kinetic parameters of cryopreserved ram sperm. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2018; 46: 1.
- Guthrie HD, Welch GR.** Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*.2012; 78: 1700-1708.
- Inanc ME, Tekin K, Olgac KT, Yılmaz B, Cil B, Tasdemir U, Tuncer BP, Buyukleblebici S, Durmaz E, Uysal O.** Effect of cholesterol loaded cyclodextrin on semen cryopreservation of Aksaray Malakli shepherd dogs of different ages. *Animal Reproduction Science*.2018; 193: 191-200.
- Iqbal S, Andrabi SMH, Riaz A, Durrani AZ, Ahmad N.** Trehalose improves semen antioxidant enzymes activity, post-thaw quality, and fertility in Nili Ravi buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*.2016; 85(5): 954-959.
- Kim JG, Parthasarathy S.** Oxidation and the spermatozoa. In *Seminars in reproductive endocrinology*.1998; 16: 235-339.
- Kulaksız R, Daşkın A.** Farklı antioksidanlarla dondurulan Saanen teke spermasının in vitro ve in vivo değerlendirilmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*.2009; 56: 201-205.
- Kulaksız R.** Farklı antioksidanlar eklenmiş sulandırıcılarla dondurulmuş Saanen teke spermasının in vitro değerlendirilmesi. *Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2009.*
- Liu Z, Foote RH, Brockett CC.** Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology*.1998; 37(3): 219-230.
- Livine RL, Berlett BS, Moskovitz J, Mosoni L, Stadtman ER.** Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev*.1999; 107: 323-332.
- Malo C, Gil L, Gonzalez N, Cano R, Blas I, Espinosa E.** Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. *Cryobiology*.2010; 61(1): 17-21.
- Martins-Besa A, Rocha A, Maenco-Aguirre A.** Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing. *Theriogenology*.2007; 68: 1088-1096.
- Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratis P, Ververidis HN, Boscos CM.** Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Animal Rep Science*.2009; 112: 119-135.
- Molinia FC, Evans G, Casares PI, Maxwell WMC.** Effect of monosaccharides and disaccharides in tris based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*.1994; 36: 113-122.
- Mosca F, Madeddu M, Sayed AA, Zaniboni L, Iaffaldano N, Cerolini S.** Data on the positive synergic action of dimethylacetamide and trehalose on quality of cryopreserved chicken sperm. *Data in brief*.2016; 9: 1118-1121.
- Neagu VR, García BM, Sandoval CS, Rodríguez AM, Ferrusola CO, Fernández LG, Tapia JA, Peña, FJ.** Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. *Theriogenology*.2010; 73(5); 645-650.
- Ogata K, Sasaki A, Kato Y, Takeda A, Wakabayashi M, Sarentonglaga B.** Glutathione supplementation to semen extender improves the quality of frozenthawed canine spermatozoa for transcervical insemination. *J Reprod Dev*.2015; 61; 116-122.
- Ortega Ferrusola C, González Fernández L, Morrell JM, Salazar Sandoval C, Macías García B, Rodríguez-Martinez H.** Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction*.2009; 138; 55-63.
- Patra RC, Swarup D, Dwivedi SK.** Antioxidant effects of alpha-tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead

induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology*.2001; 162; 81-88.

- Peña FJ, Núñez-Martínez I, Morán JM.** Semen technologies in dog breeding: an update. *Reproduction in Domestic Animals*.2006; 41(s2); 21-29.
- Reddy NSS, Mohanarao GJ, Atreja SK.** Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Animal Reproduction Science*.2010; 119(3): 183-190.
- Reed DJ.** Glutathione: toxicological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.1990; 30: 603–631.
- Sabuncuoğlu S, Özgüneş H.** Kemoterapi, serbest radikaller ve oksidatif stres. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*.2011; 31(2): 137-50.
- Sharawy SM, Saleh NH, Attalah SA, Absy GM, Doaa HK.** Studies on the effect of added ascorbic acid and trehalose to tris buffered egg yolk extender on chilled ram semen. *MENA Sci J*.2015; 1: 1–4.
- Singh VK, Atreja SK, Kumar R, Chhillar S, Singh AK.** Assessment of intracellular  $Ca^{2+}$ , cAMP and 1,2-diacylglycerol in cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa on supplementation of taurine and trehalose in the extender. *Reprod Dom Anim*.2012; 47: 584-590.
- Storey BT, Noiles EE, Thompson KA.** Comparison of glycerol other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*.1998; 37: 46-58.
- Tekcan M.** Oksidatif stres-antioksidan sistemler ve testis. *Androloji Bülteni*.2009; 37: 131-136.
- Tekin N.** Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi, Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun'ı Tohumlama, Doğum ve İnfertilite, Ed. E. Alaçam, Dizgievi, Konya. 1994; pp 69-70.
- Tosun H, Uysal O.** Köpek spermasının dondurulmasında farklı sulandırıcıların ve bireylerin etkisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*.2007; 54(1): 23.
- Tuncer PB, Bucak MN, Sarıözkan S, Sakin F, Yeni D, Çiğerci İH, Büyükleblebici O.** The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed Angora buck (*Capra hircus ancyrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. *Cryobiology*.2010; 61(1), 89-93.
- Uysal O, Bucak MN, Yavaş İ, Varışlı Ö, Gurcan IS.** Evaluation of ram Sperm frozen with various taurine concentrations. *Indian Vet J*.2005; 82: 1059-1061.
- Walczak-Jedrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska-Hilczer J.** The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central Eur J Urology*.2012; 66: 60-67.
- Watson PF.** The Causes of Reduced Fertility with Cryopreserved Semen. *Anim Reprod Sci*.2000; 60: 481-492.
- Watson PF.** Use of Giemsa stain to detect changes in the acrosome of frozen ram spermatozoa. *Vet Rec*.1975; 97(1): 12-15.
- Woelders H, Matthijs A, Engel B.** Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology*.1997; 35: 93-105.

## Investigation of Sox2, $\beta$ -III Tubulin and Nestin Expressions in Neurospheres Differentiated from Bovine Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells by Immunofluorescence Staining

Özlem ÖZDEN AKKAYA<sup>1\*</sup>, Tayfun DİKMEN<sup>1</sup>, Shah NAWAZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Histology and Embryology, 03200, Merkez, Afyonkarahisar, Turkey

### ABSTRACT

Stem cell therapy can be an advantageous tool for non treatable diseases and has become a theme research for a better solution to many neurodegenerative cases. Despite of being very common in pet animals and equines in the field of veterinary medicine; stem cell based practises in bovines yet remain very limited. In the following study, Bovine adipose derived stem cells (BASCs) were isolated and differentiated into neurospheres. The potential expressions of neuron-specific markers  $\beta$ -III Tubulin, Nestin and Sox2 were demonstrated by immunofluorescence staining on these neurospheres. The outcomes of the study may provide a better understanding to the neurogenic potential of BASCs and can be a footstep for developing new therapeutical approaches for neurodegenerative diseases and syndroms in bovines.

**Keywords:** Adipose, Bovine, Nestin, Neurosphere, Sox2

\*\*\*

### Sığır Yağ Dokusundan İzole Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerden Farklılaştırılan Nörosferlerde Sox2, $\beta$ -III Tubulin ve Nestin Ekspresyonlarının İmmunfloresan Boyama Yöntemi ile İncelenmesi

### ÖZ

Kök hücre tedavisi, pek çok tedavisi olmayan hastalıkta olduğu gibi çoğu nörodejeneratif hastalık ve sendromda da daha iyi tedavi protokollerinin geliştirilmesi için önemli bir çalışma alanı haline gelmiştir. Kök hücrelerin klinik kullanımı pet hayvanları ve atlarda her ne kadar yaygınlaşmaya başlasa da sığırlarda kök hücre kullanımı hala oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada sığır yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler izole edilmiş ve bu hücrelerden nörosfereltesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nörosferlerin nöronspsesifik belirteçler olan  $\beta$ -III Tubulin, Nestin ve Sox2 ekspresyonları immunfloresan boyama tekniği ile değerlendirilmiştir. Çalışmadan elde edilecek sonuçlar sığır yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin nörojenik potansiyelinin daha iyi anlaşılması açısından önemli olmakla birlikte bu sonuçlar sığırlarda nörojenik defektlerde kullanılabilecek potansiyel tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi hususunda da yol gösterici olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Nestin, Nörosfer, Sığır, Sox2, Yağ Dokusu

To cite this article: Özden Akkaya Ö, Dikmen T, Nawaz S. Investigation of Sox2,  $\beta$ -III Tubulin and Nestin Expressions in Neurospheres Differentiated from Bovine Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells by Immunofluorescence Staining. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):336-342

Submission: 20.07.2019 Accepted: 27.08.2019 Published Online: 29.08.2019

ORCID ID; ÖÖA: 0000-0001-6372-9155, TD: 0000-0003-4470-7465, SN: 0000-0001-5468-8267

\*Corresponding author e-mail: ozlemozden@aku.edu.tr

## INTRODUCTION

Stem cell based therapies applied in human medicine, have gained equal importance in veterinary medicine during recent years, and are seen as a gleam of hope in the treatment of many diseases and syndromes. Today, treatment protocols and strategies using adult mesenchymal stem cells are applied in curing various diseases, especially locomotor system diseases, especially in horses and pet animals (Consiglio et al. 2011, Lange-Consiglio et al. 2013, Corradetti et al. 2014). Cellular therapies are accepted as a most promising and novel treatment approaches in treating neurological disorders. Neural stem cells (NSC) are self-regenerating multipotent cells which could be obtained from embryo or fetal tissues only. The ethical constraints and difficulties to access the fetal tissues have directed the scientists to use adult stem cell. According to studies, the subgranular zone and subventricular zone (SVZ) in the central nervous system and olfactory neuroepithelial region in the nose are the sites for continued neurogenesis during adulthood (Brann and Firestein 2014). However, it is challenging to obtain neuronal stem cells from these regions particularly in adulthood for the purpose of cellular therapy. As a matter of fact mesenchymal stem cells derivatives from different tissues could be used to obtain the nerve cell or neurosphere. The neuro precursor cells present in the obtained neurospheres have ability to get differentiated into neurons, astrocytes or oligodendrocytes when cultured with appropriate media and conditions (Reynolds and Weiss 1992). Furthermore, precursor cells forming neurospheres can be applied directly in the treatment of neurodegenerative diseases of both humans and animals without differentiation (Girard et al. 2011).

Previous studies reported that fat tissue-derived mesenchymal stem cells obtained from humans and many other animal species can differentiate into neurospheres (Chung et al. 2013, Nagase et al. 2007, Radtke et al. 2009). According to literature and to our limited knowledge, no such study has been previously reported in bovines.

Bovine adipose derived stem cells (BASCs) represent a source of stem cells that express mesenchymal markers CD73 and CD90 while lacking expression of haematopoietic markers CD45 and CD34 (Cebo 2017, Da Silva et al. 2016). The studies reveal that BASCs are multipotent and can undergo osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation (Sampaio et al. 2015, Da Silva et al. 2016). In another study it was suggested that BASCs are less immunogenic compared to bone marrow stem cells from the same specie because of low expression of MHC-I and MHC-II (Huaman et al. 2019). Stem cell or neurosphere applications in neurodegenerative diseases in cattle are thought to increase the chances

of treatment success which is very limited in this field. The aim of this study was to characterize the adipose tissues derived neurospheres properties in bovines. The data of this study will guide the treatment of neurodegenerative diseases in cattle and the clinical applications of stem cells.

## MATERIALS and METHODS

### Adipose derived stem cells isolation and culture

The subdermal fat was collected from the freshly slaughtered animals with the help of sterile forceps and scissors and brought to laboratory in sterile Hank's Balanced Salt Solution (HBSS Sigma, USA) containing 2% Pen-Streptomycin (Gibco, UK). The samples were first washed with sterile Iodine solution and later on were washed with HBSS containing 2% Pen-Streptomycin for three times to remove any contamination. The fat tissues samples were transferred to 50 ml centrifuge tubes and fat was mechanically dissected to fine samples being exposed to enzymatic digestion using Collagenase II (Sigma, USA) (1mg/ml-0.1%) at 37°C for 1 hour. The sample after digestion was strained using 100 µm cell strainer. The strained digested fat tissues were then centrifuged at 250g for 10 minutes. By discarding the supernatant, the pellet was dissolved in MEM (Sigma, USA) containing 10% FBS and cultured in 25 cm<sup>2</sup> flasks at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> incubator for proliferation. The media was changed every 3<sup>rd</sup> day and cells were passaged upon 70-80% confluence.

### Neurospheres generation

BASCs from late passages were collected and plated at a culture density of 5×10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> on 0.01% poly-L-Lysine (Sigma, USA) coated 4-well plates. DMEM/F-12 (Gibco, UK), containing 1% Insulin-transferrin-selenium (ITS) (Gibco, USA), 50ng/mL EGF (Sigma, USA), and 50ng/mL FGF (R&D System, USA) was used as neurospheres culture medium. The cells were allowed to get differentiated in neurospheres under optimal conditions. To prevent the nutrient depletion, the half of the medium was changed every 2<sup>nd</sup> day. The BASCs started differentiating into neurospheres after 48h (Bez et al. 2003).

### Neurospheres Collection and Immunofluorescence

Neurospheres were stained for particular markers by Immunofluorescence studies as described by Sasaki et al. (2010). A pool of neurospheres was developed 48h post differentiation and washed with PBST (Phosphate buffer saline containing 0.1% Tween 20 (BioRad, USA) three times for 5 min each. Later the cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4) for 10 min at room temperature. After fixation, the neurospheres were again washed with ice-cold PBS for three times 5 minutes each. The permeability step was performed with PBS containing

0.1% Triton X-100 (MP Biomedicals-France). After washing with PBST, the blocking was carried using 10% serum from the species in which the secondary antibodies were raised. The primary antibodies; anti-Nestin (1:250 Goat polyclonal; Santa Cruz-sc21248), anti- $\beta$ -III Tubulin (1:300 Mouse monoclonal; Abcam-ab78078) and anti-Sox2 (1:50 Rabbit polyclonal; Abcam-ab5603) used in this study were diluted in 1% BSA in PBST. The secondary antibodies consisted of Donkey anti Goat Alexafluor conjugated (1:250; Abcam-ab150137), Goat anti Mouse Texas Red conjugated (1:100; Abcam-ab6787) and Goat anti Rabbit Alexafluor conjugated (1:200; Abcam-ab150077) respectively diluted in 1% BSA.

### **Osteogenic Differentiation**

BASCs were collected after 3<sup>rd</sup> passage and the cells were seeded into 4-well plates at a density of 9,000 cells/cm<sup>2</sup> in growth media. After the cells reached the confluence, the induction media which consisted of 10% FBS (Biowest, South America), 1% penicillin-streptomycin (Gibco, UK), 0.1% amphotericin-B (Biowest, France), 50  $\mu$ g/ml L-ascorbic acid (Sigma, USA), 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate (Gibco, UK), 0.01  $\mu$ M dexamethasone (Sigma, USA) in  $\alpha$ -MEM (Lonza, Belgium). The media was changed in every 3 days and the osteogenic differentiation was performed till 21 days. The osteogenic differentiation was demonstrated by Alizarin Red S staining.

### **Alizarin Red S Staining**

For demonstrating calcium deposits as a result of osteogenic differentiation; Alizarin Red S staining was performed. For staining, the culture media was discarded and cells were washed with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma, USA). Then cells were fixed by 4% paraformaldehyde (Merck, Germany). After fixation, the paraformaldehyde was discarded and cells were washed with distilled water. Afterwards, cells were stained with 80 mM Alizarin Red S (pH 4.2) (Merck, Germany) in deionized distilled water for 30 minutes. After 30 minutes the staining solution was washed carefully and plates were observed under inverted microscope. The calcium deposits were observed as orange-red stains.

### **Adipogenic Differentiation**

After 3<sup>rd</sup> passage, BASCs were seeded into 4-well plates at a density of 9,000 cells/cm<sup>2</sup>. Cells were cultured in growth media till they reached confluence. After reaching confluence, cells were cultured with adipogenic induction media (AIM) and adipogenic maintenance media (AMM) for 21 days. The AMM was only used at 7<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> days of differentiation in order to maintain adipogenesis while the AIM was used in the rest of the study. The AIM consisted of 10% FBS (Biowest, South America), 1% penicillin-streptomycin (Gibco, UK), 0.1% amphotericin-B (Biowest, France), 1  $\mu$ M dexamethasone (Sigma, Belgium), 500  $\mu$ M 3-Isobutyl-1-methylxanthine

(IBMX, Sigma, Germany) 10  $\mu$ g/mL insulin (Sigma) in MEM. On the other hand AMM consisted of 10% FBS (Biowest, South America), 1% penicillin-streptomycin (Gibco, UK) and 10  $\mu$ g/mL insulin in MEM. After 21 days, Oil Red O staining was performed in order to demonstrate oil droplets.

### **Oil Red O Staining**

After 21 days of differentiation, the differentiation media was discarded and cells were washed first with PBS then with 70% ethanol. Afterwards the cells were fixed with 10% buffered neutral formaline for 20 minutes. Then formaline was discarded and cells were washed with PBS and with 70% ethanol once more. After washing the cells, Oil Red O stain was applied for 25 minutes. The stock solution for Oil Red O (12 mM Oil Red O (Sigma-Aldrich, USA) in isopropyl alcohol was diluted with deionized distilled water in 2/3 ratio to be used in staining procedure. After 25 minutes, staining solution was discarded and cells were washed first with 70% ethanol and then with deionized distilled water. A cross staining was done by Harris' Hematoxylin for nuclear staining.

## **RESULTS and DISCUSSION**

The fibroblast like plastic adherent cells were isolated and proliferated for few passages (Figure 1). The stem cells started making colonies 4-5 days post culture. The cells from P0 reached at confluence in around 11- 13 days. The cells from all different animals expressed same morphology as the tissues were isolated from male animals of same age. BASCs designate the class of cells that could be easily isolated and propagated (Chung et al. 2012). In order to counter any changes we preferred isolating the cells from same age group and from male sex only. The cells exhibited the fibroblastic morphology, easily reached to confluence which was consistent with previous studies (Sampaio et al. 2015, Da Silva et al. 2016). Chung et al. (2012) reported that adipose tissue are among the main sources of MSC in veterinary medicine and have advantage of faster growth in *in-vitro* conditions compared to counterpart bone marrow stem cells.

BASCs were formerly announced to have the capacity to differentiate into osteocytes and adipocytes. BASCs showed multipotent properties as they were able to differentiate into both osteogenic and adipogenic lineages (Sampaio et al. 2015, Da Silva et al. 2016). Similar to previous studies, we were successfully able to differentiate BASCs into adipogenic and osteogenic lineages. The adipogenic differentiation was evaluated by Oil Red O staining. After the staining, oil droplets were visible in red-pink color under the microscope (Fig. 2 A,B). The osteogenic differentiation was demonstrated by Alizarin Red S staining. After the Alizarin Red S staining, osteogenic differentiation was investigated

under microscope. The red-orange stained calcium deposits confirmed the osteogenic differentiation (Fig, 2 C,D).

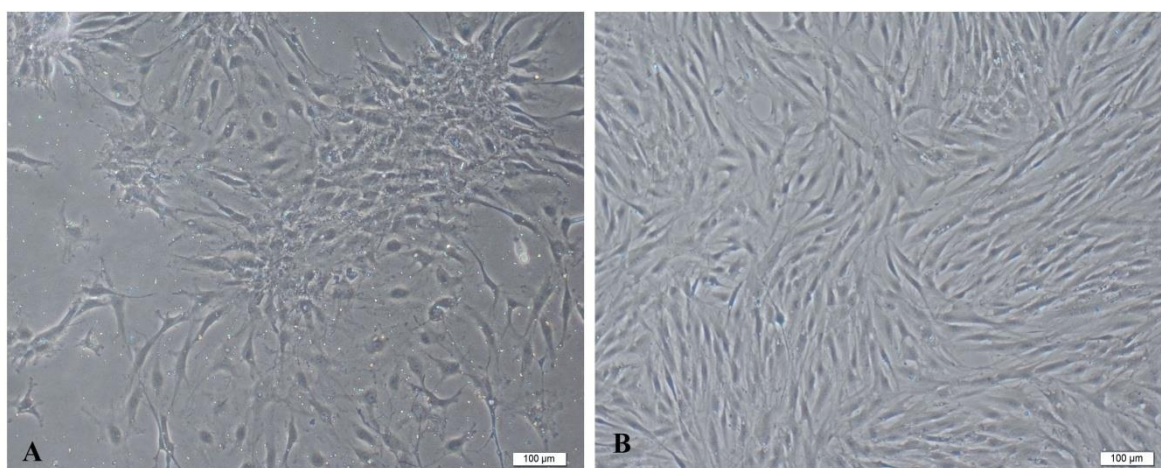
Under the effect of optimal concentration of epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor (FGF), potent BASCs were observed to be suspended in a serum free medium while undergoing differentiation. This neurogenic differentiation media allowed the BASCs to get transformed into the characteristic 3-D clusters called neurospheres which were consistent to previous studies performed on MSCs. Similar to our study, Hu et al. (2013) reported that EGF and bFGF supplementation to medium promoted neural lineage differentiation in adipose stem cells and impaired their mesodermal differentiation ability.

Variations were observed in the sizes of neurospheres and morphology varied from round to oval. Unfortunately we couldn't record the difference in neurosphere numbers, size and shape variations with advanced passage number. However, neurospheres were observed to be increased in size 3-4 days post generation. The neurospheres remained intact even at 6-7 days post differentiation. We also observed that variations in cell density and variable concentrations of growth factors in the median affected the generation of neurospheres. We noticed that the concentration of EGF and FGF actually mattered the most. At as low concentrations of EGF and FGF, as 20ng/ml, BASCs lacked the tendency to form the characteristic neurospheres. Hu et al. (2013) reported the similar results. It was observed that at an optimal

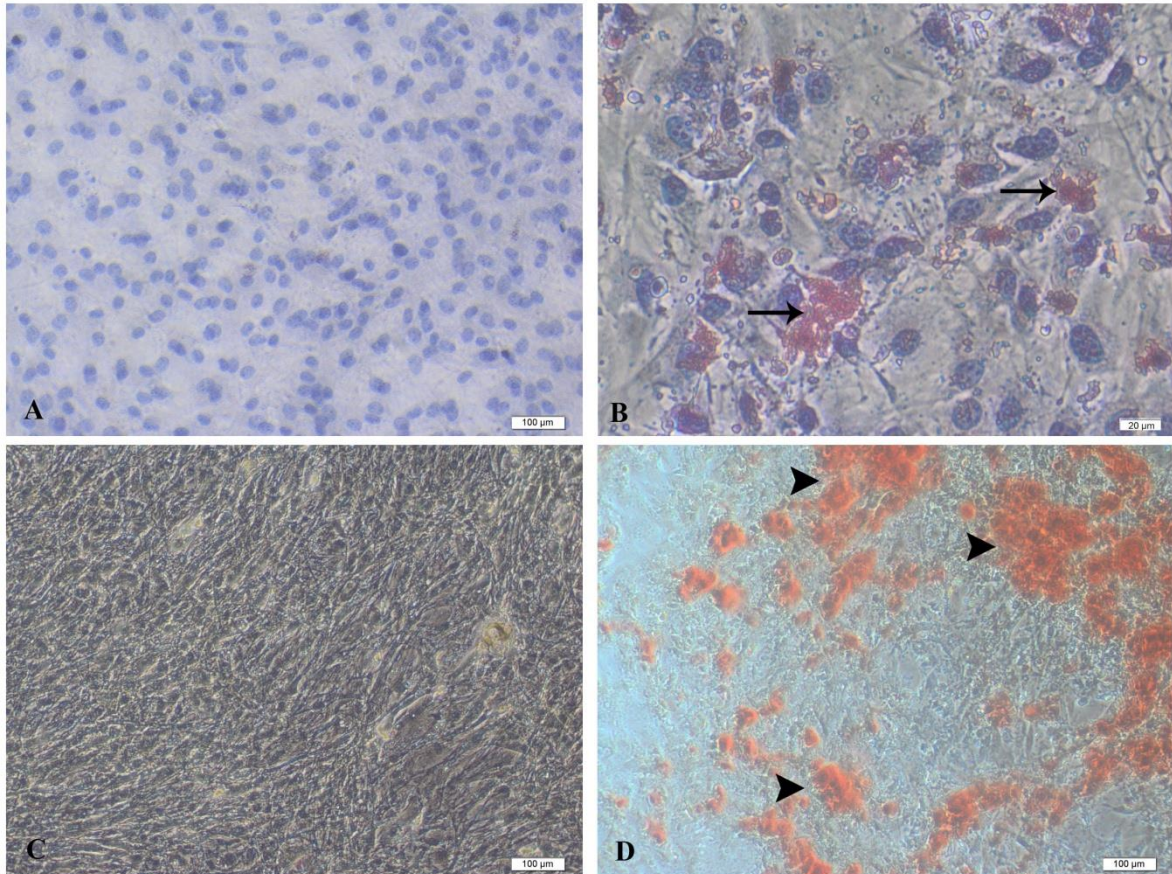
cell density of 90,000 cells/cm<sup>2</sup> and at concentration of 50ng/ml for EGF and FGF the BASCs started differentiating into neurospheres at 24 hours (Figure 3).

The immunofluorescence staining results showed that the neurospheres strongly express neuron specific markers  $\beta$ -III Tubulin, Nestin and Sox2 as shown in the figure (Figure 4). Similar to other studies that have been reported so far, we found that nearly all constituent cells of originated neurospheres were immunoreactive for neural intermediate filament Nestin, proneuronal neurofilament marker  $\beta$ -III Tubulin and transcription factor Sox2 (Reynolds and Weiss 1992, Brazel et al. 2005). The expression of Sox2 and generation of varying mature cell types, including neurons, astrocytes, and oligodendrocytes, proves the legitimate multipotency of neurospheres. Studies report that all neurospheres contain cells at multiple stages of differentiation, including stem cells, which are capable to proliferate into neural progenitor cells, postmitotic neurons, and glial cells (Theocharatos et al. 2013). Moreover, the heterogeneity of the neurosphere increases with its size, since more and varied cell types arise with a longer time in culture (Jensen and Parmar 2006).

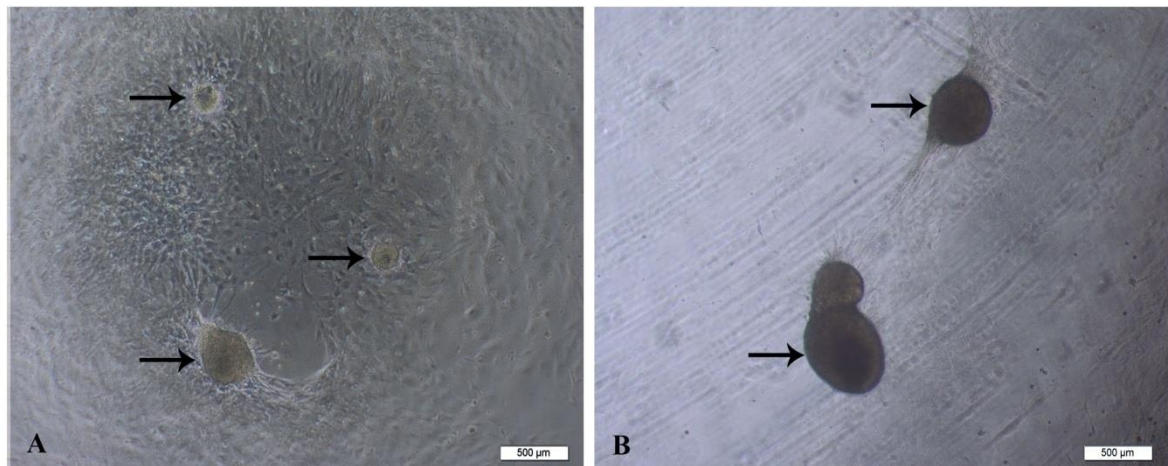
Summarising the neurospheres differentiation and the potent neural markers expression, we assume that BASCs have the great potential to generate neurospheres and could be used to treat the peripheral nerve injuries in veterinary profession.



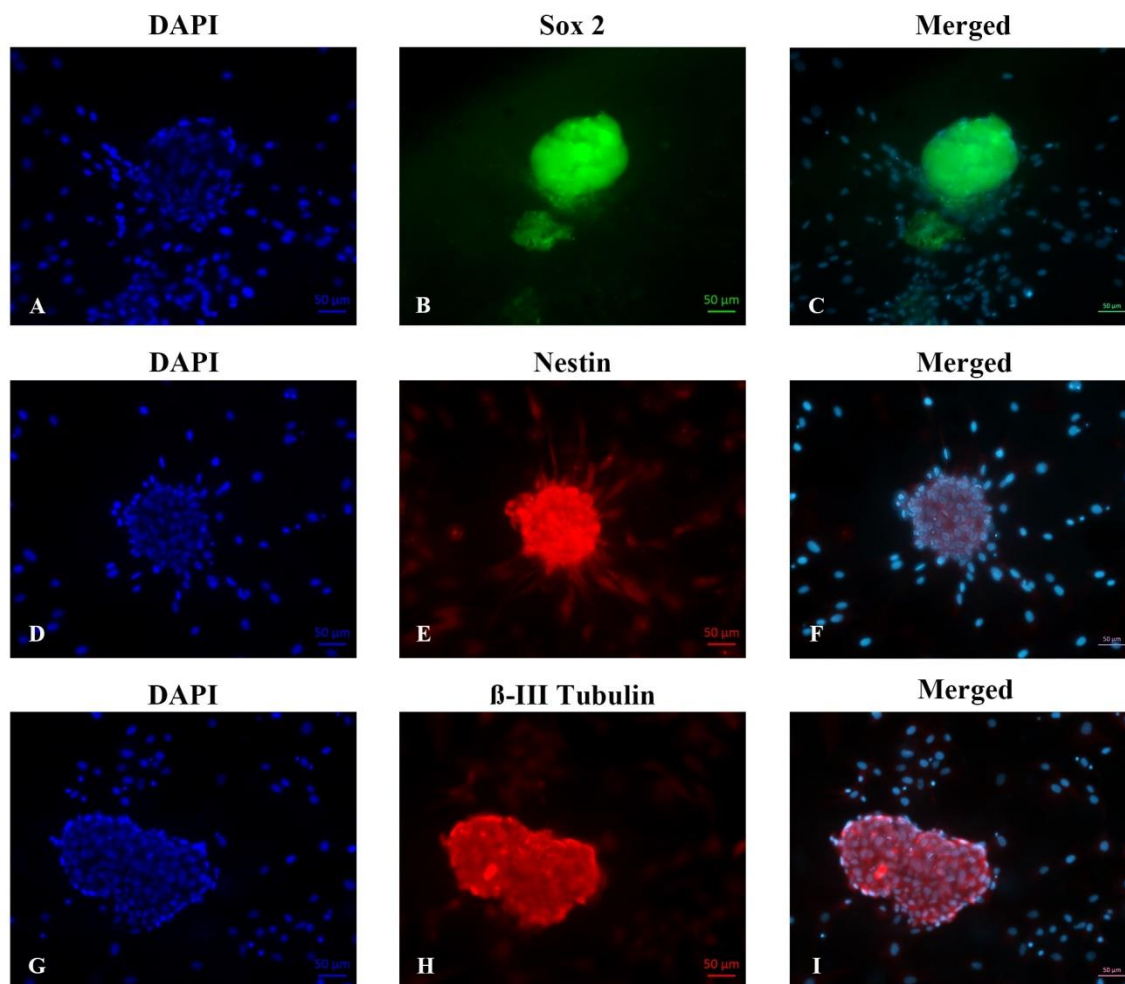
**Figure 1.** Fibroblast-like morphology of BASCs at different passages. A: P0, B: P3; Bar = 100  $\mu$ m.



**Figure 2.** Demonstration of osteogenic and adipogenic differentiations of BASCs. **A,B:** Adipogenic differentiation. **A:** Control group, Bar=100 µm. **B:** experiment group, **arrows:** red stained oil droplets. Bar=20 µm. **C,D:** Osteogenic differentiation. **C:** Control group, Bar=100 µm. **D:** Experiment group, **arrow heads:** Orange-red stained calcium deposits. Bar=100 µm.



**Figure 3.** Neurospheres at different time intervals. **A:** 24<sup>th</sup> hour; **B:** 48<sup>th</sup> hour. Bar =500 µm.



**Figure 4.** Immunofluorescence staining on BASCs derived neurospheres. **A, D, G:** DAPI; **B:** Anti-Sox2, **E:** Anti-Nestin, **H:** Anti- $\beta$ -III Tubulin, **C,F,I:** Merged images.

## CONCLUSION

The study showed that BASCs are able to differentiate into capable neurospheres which express at least Nestin, Sox2 and  $\beta$ -III Tubulin. Although the study showed the neurospheres of BASCs are indeed having important qualities for neurogenesis, the cells should be further investigated for their neuronal character and their neural differentiation potentials by checking other markers such as GFAP, Pax6 etc both with mRNA and protein levels. In addition for the peculiar application functions for regenerative therapies, neurosphere culture system could be a valuable source to study in vitro neurogenesis and neural development in bovines. Since the BASCs express low MHC I and MHC II expression so we can assume that neurospheres harvested from adipose tissues obtained from slaughtered animals could be less immunogenic and may be opted for allogenic studies.

## ACKNOWLEDGEMENT

*All procedures were approved by the Ethical Committee of Afyon Kocatepe University, Turkey (AKÜHADYEK-51-19; 30.04.2019).*

## REFERENCES

- Bez A, Corsini E, Curti D, Biggiogera M, Colombo A, Nicosia RF, S. F. Pagano SF, Parati EA.** Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res.* 2003; 993 (1-2):18-29.
- Brann JH, Firestein SJ.** A lifetime of neurogenesis in the olfactory system. *Front Neurosci* 2014; 8:182.
- Brazel CY, Limke TL, Osborne JK, Miura T, Cai J, Pevny L, Rao MS.** Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell.* 2005; 4(4):197-207.
- Cebo, D.** Characterization Of Bovine Adipose-Derived Stem Cells. *IJSTR* 2017; 6 (5):16-18.
- Chung CS, Fujita N, Kawahara N, Yui S, Nam E, Nishimura R.** A comparison of neurosphere differentiation potential of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Med Sci.* 2013; 75(7): 879-886.
- Chung DJ, K. Hayashi K, Toupadakis CA, Wong A, Yellowley CE.** Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia. *Res Vet Sci.* 2012; 92 (1):66-75.
- Consiglio AL, Tassan S, Corradetti B, Bizzaro D, Bignotti A, Cremonesi F.** 2011. Amniotic mesenchymal-derived



cells for the treatment of tendinopathy in the horse: first report. *Ippologia*. 2011; 22(3):13-28.

**Corradetti B, Correani A, Romaldini A, Marini MG, Bizzaro D, Perrini C, Cremonesi F, Lange-Consiglio A.** Amniotic membrane-derived mesenchymal cells and their conditioned media: potential candidates for uterine regenerative therapy in the horse. *PloS one* 2014; 9(10):e111324.

**Da Silva, CG, Martins CF, Cardoso TC, Da Cunha ER, Bessler HC, Martins GHL, Pivato I, Báo SN.** Production of bovine embryos and calves cloned by nuclear transfer using mesenchymal stem cells from amniotic fluid and adipose tissue. *Cell Reprogram* 2016; 18 (2):127-136.

**Girard SD, Devéze A, Nivet E, Gepner B, Roman FS, Féron F.** Isolating nasal olfactory stem cells from rodents or humans. *JoVE*. 2011;1 (54):e2762.

**Hu F, Wang X, Liang G, Lv L, Zhu Y, Sun B, Xiao Z.** Effects of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and osteogenic and neural differentiation of adipose-derived stem cells. *Cell Reprogram*. 2013; 15 (3):224-232.

**Huaman O, Bahamonde J, Cahuascanco B, Jarvis M, Palomino J, Torres CG, Peralta OA.** Immunomodulatory and immunogenic properties of mesenchymal stem cells derived from bovine fetal bone marrow and adipose tissue. *Res Vet Sci*. 2019; 124:212-222

**Jensen JB, Parmar M.** Strengths and limitations of the neurosphere culture system. *Mol Neurobiol*. 2006; 34 (3):153-161.

**Lange-Consiglio A, Tassan S, Corradetti B, Meucci A, Perego R, Bizzaro D, Cremonesi F.** Investigating the efficacy of amnion-derived compared with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in equine tendon and ligament injuries. *Cytotherapy* 2013; 15 (8):1011-1020.

**Nagase T, D. Matsumoto D, Nagase M, Yoshimura K, Shigeura T, Inoue M, Hasegawa M, Yamagishi M, Machida M.** Neurospheres from human adipose tissue transplanted into cultured mouse embryos can contribute to craniofacial morphogenesis: a preliminary report. *J Craniofac Surg*. 2007; 18 (1):49-53.

**Radtke C, Schmitz B, Spies M, Kocsis J, Vogt P.** Peripheral glial cell differentiation from neurospheres derived from adipose mesenchymal stem cells. *Int J Dev Neurosci*. 2009; 27 (8):817-823.

**Reynolds BA, Weiss S.** Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255 (5052):1707-1710.

**Sampaio RV, Chiaratti MR, Santos D, Bressan FF, Sangalli JR, d. Sá ALA, Silva T, Costa N, Cordeiro M, Santos S.** Generation of bovine (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) adipose tissue derived stem cells: isolation, characterization, and multipotentiality. *Genet Mol Res*. 2015; 14 (1):53-62.

**Sasaki R, Aoki S, Yamato M, Uchiyama H, Wada K, Ogiuchi H, Okano T, Ando T.** A protocol for immunofluorescence staining of floating neurospheres. *Neurosci Lett* 2010; 479 (2):126-127.

**Theocharatos S, Wilkinson DJ, Darling S, Wilm B, Kenny SE, Edgar D.** Regulation of progenitor cell proliferation and neuronal differentiation in enteric nervous system neurospheres. *PloS one* 2013; 8 (1):e54809.

## Determination of Helminths of Red Fox (*Vulpes vulpes*) by Fecal Examination in Middle Anatolia and Thrace

Ali Tümay GÜRLER<sup>1\*</sup>, Cenk Soner BÖLÜKBAŞ<sup>1</sup>, Mustafa AÇICI<sup>1</sup>, Şinasi UMUR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Samsun

### ABSTRACT

Red foxes, which are wild carnivores with the densest population in the world, live in areas close to where people live. There are numerous studies on parasites, especially about zoonotic helminths, in red foxes are definitive hosts for various parasite species. Limited number of researches have been conducted in Turkey. The purpose of this study was to investigate the helminths of red fox by fecal examination. In total, 409 fox feces were examined by fülleborne-flotation method and 20 different helminth eggs in 16 groups were detected on 65,8% of samples; Dicrocoelid, diplostomid, echinostomid, heterophyid, anoplocephalid, *Joyeuxiella* sp., *Mesocostoides* sp., *Taenia* sp. *Capillaria* sp., rictularid, strongyl, strongyloid, *Trichuris* sp., *Toxascaris leonina*, ve *Toxocara* sp. Trematod eggs, taenid type eggs and *Toxocara* sp. had more importance, because of their zoonotic importance. Additionally, *Trichuris* sp. was the first report from red foxes in Turkey.

**Keywords:** Red fox, helminth, fecal examination, Middle Anatolia, Thrace

\*\*\*

### Orta Anadolu ve Trakya'da Kızıl Tilkilerde (*Vulpes vulpes*) Dışkı Muayenesine Göre Bulunan Helmint Türleri

### ÖZ

Kızıl tilkiler insanların yaşadığı alanlara yakın bölgelere adapte olmuş, dünyada en yoğun popülasyona sahip olan yabani karnivorlardır. Birçok helmint türü için sonkonak olan tilkilerde, zoonoz helmintler başta olmak üzere, çok sayıda araştırma yapıldığı görülür. Ülkemizde ise konu ile ilgili bilgi oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada tilkilerde dışkı bakısıyla tespit ettiğimiz helmintlerin bildirilmesi amaçlanmıştır. Araştırma süresince Orta Anadolu'yu temsilen Kayseri ve Nevşehir illerinden ve Trakya'yı temsilen Kırklareli, Tekirdağ ve Edirne illerinden toplanan 409 tilki dışkısı fülleborn-flotasyon yöntemi ile incelenmiştir. İncelen örneklerin %65,8'inde 16 grup içinde 20 farklı helmint yumurtasına rastlanmıştır; Dicrocoelid, diplostomid, echinostomid, heterophyid, anoplocephalid, *Joyeuxiella* sp., *Mesocostoides* sp., *Taenia* sp. *Capillaria* sp., rictularid, strongyl, strongyloid, *Trichuris* sp., *Toxascaris leonina*, ve *Toxocara* sp. Bu yumurtalardan trematodlar, taenid tip ve *Toxocara* sp. yumurtaları zoonotik önemlerinden dolayı ön plana çıkmıştır. Ayrıca *Trichuris* sp. tilkilerden ülkemizde ilk bildirim olmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Kızıl tilki, helmint, dışkı bakısı, Orta Anadolu, Trakya

To cite this article: Gürler A.T. Bölükbaş C.S. Açıcı M. Umur Ş. Determination of Helminths of Red Fox (*Vulpes vulpes*) by Fecal Examination in Middle Anatolia and Thrace. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):343-350

Submission: 03.04.2019 Accepted: 25.08.2019 Published Online: 29.08.2019

ORCID ID; ATG: 0000-0001-8092-1245, CSB: 0000-0002-4863-696X, MA: 0000-0002-8406-9739,

ŞU: 0000-0001-9766-2817

\*Corresponding author e-mail: tgurler@omu.edu.tr

## GİRİŞ

Yabani karnivorlar arasında en fazla popülasyona sahip olan kızıl tilkiler (*Vulpes vulpes*), ülkemiz dahil tüm Kuzey yarım kürede yayılım gösterir. Av yasağı ve kuduz programları ile birlikte sayıları artan tilkilere, şehir merkezlerinde, parklarda ve sokaklarda bile sıklıkla rastlanabilmektedir. Bu yakın ilişki ve temas alanı nedeniyle, tilkilerden insanlara birçok parazit ve hastalık bulaşabilmektedir. Bu hastalıkların belirlenmesi ve kontrolü amacıyla, çok sayıda çalışma yapılmış, bu çalışmaların önemli bir kısmını da helmantik zoonozlar oluşturmuştur (Smith ve ark. 2003, Letkova ve ark. 2006, Magnaval ve Glickman 2006, Hegglin ve Deplazes 2008, Magi ve ark. 2008). Tilkiilerdeki parazitlerin tespitine yönelik makaleler incelendiğinde, insanlarda alveolar ekinokokkosis'e neden olan *Echinococcus multilocularis* ve trichinellosis'e neden olan *Trichinella* türleri başta olmak üzere, viseral toksokariosis etkeni olan *Toxocara* sp. ve zoonoz bir trematod olan *Alaria alata* öncelikle araştırılan zoonoz helmintler olarak karşımıza çıkmaktadır (Shimalov ve Shimalov 2003, Saeed ve ark. 2006, Cerbo ve ark. 2008, Zare-Bidaki ve ark. 2010). Türkiye'de tilkiilerdeki parazitlerin tespitine yönelik yapılan çalışmalara bakıldığı zaman ise fazla araştırma bulunmadığı görülür. Bu araştırma ile ülkemizde tilki parazitlerine dikkat çekmek ve literatür boşluğuna bir katkı yapmak amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Çalışma materyalini Türkiye'de tilkiilerde *E. multilocularis*'in varlığı ve yayılışını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışma kapsamında toplanan tilki dışkıları

oluşturmuştur. Tilki dışkıları morfolojik olarak kedi dışkısına benzerdir, ancak içerisinde çok miktarda meyve çekirdeği (yöresine göre değişiklik gösterir; yabani armut, alıç, üzüm gibi) ihtiva eder. Ayrıca tilkiler dışkılarını genellikle tümsek, taş üstü ya da duvar üstü gibi kolaylıkla görülebilen yerlere bırakırlar. Bu özellikleri sayesinde de çevrede bulunan köpek, kedi, çakal, kurt, sansar gibi diğer karnivorların dışkılarından kolaylıkla ayırt edilebilirler. Araştırma Kayseri, Nevşehir, Tekirdağ, Edirne ve Kırklareli illerine bağlı ilçelerde, 2014 - 2015 yılları arasında yürütülmüştür. Tilki dışkıları rengi, içeriği ve şekliinden ayırt edilerek toplanmıştır. Toplanan dışkı örnekleri ayrı poşetlere konmuş, numaralandırılmış, her bir örneğin alındığı il, ilçe ve koordinatlar kaydedilmiştir. Dışkı örnekleri incelenmeden önce -80°C'de 1 hafta bekletilmiş, böylece zoonoz helmint yumurtalarının inaktif olması sağlanmıştır. Genel toplamda Orta Anadolu'dan 188, Trakya'dan 221 olmak üzere toplam 409 tilki dışkısı toplanmış ve fülleborn-flotasyon yöntemi (880 gr ZnCl / 1 L su, d: 1.5) ile incelenmiştir. Tespit edilen helmint yumurtaları ilgili literatürler ışığında teşhis edilmiş (Thienpont ve ark. 1990, Tınar, 2011) ve kaydedilmiştir.

## BULGULAR

Dışı muayenesi sonucunda, 409 tilki dışkısının 267 (%65,3)'sinde çeşitli helmint yumurtalarına rastlanmıştır (Şekil 1). Genel enfeksiyon oranı Orta Anadolu'da %63,3, Trakya'da %66,9 olup, bulunan helmint yumurta tipleri ve oranları Tablo 1'de sunulmuştur.

**Tablo 1.** Tilki dışkılarında tespit edilen helmint yumurtaları

**Table 1.** Helminth eggs in fox feces

Sınıf	Tür/Grup	Orta Anadolu (%) (n=188)	Trakya (%) (n=221)	Toplam (%) (n=409)
Trematoda	Dicrocoelid tip	3 (%1,6)	2 (%0,9)	5 (%1,2)
	Diplostomid tip	3 (%1,6)	4 (%1,8)	7 (%1,7)
	Echinostomid tip	3 (%1,6)	3 (%1,4)	6 (%1,5)
	Heterophyid tip	2 (%1,1)	1 (%0,5)	3 (%0,7)
Cestoda	Anoplocephalid tip	-	1 (%0,5)	1 (%0,2)
	<i>Joyeuxiella</i> sp.	6 (%3,2)	-	6 (%1,5)
	<i>Mesocestoides</i> sp.	1 (%0,5)	-	1 (%0,2)
	<i>Taenia</i> sp.	9 (%4,8)	3 (%1,4)	12 (%2,9)
Nematoda	<i>Capillaria</i> sp.	23 (%12,2)	73 (%33)	96 (%23,5)
	Rictularid tip	13 (%6,9)	1 (%0,5)	14 (%3,4)
	Strongyl tip	8 (%4,3)	8 (%3,6)	16 (%3,9)
	Strongyloid tip	9 (%4,8)	-	9 (%2,2)
	<i>Trichuris</i> sp.	5 (%2,7)	11 (%5,1)	16 (%3,9)
	<i>Toxascaris leonina</i>	59 (%31,4)	43 (%19,5)	102 (%24,9)
	<i>Toxocara</i> sp.	30 (%15,9)	41 (%18,6)	71 (%17,4)
Acantocephala	<i>Macracanthorhynchus</i> sp.	33 (%17,6)	4 (%1,8)	37 (%9)

## TARTIŞMA

Tilkilerde bulunan helmintlerin tespitine yönelik yapılan çalışmaların çoğunda yoğun helmint enfeksiyonu olduğu (%85,1-100) ve çok sayıda farklı helmint türü bulunduğu görülür (Gortazar ve ark. 1998, Shimalov ve Shimalov 2003, Dalimi ve ark. 2006, Saeed ve ark. 2006, Martinez-Carrasco ve ark. 2007). Yapılan bu çalışmada ise, yalnız dışkı muayenesi sonuçlarını içermesine rağmen genel helmint enfeksiyonu %65,3 gibi yüksek bir oranda bulunmuştur. Bulunan helmint yumurtaları morfolojilerine göre ayrıldığında trematod, sestod, nematod ve acanthocephala sınıflarına ait 16 farklı tipte yumurta kaydedilmiştir. Tespit edilen bu yumurtaların teşhisi yapılırken öncelikle tilkilerde bulunan helmintler göz önünde bulundurulmuş olsa da, yumurtaların kemiriciler başta olmak üzere, tilkilerin avladığı herhangi bir hayvana ait olabileceği de değerlendirilmiştir. Tilkiler ortalama 6 km<sup>2</sup>lik bir alanda gezdikleri için, toplanan bazı dışkıların aynı tilkiye ait olma ihtimali olduğu, bunun yanında, trematod ve sestodlar enfeksiyonları başta olmak üzere dışkı bakısında bulunan sonucun nekropsiyeye oranla düşük olacağı dikkate alınmalıdır. Sunulan veriler bu durumlar göz önünde bulundurularak değerlendirilmelidir.

Nekropsi çalışmalarına göre bugüne kadar ülkemiz tilkilerinde görülen trematod türleri *Alaria alata*, *Heterophyes heterophyes*, *H. dispar*, *Phagicola longa* ve *Stictodora sawakinensis* (Mimioğlu ve ark. 1965, Burgu ve Güçlü 1991, Gıcıoğlu ve ark. 2009) olarak kaydedilmiştir. Ülkemize yakın coğrafyalardan ise, yukarıdaki türler yanında *Apopballus donicus*, *Cryptocotyle lingua*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Echinochasmus perfoliatus*, *Isthmiophora melis*, *Metagonimus yokogawai*, *Metorchis bilis*, *Opisthorchis felinus*, *Pseudamphistomum truncatum* (Shimalov ve Shimalov 2003, Bowman ve ark. 2002, Craig ve Craig 2005) gibi trematod türlerine de rastlanmıştır.

Digenik trematodlar metazoan endoparazitler içinde en geniş grup olup, onlarca aile ve yüzlerce cins ayrılmakta ve 18000 dolayında türü kapsamaktadır (Olson ve ark. 2003). Tilkilerde Brachylemidae, Cyathocotylidae, Dicrocoelidae, Diplostomidae, Echinostomatidae, Heterophyidae, Nanophyetidae, Opisthorchidae ve Troglotremitidae gibi neredeyse her aileden çok sayıda türe rastlanmaktadır. Ancak en yaygın görülenler heterophyid türlerdir. Birçok trematod yumurtası şekil ve boyut olarak birbirlerine çok benzer olduğundan ışık mikroskopunda ayrımı kolay değildir. Bu nedenle yumurtalar grup olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada 3 dicrocoelid, 2 heterophyid, 1 diplostomid ve 1 echinostomid tip olmak üzere 7 farklı trematod yumurta tipi saptanmıştır. Trematoda sınıfında bulunan parazitlerin hemen tamamının zoonoz özellikle

olması nedeniyle, bu gruptaki parazitler insan sağlığı açısından önem arz etmektedir.

İlk sırada görülen yumurta (Şekil 1.A) saptanan en küçük yumurta olup 22.4 x 15.2 µm çapında, kapağın birleşme yerinde omuz benzeri hafif çıkıntı olmasına karşın, kapağın karşı tarafında çıkıntısı yoktur. Yumurta taze olmadığı için mirasidyum görünmemekle birlikte şekil ve boyut olarak heterophyid tip yumurta olarak tanımlanmıştır. Bu gruptan ülkemiz tilkilerinde *Heterophyes heterophyes*, *H. dispar* ve *Stictodora sawakinensis* kaydedilmiştir. Bunun yanında kedi ve köpeklerde *Dexigoniimus ciurenaeus*, *Metagonimus yokogawai*, *Ascocotyle (Phagicola) longa*, *A. (P.) italica* ve *Platynosomum fastosum*'a rastlanmış olup bu türlerin de tilkilerde görülme olasılığı çok yüksektir (Tinar 1976, Umur 1997, Umur 1998; Biçek ve ark. 2017). Yukarıdaki türlerden yumurta uzunluğu 21-24 µm aralığında olan tek tür *Heterophyes dispar* olup, bu türün daha önce ülkemizde görülmüş olması nedeniyle yumurtanın bu türe ait olabileceği sanılmaktadır.

İkinci tip yumurta (Şekil 1.B) asimmetrik, 37.5-41.16 x 19.65-23.5 µm ve kapağın karşı kutbunda dışa doğru belirgin çıkıntı vardır. Yumurta taze olmadığından içinde embriyo yerine hava kabarcığı görülmektedir. Şekil ve boyutları nedeniyle heterophyid tip olarak tanımlanmıştır. Yumurta boyut olarak biraz küçük olsa da, şekil olarak *Stictodora* yumurtası olabileceği düşünülmüştür. Ülkemizde bu cinsten *S. sawakinensis*'e rastlanmış olması (Burgu ve Güçlü 1991) da bu savımızı destekler niteliktedir.

Üçüncü tip yumurta (Şekil 1.C) 29.6 x 23.6 µm çapında, simetrik, kısmen kalın kabuklu olup kapağın birleşme yeri iç kısımda belirgin, ancak dışa doğru çıkıntı yapmaz ve karşı kutupta çıkıntı yoktur. Dışkı taze olmadığı için içinde embriyo yerine hava kabarcığı bulunan yumurta, şekil, boyut ve görünüm nedeniyle dicrocoelid tip olarak tanımlanmıştır. Ancak Dicrocoelidae ailesi 45 cins ve 400 den fazla tür barındırır (Pojmańska 2008). Yumurtanın taze olmamasından dolayı cins veya tür tanımı yapılamamıştır. Bununla birlikte Avrupa'da tilki ve sincaplarda yaygın olarak bulunan *Athesmia foxi* (30-40 x 19-25 µm) veya ülkemizde kuşlarda rastlanan (Gönenç ve ark., 2012), Avrupa'da kemiricilerde yaygın olan *Corrigia* veya *Lyperosomum* türleri benzer en yakın türler olarak değerlendirilmiştir.

Dördüncü tip yumurta (Şekil 1.D) 37-44 x 18-25 µm, hafif asimmetrik ve kısmen geniş olup, dicrocoelid tiptedir. Bu grupta çok çeşitli trematodlar bulunur. Bulduğumuz yumurtalar kemirici, kanatlı, kirpi ve kurbağalarda rastlanan ve arakonaklığını kara sümüklülerinin yaptığı *Brachylecithum* türlerine ait yumurtaları akla getirmektedir. Bu cins altında Avrupa'da 30'dan fazla tür bulunmaktadır (Hildebrand ve ark. 2016).

Beşinci tip yumurta (Şekil 1.E) dicrocoelid tipte ve 43.28 (36.47-50.09) x 28.48 (23.68 - 33.27) µm çapında, kalın kabuklu ve kapaklı olup boyut, şekil ve görüntü olarak *Platynosomum fastosum* yumurtası olarak düşünülmüştür. Parazite ülkemizde kedilerde rastlanmış ve yumurta büyüklüğü 45x35 µm olarak verilmiştir (Biçek ve ark. 2017).

Altıncı tip yumurta (Şekil 1.F) küçük tip echinostomid yumurta olarak tanımlanmıştır. Bu gruptan tilki ve köpeklerde *Echinocashmus perfoliatus* görülmekte olup yumurtaları orta boy ve 75-86 x 52-63 µm çapındadır (Güralp 1981; Tınar 2011). Tilki dışkıları beklediği için kapakları açılmış ve içyapısı bozulmuştur, buna karşın genel yapısı ve ölçüm sonuçlarına göre yumurtalar ortalama 73.6 x 50.7 (70-78 x 50-55) µm çapında ölçülmüş ve şekil olarak *Echinocashmus* sp. (*perfoliatus*?) yumurtası olabileceği tahmin edilmiştir. Ayrıca kürsümüzde bulunan ergin *E. perfoliatus* yumurtaları ile de karşılaştırma yapılmıştır.

Yedinci tip yumurta (Şekil 1.G) şekil ve boyutlarıyla diplostomid yumurta olarak tanımlanmıştır. Bu grupta 20'den fazla cins ve yüzlerce tür mevcut olup memeli, kanatlı, balık vb. birçok canlıda parazitlenir. Ancak yumurtanın taze, içyapısının belirgin olması nedeniyle tilkiye ait olabileceği tahmin edilmiştir. Bu gruptan ülkemizde tilki ve köpeklerde görülen tür *Alaria alata*'dır (Umur 1998). Bunun yumurtaları 98-134 x 62-68 µm'dir. Bu çalışmada tip 7'nin boyutları 124.5 x 67.3 (119.9 - 132.9 x 63.9 - 71.9) µm olarak saptanmış, bu nedenle *A.alata* yumurtası olabileceği tahmin edilmiştir.

Bu çalışmada sestoda sınıfından, *Joyeuxiella* sp. tip, *Mesocestoides* sp. tip ve taenid tip olmak üzere üç farklı helmint yumurtasına rastlanmıştır. Bunun yanında bir örnekte ise anoplocephalid tip tek bir yumurta görülmüştür (Şekil 2.A). Tavşanlarda ülkemizde Anaplocephalidae ailesinden *Mosgovoyia* ve *Cittotaenia* (Taşan 1989) türleri bildirilmiş, bu nedenle bu yumurtanın tilkinin av menüsünde olan bir tavşana ait olabileceği düşünülmüştür.

İran ve İspanya'da %1,2-34,6 oranları arasında *J. pasqualei* (Gortazar ve ark. 1998, Dalimi ve ark. 2006, Martinez-Carrasco ve ark. 2007, Zare-Bidaki ve ark. 2010), Suudi-Arabistan'da 8 tilkinin 6'sında *J. echinorynchooides* bulunmuştur (Alagaili ve ark. 2011). Türkiye'de tilkilerde bildirilen tür ise *J. echinorynchooides* (%1,9)'dir (Mimioğlu ve ark. 1955). *Mesocestoides* sp. ise tilkilerde en fazla görülen helmintlerden biri olup dünyada yayılışı bazı çalışmalarda %80'lere varmaktadır (Gortazar ve ark. 1998, Cerbo ve ark. 2008, Zare-Bidaki ve ark. 2010). Tilkilerde genellikle *M. lineatus* bulunmakla birlikte, *M. litteratus* da bildirilmiştir (Criado-Fornelio ve ark. 2000, Shimalov ve Shimalov 2003, Martinez-Carrasco ve ark. 2007). Türkiye'de tilkilerde bulunan tek tür ise *M. lineatus*

(%60-76,9)'dur (Mimioğlu ve ark. 1955, Gıcık ve ark. 2009). Bunun yanında ülkemizde köpekte *M. corti* bulunduğu da bilinmektedir (Aypak ve ark. 2012). Bu çalışmada *Joyeuxiella* sp. ve *Mesocestoides* sp. yumurtalarına rastlanmıştır (Şekil 2.B, 2C). Bu iki sestodun bulunma oranı literatürlerde bildirilenlere göre oldukça düşüktür. Bunun nedeni söz konusu olan iki sestodun dışkı ile atılan halkalarının dayanıklı olmasından dolayı dışkıda parçalanmaması ve flotasyon yöntemi ile yumurtaların tespit edilememesi olarak yorumlanabilir.

Tilkilerde Taenidae ailesinden birçok sestod türü bulunur. Bütün *Taenia* ve *Echinococcus* türlerinin yumurtası morfolojik olarak neredeyse birbirinin aynı olup, taenid tip (Şekil 2.D) olarak isimlendirilirler. Tilkiler bu türlerden *Echinococcus multilocularis*'in asıl son konağıdır ve parazite tilkilerde yaygın olarak rastlanır. İnsanlarda ölümcül bir hastalık olan alveolar ekinokokkozise neden olduğu için tilkilerdeki yayılışı ile ilgili dünyada çok sayıda çalışma yapılmıştır (Oksanen ve ark., 2016). Diğer önemli bir zoonoz tür olan *E. granulosus* da tilkilerde bildirilmiştir (Dalimi ve ark. 2006, Hackett ve Walters 1980, Richards ve ark. 1995). Bunun yanında *Taenia crassiceps*, *T. hydatigena*, *T. multiceps*, *T. pisiformis*, *T. polyacantha* ve *T. taeniaeformis* türleri Taenidae ailesinde bulunan ve tilkilerden bildirilen diğer türlerdir (Rataj ve ark. 2013, Saeed ve ark. 2006, Shimalov ve Shimalov 2003). Türkiye'den kaydedilen türler ise *E. multilocularis* (10 tilkiden birinde), *E. granulosus* (%5), *T. multiceps* (%10), *T. pisiformis* (%10), *T. polyacantha* (%13,6), *T. taeniaeformis* (%10)'dir (Mimioğlu ve ark. 1955, Gıcık ve ark. 2009, Avcıoğlu ve ark. 2016). Bu çalışmada tilki dışkılarında % 2,9 oranında taenid tip yumurta bulunmuş, ancak tür ayrımı yapılmamıştır. Konu ile ilgili detaylı sonuçlara ilgili literatürden ulaşılabilir (Gürler ve ark. 2018).

İncelenen tilki dışkılarının %3,4'ünde rictularid tip yumurtaya rastlanmıştır (Şekil 2.F). Rictularid tip yumurtalar *Physaloptera* sp. yumurtalarına benzemekle birlikte, dış katmanının ince oluşu ve eninin daha geniş oluşu ile farklılık gösterir (Tınar, 2011). Dünya literatürleri incelendiğinde Rictularidae ailesinden tilkilerden bildirilen türün *Pterygodermatitis affinis* (syn=*Rictularia affinis*) (%4,2-54,5) olduğu görülür (Gortazar ve ark. 1998, Martinez-Carrasco ve ark. 2000, Cerbo ve ark. 2008, Dalimi ve ark. 2008, Rataj ve ark. 2013). Türkiye'de ise bu aileden tilkilerden bildirilen tek tür *R. cabirensis* (%27,4)'dir (Mimioğlu ve ark. 1955).

Strongylida takımında binlerce tür bulunur ve bunların çoğunluğunda yumurtadan tür teşhis mümkün değildir. Tilki dışkılarında, bu takımda bulunan ve strongylid ya da strongyloid tip olarak tanımlanabilecek çeşitli yumurtalara rastlanmıştır (Şekil 2.E, 2.G1, 2.G2). Strongylida takımında çok fazla tür bulunması ve dışkılarının yerden toplanması

nedeniyle, tespit edilen bu yumurta tipleri için bir yorum yapmaktan kaçınılmıştır.

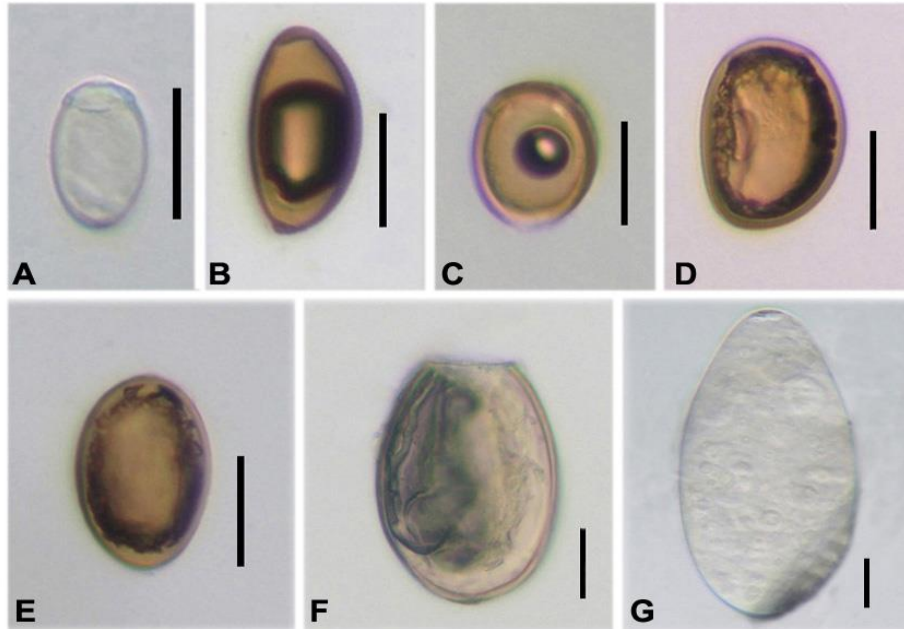
Askaridiosis dünyada ve Türkiye'deki karnivorlarda yaygın olarak görülen, *Toxocara canis*, *T. cati* ve *Toxascaris leonina*'nın neden olduğu paraziter bir hastalıktır (Tinar 2011). Tilkilerde *T. canis* (Wolfe ve ark. 2001, Vervaeke ve ark. 2005) ve *T. leonina* (Reperant ve ark. 2007, Ziadinov ve ark. 2010)'ya sıklıkla rastlanırken, *T. cati*'nin bildirildiği yayın da mevcuttur (Martinez-Carrasco ve ark. 2007). Türkiye'de tilkilerde yapılan çalışmalarda *Toxocara canis* (%20-35,2) ve *Toxascaris leonina* (11,1-65) bildirilmiştir (Mimioğlu ve ark. 1955, Gıcık ve ark. 2009). Bu çalışmada hem *Toxocara* sp. (Şekil 2.H) hem de *T. leonina* yumurtasına (Şekil 2.I) rastlanmıştır.

*Trichuris* cinsinde tilkilerden bildirilen tek tür *T. vulpis*'dir. Dünyada yayılışı %0,2-12,3 arasında değişirken (Gortazar ve ark. 1998, Cerbo ve ark. 2008, Rataj ve ark. 2013), Türkiye'de tilkilerden bildirim yoktur. Bu çalışmada ise tilkilerde ilk olarak tesadüf edilen parazitin yumurtasına (Şekil 2.K) dışkı örneklerinin % 3,9'unda rastlanmıştır. *Capillaria* cinsinde ise *C. aerophila* (akciğerde) ve *C. plica* (ıdrar kesesinde) türlerine sıklıkla rastlanmakta, dünyadaki yayılışları sırasıyla % 0,2-74,1 ve % 80,5 olarak verilmektedir (Richards ve ark. 1995, Criado-Fornelio ve ark. 2000, Saeed ve ark. 2006). Bunun dışında tür belirtmeksizin barsaklardan *Capillaria* sp. (%0,3-22,5) toplanan bildirimler de mevcuttur (Cerbo ve ark. 2008, Ziadinov ve ark. 2010, Rataj ve ark. 2013). Gıcık ve ark. (2009) nekropsi yaptıkları 20 tilkiden

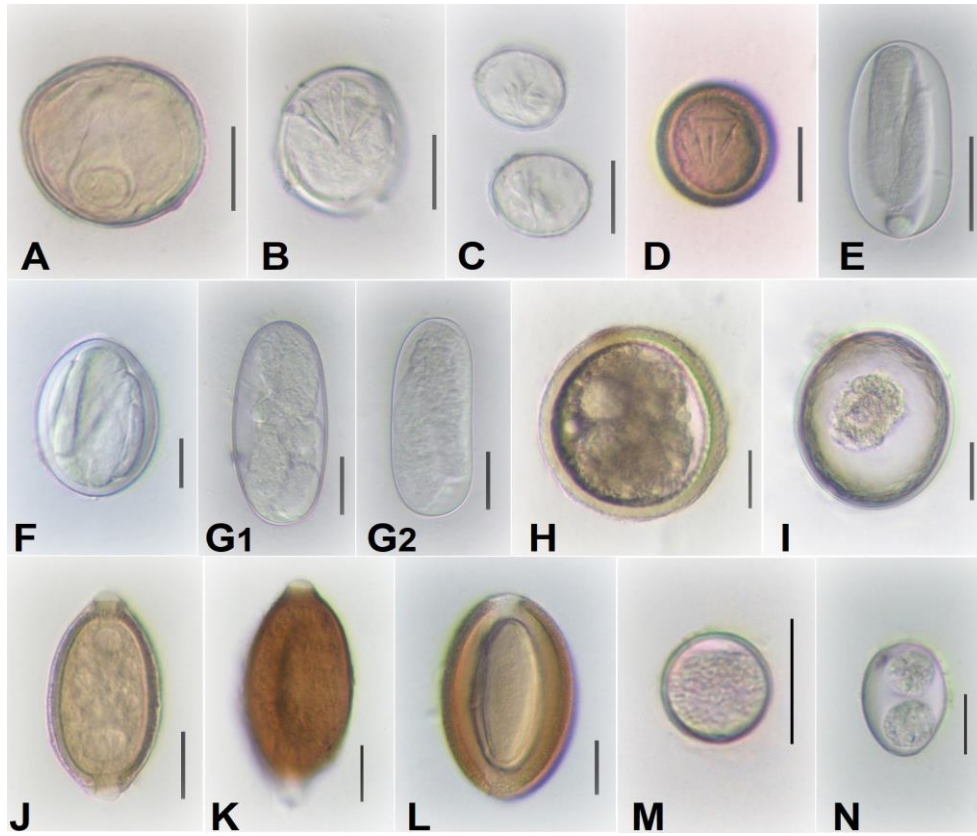
birinin (%5) incebağırsağında *Capillaria* sp. bulunduğunu bildirmiştir. Mimioğlu ve ark. (1955) ise *C. aerophila*'ya (%19,6), *C. plica* (%5,8) ve *C. lineare* (%3,9)'ye tesadüf etmişlerdir. *Capillaria lineare* ile ilgili literatür bilgi tartışmalıdır. Mimioğlu ve ark. (1955) bu türün *C. feliscati* ile sinonim olabileceğinden bahsetmiş ancak günümüzde *Capillaria* cinsinde böyle bir tür olmadığı belirtilmektedir (Moravec 2000). Bizim çalışmamızda ise tilki dışkılarının % 23,5'inde capillariid tip yumurta (Şekil 2.J) bulunmuştur.

Acanthocephala sınıfından tilkilerde çeşitli türler bildirilmiş olup, *Macracanthorhynchus catulinus* % 0,1-27,3 (Richards ve ark. 1995, Shimalov ve Shimalov 2003, Martinez-Carrasco ve ark. 2007), *M. birudinaceus* %22,7 (Dalimi ve ark. 2006), *Prosthorhynchus transversus* %0,7 (Richards ve ark. 1995) ve *Polymorphus* sp. %1,2 (Saeed ve ark. 2006) oranlarında bildirilmiştir. Türkiye'den tilkilerden bildirilen tek tür ise *M. birudinaceus* (%43,1)'dur (Mimioğlu ve ark. 1955). Bu çalışmada tespit edilen acanthocephalid tip yumurtaların morfolojik olarak *Macracanthorhynchus* sp. türlerine benzediği görülmüştür (Şekil 2.L).

Helminth yumurtaları yanında protozoon ookistlerine de rastlanmıştır. Bunlar küçük tip (%2,7) ve büyük tip (%4,2) olmak üzere iki farklı protozoon grubu olarak değerlendirilmiştir. Büyük tip ookistler (Şekil 2,N) *Isoospora* sp., küçük tiplerin (Şekil 2.M) *Besnoitia* sp., *Hammondia* sp., *Sarcocystis* sp., ya da sporlanmamış küçük tip *Isoospora* sp. olabileceği düşünülmüştür (Dumanlı ve Karaer 2010).



Şekil 1. Tilki dışkılarında rastlanan trematod yumurta tipleri (ölçü 20µm)  
Figure 1. Trematod egg types in fox feces (bar 20µm)



**Şekil 2.** Tilki dışkılarında sestod, nematod ve acanthocephala yumurtaları (ölçü 20µm)  
**Figure 2.** Cestoda, nematoda and achatocephalid eggs in fox feces (bar 20µm)

## SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışma ile tilki dışkılarında rastladığımız helmint yumurtalarının verilmesi ve ülkemizde bu konudaki literatüre katkı yapılması hedeflenmiştir. Araştırma sonucunda 20 farklı helmint yumurta tipine rastlandığı görülmüştür. Dışkı materyalinin az olması nedeniyle yalnız flotasyon yöntemi kullanılmış, sedimentasyon ve Baerman Wettzel yöntemleri ile dışkı incelenememiş ve dolayısıyla da bazı trematod helmint yumurtalarını ve larvaları görme imkanımız olmamıştır. Bunun yanında bulunabilecek zoonoz hastalıklardan korunmak için dışkı dondurulmuştur. Bu da sonuçları olumsuz etkileyecek bir unsurdur. Sonuçlar değerlendirilirken bu durumlar göz önünde bulundurulmalıdır. Bunlardan bazılarının zoonoz olması, bazılarının da Türkiye’de tilkilerden ilk kayıt olması münasebetiyle önem arz ettiği gözlenmiştir. Ülkemizde yabani karnivorlarda bulunan helmintlerin ortaya çıkarılması için daha pek çok çalışmaya ihtiyaç vardır. Yapılacak bu çalışmaların nekropsisi sonuçlarına dayanması durumunda, elde edilecek verilerin gerçeği daha iyi yansıtacağı da göz önünde bulundurulmalıdır.

## TEŞEKKÜR

19. Ulusal Parazitoloji Kongresi’nde poster bildiri olarak sunulmuştur.

## KAYNAKLAR

- Alagaili AN, Osama BM, Sawsan AO.** Gastrointestinal parasites and their prevalence in the Arabian red fox (*Vulpes vulpes arabica*) from the Kingdom of Saudi Arabia. *Veterinary Parasitology*, 2011; 180: 336-339.
- Avcioğlu H, Güven E, Balkaya İ, Kurt A, Oral A, Kirman R, Bia MM, Gülbeyen H, Yaya S, Akyurt M.** Molecular epidemiology of cystic and alveolar echinococcosis in Erzurum, Turkey. 27. World Congress on Echinococcosis, Algiers, Algeria, 2018.
- Aypak S, Aysul N, Ural K, Birincioğlu S, Atasoy A, Derincegöz O, Epikmen T, Karanuç T.** A case of diffuse peritoneal larval *Mesocostoides corti* (syn. *M. vogae*) cestodiasis in a dog in Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2012; 18: 885-888.
- Bıçek K, Değer MS, Karakuş A.** The first case of *Platynosomum fastosum* Kossca, 1910 in cats in Turkey. *Van Veterinary Journal*, 2017; 28: 113-115.
- Bowman DD, Hendrix CM, Lindsay DS, Barr SC.** *Feline Clinical Parasitology*. Iowa State University Press, Ames, 2002.
- Burgu A, Güçlü F.** Bir tilkide rastlanan trematod türleri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1991; 38: 227-241.
- Cerbo AR, Manfredi MT, Trevisiol K, Bregoli M, Ferrari N, Pirinesi F, Bazzoli S.** Intestinal helminth communities of the red fox (*Vulpes vulpes* L.) in the Italian Alps. *Acta Parasitologica*, 2008; 53: 302-311.
- Craig HL, Craig PS.** Helminth parasites of wolves (*Canis lupus*): a species list and an analysis of published prevalence studies in Nearctic and Palaearctic populations. *Journal of Helminthology*, 2005; 79: 95-103.

- Criado-Fornelio A, Gutierrez-Garcia L, Rodrigues-Caabeiro F, Reus-Garcia E, Roldan-Soriano MA, Diaz-Sanchez MA.** A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Veterinary Parasitology*, 2000; 92: 245-251.
- Dalimi A, Sattari A, Motamedi G.** A study on intestinal helminthes of dogs, foxes and jackals in the western part of Iran. *Veterinary Parasitology*, 2006; 142: 129-133.
- Dumanlı N, Karaer A.** Veteriner Protozooloji. Medisan Yayınları, 2010, Ankara.
- Gıcık Y, Kara M, Sarı B, Kilis K, Arslan MÖ.** Intestinal parasites of red foxes (*Vulpes vulpes*) and their zoonotic importance for humans in Kars Province. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2009; 15: 135-140.
- Gortazar C, Villafuerte R, Lucientes J, Fernandez de Luco D.** Habitat related differences in helminth parasites of red foxes in the Ebro valley. *Veterinary Parasitology*, 1998; 80: 75-81.
- Gönenç B, Öge H, Öge S, Emir H, Özbakış G, Aştı C.** First record of *Lyperosomum longicauda* Rudolphi, 1809 (Trematoda: Dicrocoeliidae) in Northern Bald Ibis (*Geronticus eremita*) in Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2012; 59: 227-230.
- Güralp N.** Helmintoloji. 2. Baskı. Ankara Univ Vet Fak Yayın No: 368/266, 1981, Ankara.
- Hackett F, Walters TMH.** Helminths of the red fox in Mid-Wales. *Veterinary Parasitology*, 1980; 7: 181-184.
- Gürler AT, Gori F, Bölükbaş CS, Açıcı M, Umur Ş, Deplazes P.** Investigation of *Echinococcus multilocularis* in environmental definitive host feces in the Asian and the European parts of Turkey. *Frontiers Veterinary Science*, 2018; 5: 48.
- Hegglin D, Deplazes P.** Control strategy for *Echinococcus multilocularis*. *Emergence of Infectious Disease*. 2008; 14: 1626-1628.
- Hildebrand J, Sitko J, Zalesny G, Jeżewski W, Laskowski Z.** Molecular characteristics of representatives of the genus *Brachylecithum* Shtrom, 1940 (Digenea, Dicrocoeliidae) with comments on life cycle and host specificity. *Parasitology Research*, 2016; 115: 1417-1425.
- Letkova V, Lazar P, Curlik J, Goldova M, Kocisova A, Kosuthova L, Mojzisojva J.** The red fox (*Vulpes vulpes* L.) as a source of zoonoses. *Veterinary Arhiv*, 2006; 76: 73-81.
- Magi M, Calderini P, Gabrielli S, Dell'Omodarme M, Macchioni F, Prati MC, Cancrini G.** *Vulpes vulpes*: A possible wild reservoir for zoonotic filariae. *Vector Borne and Zoonotic Disease*, 2008; 8: 249-252.
- Magnaval JF, Glickman LT.** Management and treatment options for human toxocarasis. In: *Toxocara*, the Enigmatic Parasite, Holland CV and Smith HV (Eds.), CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire UK, 2006, pp. 113-126.
- Martinez-Carrasco C, Ruiz de Ybanez MR, Sagarmínaga JL, Garijo MM, Moreno F, Acosta I Hernandez S, Alonso FD.** Parasites of the red fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in Murcia, southeast Spain. *Revue de Medicine Veterinaire*, 2007; 158: 331-335.
- Mimioğlu MM, Güralp N, Tolgay N, Sayın F.** Ankara civarında tilkilerde (*Vulpes vulpes*) bulunduğumuz helmintler. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1965; 12: 164-190.
- Moravec F.** Review of capillariid and trichosomoidid nematodes from mammals in the Czech Republic and the Slovak Republic. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 2000; 64: 271-304.
- Oksanen A, Siles-Lucas M, Karamın J, Possenti A, Conraths FJ, Romig T, Wysocki P, Mannocci A, Mipatrini D, Torre G, Boufana B, Casulli A.** The geographical distribution and prevalence of *Echinococcus multilocularis* in animals in the European Union and adjacent countries: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, 2016; 9: 519e.
- Olson PD, Cribbb TH, Tkach VV, Bray RA, Littlewood DTJ.** Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal for Parasitology*, 2003; 33: 733-755.
- Pojmańska T.** Family Dicrocoeliidae Looss, 1899. In: *Keys to the Trematoda*, vol 3, Bray RA, Gibson DI and Jones A (Eds.), CABI Publishing and The Natural History Museum, London, 2008, pp 233-260.
- Rataj AV, Posedi J, Zele D, Vengust G.** Intestinal parasites of the red fox (*Vulpes vulpes*) in Slovenia. *Acta Veterinaria Hungaria*, 2013; 61: 454-462.
- Reperant LA, Hegglin D, Fischer C, Kohler L, Weber JM, Deplazes P.** Influence of urbanization on the epidemiology of intestinal helminths of the red fox (*Vulpes vulpes*) in Geneva, Switzerland. *Parasitology Research*, 2007; 101: 605-611.
- Richards DT, Harris S, Lewis JW.** Epidemiological studies on intestinal helminth parasites of rural and urban red foxes (*Vulpes vulpes*) in the United Kingdom. *Veterinary Parasitology*, 1995; 59: 39-51.
- Saeed I, Maddox-Hyttel C, Monrad J, Kapel CMO.** Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Veterinary Parasitology*, 2006; 139: 168-179.
- Shimalov VV, Shimalov VT.** Helminth fauna of the red fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in southern Belarus. *Parasitology Research*, 2003; 89: 77-78.
- Smith GC, Gangadharan B, Taylor Z, Laurenson MK, Bradshaw H, Hide G, Hughes JM, Dinkel A, Romig T, Craig PS.** Prevalence of zoonotic important parasite in the red fox (*Vulpes vulpes*) in Great Britain. *Veterinary Parasitology*, 2003; 118: 133-142.
- Taşan E.** Elazığ ve Tunceli yörelerinde yabani tavşanlarda (*Lepus europaeus* Pallas) helmintleri ve bunların yayılışı üzerinde araştırma. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1989; 3: 75-81.
- Thienpont D, Rochette F, Vanparijs OFJ.** Diagnose von Helminthosen Durch Koproskopische Untersuchung. *Janssen Pharmaceutica*, Beerse, 1990.
- Tınar R.** Ankara köpeklerinde iki yeni trematod olgusu: *Phagicola italica* (Alessandrini, 1906) ve *Echinochasmus perfoliatus* (Von Ratz, 1908). *Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1976; 3: 53-61.
- Tınar R.** Veteriner Helmintoloji. Nobel Basımevi, Ankara, 2011.
- Umur Ş.** Türkiye kedilerinde ilk *Metagonimus yokogawai* Katsurada, 1912 (Trematoda, Heterophyidae) olgusu. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 1997; 21: 67-70.
- Umur Ş.** Bir köpekte *Alaria alata* olgusu. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 1998; 22: 89-92.
- Vervaeke M, Dorny P, Bruyn L, Vercammen F, Jordaens K, Berge K, Verhagen R.** A survey of intestinal helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in northern Belgium. *Acta Parasitologica*, 2005; 50: 221-227.



- Wolfe A, Hogan S, Maguire D, Fitzpatrick C, Vaughan L, Wall D, Hayden TJ, Mulcahy G.** Red foxes (*Vulpes vulpes*) in Ireland as hosts for parasites of potential zoonotic and veterinary significance. *Veterinary Record*, 2001; 149: 759-763.
- Zare-Bidaki M, Mobedi I, Ahari SS, Habibizadeh S, Naddaf SR, Siavashi MR.** Prevalence of zoonotic intestinal helminths of canids in Moghan Plain, Northwestern Iran. *Iran Journal for Parasitology*, 2010; 5: 42-51.
- Ziadinov I, Deplazes P, Mathis A, Mutunova B, Abdykerimov K, Nurgaziev R, Torgerson PR.** Frequency distribution of *Echinococcus multilocularis* and other helminths of foxes in Kyrgyzstan. *Veterinary Parasitology*, 2010; 171: 286-292.

## Investigation of Cytotoxic Effects of Curcuma Longa, Zingiberaceae and Dianthus Caryophyllus, Which are Commonly Used as Food Supplements in Daily Life

Özgür ALBUZ\*

*Keçiören Training and Research Hospital, Department of General Surgery, 06000, Ankara, Turkey*

### ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the cytotoxic effects, which have an important place in terms of public health as using herbal food supplement, of ginger, turmeric and clove seeds over healthy cells. In this study, designed as an in vitro cell culture study, fibroblast cells were used to investigate the effect of plant extracts on healthy cells. MTT cell viability test was used to determine cytotoxicity. The MTT test was performed according to ISO 10993-5 standards and when the cell viability was calculated to be below 70% in the MTT method, the sample was considered potential cytotoxic. When the viability values calculated according to the absorbance values obtained from MTT test are examined; It was calculated that ginger and turmeric extracts were not cytotoxic at any concentration, including the highest concentrations. On the other hand, it was calculated that 1: 2 concentration of clove extract was cytotoxic and the viability was 26.7%. As a result of this study, it has been found that clove use is remarkable in terms of plant nutritional supplements with its current use in terms of cytotoxic effect compared to turmeric and ginger.

**Keywords:** Curcuma Longa, Zingiberaceae, Dianthus Caryophyllus, Cytotoxicity

\*\*\*

### Günlük Yaşamda Gıda Takviyesi Olarak Kullanılan Zencefil, Zerdeçal ve Karanfilin Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması

#### ÖZ

Bu çalışmanın amacı, günlük yaşamda gıda takviyesi olarak kullanılan ve halk sağlığı açısından önemli bir yeri olan zencefil, zerdeçal ve karanfil tohumlarının sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksik etkilerini araştırmaktır. İn vitro hücre kültürü çalışması olarak tasarlanan bu çalışmada, bitki özlerinin sağlıklı hücreler üzerindeki etkisini araştırmak için fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Sitotoksikiteyi belirlemek için MTT hücre canlılığı testi kullanılmıştır. MTT testi ISO 10993-5 standartlarına göre yapıldı ve MTT yönteminde hücre canlılığı % 70'in altında olduğu hesaplandığında, numunenin sitotoksik potansiyelde olduğu kabul edilmiştir. MTT testinden elde edilen absorbans değerlerine göre hesaplanan canlılık değerleri incelendiğinde; Zencefil ve zerdeçal ekstraktlarının, en yüksek konsantrasyonlar dahil olmak üzere herhangi bir konsantrasyonda sitotoksik olmadığı hesaplanmıştır. Öte yandan, 1:2 oranında karanfil ekstresi konsantrasyonunun sitotoksik ve canlılığın % 26.7 olduğu hesaplanmıştır. Bu çalışma sonucunda, özellikle karanfil kullanımının zerdeçal ve zencefil ile karşılaştırıldığında sitotoksik etkiye sahip olması bakımından mevcut kullanımıyla, bitkisel gıda takviyeleri açısından dikkate değer olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Zerdeçal, zencefil, karanfil, sitotoksikite

To cite this article: Albuğ Ö. Investigation of Cytotoxic Effects of Curcuma Longa, Zingiberaceae and Dianthus Caryophyllus, Which are Commonly Used as Food Supplements in Daily Life. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):351-356

Submission: 18.07.2019

Accepted: 28.08.2019

Published Online: 29.08.2019

ORCID ID; ÖA: 0000-0002-8534-1781

\*Corresponding author e-mail: oalbuğ@gmail.com

## GİRİŞ

Halk sağlığı açısından dengeli beslenme son derece önemlidir. Besin tüketiminde besinlerin bileşimi hakkında güvenilir veri gerektirir. Bu veriler aynı zamanda, farklı besinler için gıda kaynakları hakkında gerekli bilgileri içeren sağlıklı beslenme için gıdaya dayalı beslenme kılavuzlarının da temelleridir (Elmadfa ve Meyer 2010). Zerdeçal (*Curcuma longa* Linn. Syn *C. domestica* Valetton), Hindistan'da yaygın olarak kullanılan gıda koruyucu, renklendirici ve baharat olarak kullanılan bir bitkidir (Aggarwal ve ark. 2007, Chattopadhyay ve ark. 2004). Bununla birlikte geleneksel tıp içerisinde de birçok tıbbi tedavi edici özellik bu baharata bağlanır (Balaji, 2010, Chattopadhyay ve ark. 2004). Curcumin'in genel tıbbi özelliği; antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral ve antifungal etkilere sahip olmasına bağlanmaktadır (Akram ve ark. 2010).

Zencefil'de geleneksel tıp içerisinde ve gıda takviyesi olarak kullanılan bir diğer bitki olup (*Zingiber officinale* Rosc.), *Zingiberaceae* ailesine aittir. Bu bitkinin Güney-Doğu Asya'da ilk olarak kullanıldığı, daha sonraları baharat olarak birçok ülkede yemeğe lezzet katmak için yaygın biçimde kullanıldığı ifade edilmektedir (Park ve Pizzuto 2002). 45'den fazla cins ve 800 alt türe sahip (Haniadka ve ark. 2013) ortalama 30 ila 90 cm yüksekliğinde yetişen dik, çok yıllık bir bitkidir; Sarımsı, mor dudaklı çiçeklerden oluşan nadiren çiçek açan yeşilimsi sarı saçaklara sahiptir (Tyler ve Foster 1993). Hindistan'da ve taze ve kurutulmuş köklerin farklı tıbbi ürünler olarak kullanıldığı gibi, Çin'de de kullanımı yaygındır. Bunun yanı sıra, zencefil rizomu da geleneksel bitkisel ilaçlarda kullanılmıştır. Zencefilin sağlığı teşvik eden bakış açısı, zengin fitokimyasına atfedilmektedir (Shukla ve Singh 2009). Jolad ve ark. (2004) taze zencefilini iki geniş kategori, yani uçucu ve uçucu olmayan kategoriler halinde gruplandırılmış. Uçucu maddeler, zencefilin farklı aromasını ve tadını sağlayan seskiterpen ve monoterpenoid hidrokarbonları içermektedir. Aksine, uçucu olmayan keskin bileşikler arasında gingeroller, shogaoller, paradoller ve zingerone bulunmaktadır. Laboratuvar hayvanlarında, zencefil gastrointestinal sistemin hareketliliğini arttırmakta ve analjezik, yatıştırıcı, antipiretik ve antibakteriyel özelliklere sahip olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca zencefil yağının farelerde cilt kanserini önlediği kanıtlanmıştır. Michigan Üniversitesi'nde yapılan bir araştırma, gingerollerin yumurtalık kanseri hücrelerini öldürebildiğini göstermiştir (Ahmed ve ark. 2011).

Diğer bitkisel gıda takviyesi olan karanfil (*Dianthus caryophyllus*)'de son derece yaygın kullanılmaktadır. Bu bitkinin temel özelliklerine bakıldığında; yavaş bir oranda 0,5 m ile 1 m'ye kadar büyüyen çok yıllık bir bitkidir. Temmuz-Ağustos ayları arasında çiçeklenmekte ve tohumlar Ağustos-Eylül aylarında olgunlaşmaktadır. Türleri hermafrodittir ve *Lepidoptera*

denilen güveler ve kelebekler tarafından tozlaştırılır. Bitki kendi kendine verim verme özelliğindedir. Bu sebeple yaban hayatına uyum sağlayabilen nadir bitkilerdendir. Uyumlu olduğu toprak yapısı hafif (kumlu), orta (loamy) ve ağır (kil) topraklar ve iyi drene topraklardır. Gölgede büyüyemezler ve kuru veya nemli toprağı tercih eder. Bitki atmosferik kirlenmeyi tolere edebilir (Fern 1997, Polunin ve ark. 1965, Zhu ve ark. 1998).

Karanfil bitkisi, geleneksel tıpta kullanılan bitkilerden biri olan *Caryophyllaceae* familyasına aittir. Karanfil ağacı Endonezya ve Pasifik adalarına özgüdür. Ayrıca güzelliği sebebiyle dünya çapında süs ağacı olarak yetiştirilmektedir (Mohammed ve Al-Bayati 2009). Yapılan çalışmalarda; antikanser, antiviral, antibakteriyel, antioksidan ve renoprotektif etkilerinden bahsedilmiştir (Al-Snafi 2017). Dünyada çok sayıda hasta sağlık amaçlı şifalı bitkiler kullanılmaktadır. Bu nedenle, terapötik potansiyelleri, biyolojik özellikleri ve güvenilirliklerinin bilimsel incelemesi, doğru kullanımları hakkında çalışmalar halen sürmektedir (Gopal ve ark. 2019). Bu sebeple, günlük yaşamda gıda takviyesi olarak kullanılan ve halk sağlığı açısından önemli bir yeri olan zencefil, zerdeçal ve karanfil tohumlarının sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOD

DMEM Medium (Biological Industries, ABD), Trypsin EDTA Solution c (Biological Industries, ABD), Foetal Bovine Serum (Biological Industries, ABD), Pen-Strep Solution (Biological Industries, ABD), fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS), sitotoksisite testleri için; MTT, hücre kültürü çalışmaları için biyolojik güvenlik kabini (Esco, Class II BSC), CO<sub>2</sub>'li inkübatör (Binder, ABD), santrifüj (Hettich, Rotina 380R, Almanya), tekrarlayıcı pipet (Gilson, Repetman, ABD), çok kanallı pipet (Gilson, PipetmanUltra, ABD), sitotoksisite çalışmaları için; mikropılaka okuyucu (Biotek, PowerWave XS2, ABD). Hücre kültürü çalışmalarının tamamı, kültür kapları ve çoklu kuyucuklu plakalarda (Corning, ABD) gerçekleştirilmiştir.

Aktardan temin edilen Zencefil, Zerdeçal ve Karanfil, TS EN ISO 10993- 12 standardında belirtildiği şekilde numunelerden 0,2 g/ml olacak şekilde tartılarak 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar in vitro testlerde kullanılmıştır.

MTT: Sitotoksisiteyi belirlemek için TS EN ISO 10993-5 standartlarına uygun şekilde MTT testi yapıldı. Bu test hücre proliferasyonunun ölçülmesi için 3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) tetrazolyum tuzu'nun kullanıldığı hassas bir metod olup eğer

canlılık %70'in altında hesaplanırsa numune sitotoksik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyouyumluluk Laboratuvarı hücre kütüphanesinde kriyotüpler kullanılarak -80°C de dondurularak saklanan L929 (Fare adipoz sağlıklı fibroblast hücre hatı) hücreleri, dondurucudan alınarak çözülmesi sağlanmış olup DMEM içerisinde %89 DMEM, %10 FBS ve % 1 penisilin streptomisin olacak şekilde besiyeri hazırlanmıştır. Çözülme işlemi gerçekleştirilirken hücreler falkon tüp içerisine alındıktan sonra 4 ml hazırlanmış olan besiyerinden eklenmiştir. Bu işlemden sonra hücrelerin bulunduğu falkon tüp 2000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından falkon içerisinde bulunan süpernatant atılmış ve pellet besiyeri ile süspanse edilerek flaska aktarılmıştır. 37°C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre alınan flaskalar 24 saatte bir kontaminasyon ve hücre çoğalmalarının incelenmesi için kontrol edilmiştir. Hücreler flask yüzeyini tamamen kapladığında kültürler tripsin enzimi yardımı ile kaldırılmış ve pasajlanarak yeni flaskalara aktarılmıştır. Flaskalara aktarılacak çoğaltılan L929 hücreleri yüzeyleri kaplama oranlarına bakılarak hücrelerin yüzeyden ayrılma işlemi gerçekleştirilmiştir. Takiben hücreleri flasktan kaldırmak için içindeki vasatı atıp 2 ml PBS (1X) ile yıkanarak ardından 2 ml Tripsin-EDTA eklenip 4 dakika boyunca etüvde bekletilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra

hücrelerin yüzeyden ayrılmaları mikroskop yardımı ile kontrol edildikten sonra taze besiyeri eklenerek hücreler falkon tüpe aktarılmıştır. Aktarma işleminden sonra falkon tüpler 2000 rpm ve 2 dakika santrifüj edilmiştir. Yapılan santrifüj işleminin ardından süpernatant kısmı atılarak falkon tüpün en alt 929 kısmında kalan pellet 1mL taze besiyeri ile süspanse edilmiştir. Bu işlemin ardından hücre sayımı hücrelerin tripan blue ile boyandıktan sonra kuyucuk başına 10x10<sup>4</sup> hücre düşecek şekilde 96 kuyucuklu plakalara (well plate) ekilmiştir. 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 24 saat inkübe edilen hücreler 24 saatlik inkübasyonun ardından ürünler 6 farklı konsantrasyon ve 4 tekrar olarak uygulandı. 24 saat inkübasyonun ardından plâtelardaki vasat atılmış ve her kuyucuğa aynı gün hazırlanan (1mg/ml MTT) 50 µl MTT solüsyonundan eklenerek ve 2 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda MTT solüsyonu atılıp kuyucuklara 100 µl izopropanol eklenmiş ve ELİSA okuyucuda 570 nm'de okutulmuştur.

## BULGULAR

MTT testi sonucunda çıkan absorbans değerlerine göre hesaplanan % canlılık değerleri incelendiğinde; zencefil ve zerdeçal ekstraktlarının en yüksek konsantrasyonları da dahil herhangi bir konsantrasyonda toksik olmadığı, karanfil ekstraktının 1:2 konsantrasyonun toksik etkiye ve %26,7 canlılığa sahip olduğu hesaplanmıştır (Tablo 1,2,3).

**Tablo 1.** Zencefil ekstraktının uygulandığı L929 fibroblast hücrelerindeki % canlılık değerleri

**Table 1.** % viability in L929 fibroblast cells treated with ginger extract

Konsantrasyon	% Canlılık Değerleri
1:2	71,8±3,72
1:4	89,6±4,6
1:8	94,9±5,7
1:16	96,8±2,9
1:32	102,5±2,5
1:64	105,6±5,4
Kontrol	100±0,04
Pozitif Kontrol-% 20 DMSO	18,9±2,4

**Tablo 2.** Zerdeçal ekstraktının uygulandığı L929 fibroblast hücrelerindeki %canlılık değerleri  
**Table 2.** % viability in L929 fibroblast cells treated with curcuma extract

Konsantrasyon	% Canlılık Değerleri
1:2	75,5±3,01
1:4	86,9±6,7
1:8	95,2±3,69
1:16	95,5±3,01
1:32	96,8±5,17
1:64	98,07±5,28
Kontrol	100±0,04
Pozitif Kontrol-% 20 DMSO	18,9±2,4

**Tablo 3.** Karanfil ekstraktının uygulandığı L929 fibroblast hücrelerindeki % canlılık değerleri  
**Table 3.** % viability in L929 fibroblast cells treated with Clove extract

Konsantrasyon	% Canlılık Değerleri
1:2	26,7±5,9
1:4	90,7±4,2
1:8	93,4±1,7
1:16	99,0±3,5
1:32	109,9±4,5
1:64	109,3±2,9
Kontrol	100±0,04
Pozitif Kontrol-%20 DMSO	18,9±2,4

## TARTIŞMA

Yapılan bu çalışma ile zerdeçal, zencefil ve karanfil'in her birinin insan fibroblast hücrelerine olan etkilerini belirleyerek toplum sağlığı üzerine etkilerinin neler olabileceğini değerlendirilmiştir. İn vitro çalışmalardaki temel prensip; organizma hücrelerinin, laboratuvar koşullarında spesifik biçimde tasarlanan kaplarda uygun nem, ısı ve besin kaynağı ortam koşullarının hazırlanarak kontaminasyondan korunmuş bir şekilde canlılığının sürdürülmesi olup insan hücrelerini de içerebilen herhangi bir canlı hücresinin suni ortamda yaşatılabilmesi, tercih edilen bir doku ya da organdan alınan hücrelerin kullanılabilmesi bir çok etik kaygı geride bıraktığı için hücre kültürü çalışmalarının tercih sebepleri arasında yer almasını sağlamıştır (Tokur ve Aksoy 2017, Zucco ve ark. 1998). Hücre kültürünün en sık kullanıldığı bilimsel sahalar aşı, kanser araştırmaları, ilaç çalışmaları ve ek olarak in vitro sitotoksitesite çalışmalarıdır (Gilbert ve Boutros 2016). Diğer yandan sitotoksitesite terimi, hücre ölümünü tanımlayan bir kelime olup, sitotoksitesite çalışmaları, araştırılan maddenin sitotoksik potansiyelini ortaya koyabilmek için yapılmaktadır. Hücre kaynaklı sitotoksitesite çalışmaları, hem uygulama kolaylığı, hem de in vivo

çalışmalardan elde edilen bilgi birikimiyle uyum göstermesi sebebiyle, hayvan deneylerine alternatif olarak da özellikle toksikoloji laboratuvarlarında sıkça kullanılır düzeye ulaşmıştır (Riss ve Moravec 2004).

Bu çalışmada sitotoksitesitesinin incelenmesi amaçlanan üç bitkiden ilki olan; *Caryophyllaceae* türleri üzerindeki önemli bir çalışmada dört farklı *Caryophyllaceae* türü ekstraktının sitotoksik etkilerini makrofaj hücre hatları üzerinde incelemiş ve bu çalışmada, ilk defa *S. officinalis*, *G. trichotoma* ve *D. sylvestris* gibi *Caryophyllaceae* türlerinden elde edilen ekstraktların memeli monositleri/makrofajları hücre çizgilerinin canlılığını etkilediğini ve kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptozisi indüklediğini göstermişlerdir (Gevrenova ve ark. 2014). Potansiyel bileşiklerin veya bitki kökenli ekstrakte preparasyonunun antikanser aktiviteleri için taranması için farklı uç noktalara sahip farklı in vitro sitotoksitesite analizleri kullanılmıştır. En yaygın kullanılan analizler, MTT, kalsein-AM ve Hoechst 33342 analizlerini içeren boya lekelerinin kullanımını içerir. Bu boyalar, mitokondri fonksiyonunun (MTT), esteraz aktivitesinin (calceinAM) ve DNA bağlanmasının (Hoechst 33342) dolaylı olarak ölçülmesini sağlayan, devam eden hücresel süreçleri

ortaya çıkarmalarını sağlayan bazı gösterge özelliklerine sahiptir (Plengsuriyakarn ve ark. 2012).

Yine farklı tıbbi araştırmalarda adından söz edilen zencefilinde sitotoksitesi son derece önemlidir. Plengsuriyakarn ve ark. (2012)'nin yaptıkları çalışmada zencefil ekstraktının normal hücelere olan sitotoksitesinin kolanjiosellüler kanser hücelerine göre 3.5 kat daha az olduğunu bildirmişlerdir.

Mahavorasirikul ve ark. (2010)'da zencefilin ham etanolik zerresi özünün, 34.26 ug / ml IC50 ile insan kolanjiosellüler kanser hücelerine (CCA), CL-6 hücre hattına göre 3.5 kat karşı sitotoksik aktivite sergilediği MTT tahlili ile göstermişlerdir (Mahavorasirikul ve ark. 2010). Bu çalışmada da zencefil ekstraktı aynı yöntemle ölçüldüğünde 1:2 olan en yüksek konsantrasyonda dahi L929 fibroblast hücelerinin % 71,8±3,72 ile hala canlılıklarını korudukları tespit edildi. Bu sonucun Mahavorasirikul ve ark. (2010)'nin yaptığı çalışmadaki normal hücre hattında sitotoksik etkisinin kanser hücelerine göre 3.5 kat daha az bulunması neticesiyle kıyaslandığında zencefilin normal metabolik hücelerde daha az toksik olabileceği öngörülmüştür.

Yapılan bir çalışmada kurkumin ve analoglarının birçok kanser türünde etkili olduğu ifade edilmiş olup kurkuminin birden fazla hücre sel sinyal yolağını uyarabildiği ve ayrıca birçok sayıda moleküler yapıyla etkileştiği konusunda görüş bildirilmiştir (Toptaş ve Alagöz 2016). Normal hücre üzerine toksik etki göstermemesi üzerine mevcut çalışmadan elde edilen veriler Toptaş ve Alagöz (2016)'ün sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Ayrıca Toptaş ve Alagöz (2016)'ün çalışmalarında anti-neoplastik aktivitesinin yüksek olması, düşük molekül ağırlığına sahip olması, bu molekülü; potansiyel kemoterapötik bileşiklerin geliştirilmesinde ideal öncü molekül haline getirdiği ifade edilmektedir. Fakat biyoyararlanımın düşük olmasından dolayı analoglarının oluşturulmasının gerektiği de vurgulanmıştır. Ancak düşük biyoyararlanıma sahip olmasından dolayı analoglarının sentezlenmesi de vurgulanmaktadır.

Gevrenova ve ark. (2014) ise, *Caryophyllaceae* (karanfil) türünün ekstraktlarının makrofaj hücre hatları üzerine sitotoksik etkileri üzerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada; tahlil edilen türlerden elde edilen ham ekstratlar, makrofaj hücre hatlarına doğru sitotoksik etkiler ortaya çıkarmıştır. *Gypsophila* türlerinde, gypsogenin 3-0-glukuronid türevleri, gözlemlenen sitotoksiteden sorumlu olabileceğini ve bu nedenle, *Caryophyllaceae*'nin ham özü, kanser hücelerine karşı ajanların potansiyel gelişimi için araştırmaya değer olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada da *Caryophyllaceae*'in de kanser araştırmalarında anlamlı sonuçlar verebileceğini düşündürmekle beraber zencefil ve zerdeçalın aksine Gevrenova ve ark.

(2014)'nin da belirttiği şekilde sitotoksik etkilerinin olabileceği de tespit edilmiştir.

## SONUÇ

Zencefil ve zerdeçal'ın sitotoksik etkisinin özellikle normal hüceler için önemsenmeyecek düzeyde olduğu tespit edilmiş olmakla beraber karanfil bitkisinin de bu ifadenin geçerli olmadığı görülmüştür. Bu nedenle günlük hayatımızda sıklıkla kullanılan bu baharatlara yönelik çalışmaların in vitro denemelerine ek olarak in vivo denemelerle desteklenmesi sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Ahmed K, Shaheen G, Asif HM. Zingiber officinale Roscoe (pharmacological activity). J. Med. Plants Res. 2011; 5(3):344-348.
- Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. In: The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease. Ed; Aggarwal BB, Surh YJ, Shishodia S, Springer, Boston, MA. 2007; pp. 1-75.
- Akram M, Shahab-Uddin AA, Usmanghani K, Hannan A, Mohiuddin E, Asif M. Curcuma longa and curcumin: a review article. Rom J Biol Plant Biol. 2010; 55(2):65-70.
- Al-Snafi AE. Chemical contents and medical importance of *Dianthus caryophyllus*-A review. IOSR Journal of Pharmacy. 2017; 7(3):61-71.
- Balaji S, Chempakam B. Toxicity prediction of compounds from turmeric (*Curcuma longa* L). Food Chem Toxicol. 2010; 48(10):2951-2959.
- Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. Curr Sci. 2004; 87:44-53.
- Elmadfa I, Meyer AL. Importance of food composition data to nutrition and public health. Eur J Clin Nutr. 2010; 64(S3):4-7.
- Fern K. Plants for a future: Edible & Useful plants for a healthier world. Permanent publications. Hampshire, UK. 1997.
- Gevrenova R, Joubert O, Mandova T, Zaiou M, Chapleur Y, Henry M. Cytotoxic effects of four *Caryophyllaceae* species extracts on macrophage cell lines. Pharm biology. 2014; 52(7):919-925.
- Gilbert DF, Boutros M. A protocol for a high-throughput multiplex cell viability assay. In: High-Throughput RNAi Screening. Ed; David O, Azorsa SA, Humana Press, New York, NY. 2016; pp. 75-84.
- Gopal J, Anthonydhasan V, Muthu M, Gansukh E, Jung S, Chul S, Iyyakkannu S. Authenticating apple cider vinegar's home remedy claims: antibacterial, antifungal, antiviral properties and cytotoxicity aspect. Nat Prod Res. 2019; 33(6):906-910.
- Haniadka R, Saldanha E, Sunita V, Palatty PL, Fayad R, Baliga MS. A review of the gastroprotective effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Food & Function. 2013; 4(6):845-855.
- Jolad SD, Lantz RC, Solyom AM, Chen GJ, Bates RB, Timmermann BN. Fresh organically grown ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-

induced PGE2 production. *Phytochemistry*. 2004; 65(13):1937-1954.

**Mahavorasirikul W, Viyanant V, Chaijaroenkul W, Itharat A, Na-Bangchang K.** Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells in vitro. *BMC Complement Altern Med*. 2010; 10(1):55-62.

**Mohammed MJ, Al-Bayati FA.** Isolation and identification of antibacterial compounds from *Thymus kotschyanus* aerial parts and *Dianthus caryophyllus* flower buds. *Phytomedicine*. 2009; 16(6-7):632-637.

**Park EJ, Pezzuto JM.** Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2002; 21(3-4):231-255.

**Plengsuriyakarn T, Viyanant V, Eursitthichai V, Tesana S, Chaijaroenkul W, Itharat A, Na-Bangchang K.** Cytotoxicity, toxicity, and anticancer activity of *Zingiber officinale* Roscoe against cholangiocarcinoma. *Asian Pac J Cancer*. 2012; 13(9):4597-4606.

**Polunin O, Huxley A, Everard B.** *Flowers of the Mediterranean*. Chatto and Windus, London.1965.

**Riss TL, Moravec RA.** Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Technol*. 2004; 2(1):51-62.

**Shukla Y, Singh M.** Cancer preventive properties of ginger: a brief review. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45(5):683-690.

**Tokur O, Aksoy A.** In vitro sitotoksisite testleri. *Harran Üniv Vet Fak Derg*. 2017; 6(1):112-118.

**Toptaş B, Alagöz ZA.** Anticarcinogenic Effects of Curcumin and It's Analogs. *Ankara Ecz Fak Derg*. 2016; 40(2):58-82.

**Tyler VE.** *The honest herbal: a sensible guide to the use of herbs and related remedies*. George F. Stickley Company, New York, USA.1993.

**Zhu JS, Halpern GM, Jones K.** The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis* Part I. *The Journal of alternative and complementary medicine*. 1998; 4(3):289-303.

**Zucco F, De Angelis I, Stamatii A.** Cellular models for in vitro toxicity testing. In: *Animal Cell Culture Techniques*. Ed; Clynes M, Springer, Berlin, Heidelberg. 1998; pp. 395-422.

## Cervical Insemination with Frozen Thawed Semen in Goats at Different Breeding Age

Koray TEKİN\*

Ankara University, Veterinary Medicine Faculty, Reproduction and Artificial Insemination Department, 06110, Ankara, Turkey

### ABSTRACT

Artificial insemination (AI) in goat is currently limited by the poor fertility obtained following the cervical insemination with frozen-thawed semen. The objective of the present study was to determine the efficiency of frozen semen use in two different breeding ages at Saanen goats. The effects of synchronization and fertility rates were also examined. Ninety-eight (98) Saanen goats were divided into two groups: Group-1 = 49 (7-months-old) and Group-2 = 49 (19-month-old) does. Estrus was synchronized by impregnated intravaginal sponges (30 mg; fluogestone acetate, FGA), and i.m. administration of 50 µg of cloprostenol (PGF2α) and pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, 500 IU), at 48 h before sponge removal. Cervical fixed time AI was carried out with frozen semen 43 h after removal of the sponges during the breeding season. Estrus was detected by teaser buck. The occurrence of estrus in Group-1 and Group-2 were 71.4%, 63.3%, respectively ( $p>0.05$ ). Sixty-six (66) goats were inseminated with frozen-thawed semen. The pregnancy rate was determined by abdominal scanning. Pregnancy rates were (Group-1: 31.4%, Group-2: 32.3%) not differed significantly between age groups ( $p>0.05$ ). Besides, higher lambing rates were obtained in Group-1 (145.5%) than in Group-2 (90.0%) due to increased prolificacy and reduced embryonic failure. In conclusion, Saanen goats in younger ages, starting from the 7 months old age could be included in the breeding programs and could provide several benefits such as higher percentages of synchronization success and prolificacy.

**Keywords:** Artificial Insemination, breeding age, fertility, frozen semen, pregnancy

\*\*\*

### Farklı Üreme Yaşındaki Keçilerde Dondurulmuş Sperma ile Servikal Tohumlama

#### ÖZ

Keçide dondurulmuş sperma ile servikal suni tohumlama (ST) uygulaması düşük gebelik oranları nedeniyle halen sınırlıdır. Bu çalışmanın amacı iki farklı üreme yaşındaki Saanen keçilerinde donmuş sperma kullanımının etkinliğini belirlemektir. Senkronizasyon ve gebelik oranlarının etkileri de incelenmiştir. Doksan sekiz (98) dişi Saanen keçi iki gruba ayrıldı: Grup-1 = 49 (7 aylık) ve Grup-2 = 49 (19 aylık) keçi. Östrus 11 gün süresince intravajinal sünger (30 mg; fluogestone acetate, FGA) ve süngerin çıkarılmasından 48 saat önce 50 µg kloprostenol (PGF2α) ve gebe kısrak serum gonadotropini (PMSG, 500 IU) ile senkronize edildi. Sabit zamanlı servikal tohumlama dondurulmuş sperma ile üreme mevsiminde süngerlerinin çıkarılmasından 43-45 saat sonra gerçekleştirildi. Östrus arama tekesi ile tespit edildi. Grup 1 ve Grup 2'de östrus görülme oranları sırasıyla %71.4, %63.3 olarak tespit edildi ( $p>0.05$ ). Altmışaltı (66) keçi dondurulmuş-çözdürülmüş spermayla tohumlandı. Gebelik abdominal ultrasonografi ile belirlendi. Gebelik oranları (Grup-1: %31.4, Grup-2: %32.3) yaş grupları arasında anlamlı bir farklılık göstermedi ( $p>0.05$ ). Ayrıca, artan çoklu doğum ve azalan embriyonik kayıplar sayesinde Grup-1'de (%145.5), Grup-2'ye (%90.0) göre daha yüksek oranda yavru elde edilmiştir. Sonuç olarak, Saanen keçileri, 7 aylık yaştan itibaren suni tohumlama programlarına alınabilir ve yüksek senkronizasyon başarısı ve yavru verimine gibi birçok fayda sağlayabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Dondurulmuş sperma, fertilité, gebelik, üreme yaşı, suni tohumlama

To cite this article: Tekin K. Cervical Insemination with Frozen Thawed Semen in Goats at Different Breeding Age. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):357-362

Submission: 10.08.2019

Accepted: 28.08.2019

Published Online: 29.08.2019

ORCID ID; KT: 0000-0002-3862-2337

\*Corresponding author e-mail: tekin.koray@hotmail.com



Goats play a crucial role due to their high tolerance to heat stress and harsh conditions for many rural communities. In contrast to other ruminants, they are able to convert limited forages and crops into meat, skins and milk easily. The growing demand for goat milk, cheese, yogurt and ice cream triggers the foundation of a new industry, pioneering of novel marketing methods and improving research. However, recent developments in assisted reproductive technology such as artificial insemination (AI) in the small ruminant industry cannot provide adequate success for breeders. Despite the various methods including surgical or non-surgical inseminations that are being used in both primiparous and multiparous goats, success rates are limited by the poor fertility (Leboeuf et al. 1998, Cognie et al. 2003, Purdy et al. 2009, Kulaksiz et al. 2012).

The success of AI contains various stages such as age, health, semen collection and storage, estrus detection and mainly the insemination technique (Leboeuf et al. 2000, Arrebola et al. 2012, Yeni and Gundogan 2018). Associated with our study, insemination techniques are classified into two types, surgical and non-surgical (Althouse 2007). Cervical insemination is non-invasive and a low-cost technique that can be counted in non-surgical part. However, the complexity of the cervical anatomy of small ruminants is the primer limit of success rates in this method. It is performed by transferring the semen into the cervix with the aid of an adequate catheter and speculum. An adequate catheter and selection of does affect the advance of the catheter in the cervical rings and thereby the depth of semen deposition into the cervix, which leads to higher pregnancy rates (Leethongdee and Ponglowhapan 2014). For this purpose, the breeding age of does can be related to the success rate of this AI technique. In line with this hypothesis, in anatomical research, the length of the cervix showed a variance regarding the age and previous pregnancy status in ewes and does (Hyacinth et al. 2016). In another study in goat, it has been stated that multiparous does have longer cervix length than primiparous ones, that favors deeper penetration and it could be associated with elevated pregnancy rates due to the depth of semen deposition in the genital tract (Intrakamhaeng et al. 2011). Salomon and Maxwell (1995) has reviewed various studies in ewes and concluded that lambing rates increased with the depth of insemination. However, to the best of our knowledge, the relationship between cervical AI success and age has not been investigated in Saanen goats. Therefore, we aimed to determine this relationship by performing a cervical AI by using frozen-thawed buck semen in Saanen goats at different breeding ages.

### **Animal Maintenance and Selection**

This study was conducted at the private farm in Seferihisar, (38°: N, 26°: E) İzmir/Turkey. Ninety-nine Saanen goats, at 7 or 19 months of age, were selected by their final evaluation score. The animals were maintained under the constant nutritional regime, dehydrated alfalfa; mineral salts and water were provided ad libitum.

All animals were selected where the following criteria meet: The one with at least 2.75 body condition score, average body weight between 50-55 kg, showed at least 3 visible regular (21 days) estrus cycle and confirmed by ultrasound examination of the reproductive tract before the hormonal treatment. This study was conducted according to ethical laws and regulation of Ankara University Animal Experiments Local Ethics Committee.

### **Estrus Synchronization**

Forty-nine primiparous and forty-nine nulliparous Saanen goats were synchronized according to Leboeuf et al. (2007), during the breeding season. All animals were treated with an intra-vaginal sponge (30 mg flugestone acetate, FGA) for 11 days, intramuscular injection of 500 IU pregnant mare serum gonadotropin (PMSG), and 50 µg prostaglandin F2alpha (d-cloprostenol, Juramate) were administered 48 hours before the sponge removal.

### **Estrus Detection**

Estrus was detected with a teaser buck 24h after the sponge removal. Behavioral and physiological changes were examined according to following criteria; the females that does not have standing heat and one more estrus sign (tail wagging, cervical mucus, urination) have been discarded from the insemination program.

### **Semen assessment and AI**

Semen samples were imported commercially from Capgenes, France. A total of 66 frozen semen straws from three different bucks were used. Frozen semen samples were thawed at 37°C for 30 sec., gently dried, placed into insemination gun and kept not more than 5 min before use. All the does were restrained by two technicians gently and perianal disinfection is done before the insemination. The hindquarters of does were raised over a rail, and semen was deposited as deeply as possible into the cervix through a speculum fixed with a light source. Timed artificial inseminations were performed at 43-45 hours from sponge removal.

### **Pregnancy detection**

Does were positioned in dorsal recumbence and monitored abdominal ultrasound with using a 7.5

MHz linear probe (Esaote, Lab-One, Italy) 30 days after insemination and kidding rates were recorded.

### Statistical analysis

Chi-square analysis was performed to test the significance of the difference between pregnancy status and date of birth. In all analysis  $p < 0.05$  was considered as statistically significant. All statistical analysis was performed using SPSS for Windows 14.1.

## RESULTS

The success rate of synchronization was recorded as 71.4% in Group 1, 63.3% in Group 2 and there was no significant difference between the age groups

( $p > 0.05$ ). Likewise, the overall pregnancy rate was found 31.8% and similar pregnancy rates were obtained in Group 1 and Group 2 as 31.4%, and 32.3% respectively ( $p > 0.05$ ) (Table 1).

A total of 25 offspring were obtained from 21 pregnant does, six twin pregnancies in Group 1, one triple pregnancy in Group 2, four early embryonic losses (one in Group 1 and three in Group 2) and one false pregnancy in Group 2 were detected owing to the use of ultrasonography. Overall lambing rate was 119.0%. Although there was no statistically significant difference between the groups lambing rate was higher in Group 1 (145.5%) than Group 2 (90.0%) (Table 2).

**Table 1.** Synchronization success and pregnancy rates of age groups

	Synchronization		Pregnancy			
	n	Does in Estrus (%)	n	Pregnant does (%)	n	Non-Pregnant does (%)
Age						
Group 1	35	71.4	11	31.4	24	68.6
Group 2	31	63.3	10	32.3	21	67.7

**Table 2.** Various reproductive parameters of age groups

Reproductive parameters	n	Group 1 (%)	n	Group 2 (%)
Twin rate	6	54.6	0	-
Triplet rate	0	-	1	10.0
Kids/Inseminated does	16/35	45.7	9-31	29.0
Kids/Pregnant does	16/11	145.5	9-10	90.0
Early embryonic loss	1	2.9	3	9.7
False pregnancy	0	-	1	10.0

## DISCUSSION

In order to obtain the maximum reproductive efficiency, does should be bred as soon as they reach their sexual maturity. Thus, it is essential to establish a breeding program considering the specific time of the birth that the offspring could reach the puberty at the beginning of the breeding season. The success of the synchronization followed by the pregnancy outcome depends on many factors including the reproductive history of the females. Nulliparity, primiparity and multiparity, hence, the age of the animal could affect the reproductive outcome.

In the present study, the effect of age on fertility was investigated. Although the pregnancy rates were similar between the nulliparous and primiparous goats, the efficiency of synchronization was numerically higher in younger animals ( $p > 0.05$ ). Variation of the response to the synchronization due to the difference in the ages of does has been documented by several researchers (Sanwal et al. 1983, Mellado et al. 2000, Romano et al. 2000, Whitley and Jackson 2004). Although some protocols have led to higher superovulation rates in younger females (Sanwal et al., 1983), other methods such as teasing have not been effective in young, post-pubertal animals (Mellado et al. 2000). In a study

conducted by Romano et al. (2000), the fertility of the multiparous does were found highest followed by the nulliparous females, while the lowest was observed in primiparous does, on the contrary to prolificacy rates.

Another factor that plays a role in the success of synchronization is the type of hormonal product used. Motlomelo et al. (2002) compared the fertility of the ninety does synchronized with controlled internal drug (progesterone)-releasing device (CIDR), Methyl acetoxy progesterone (MPA) or FGA for 16 days and found that the estrus rates were highest in CIDR group (100%) and lowest in MAP group (93%), however, the lowest conception rates were obtained in CIDR group (46.7%) while it was highest in FGA group (60%). Despite the variables such as the duration of progesterone treatment, breed, age and the semen processing, in the present study, 67.3% of the does FGA treated does have shown visible estrus signs, ranging from 71.4% to 63.3% regarding the age groups of the animals. Thus, it can be concluded that FGA is a more reliable choice of progesterone derivate in younger does.

As studied by many researchers, the fertility of the females is depended on several factors. The breed, the age of the animals (Anel et al. 2005), the specific time of insemination (Karagiannidis et al. 2001, Donovan et al. 2001, 2004, Fernandez Abella et al. 2003,) the performing professional (Anel et al. 2005), the doses of hormonal treatments (Tirpan et al. 2019, Hill et al. 1998), the processing of semen that is being used (Donovan et al. 2001, 2004, Hill et al. 1998, Ehling et al. 2003, Fernandez-Abella et al. 2003) and the method of insemination (Salamon and Maxwell 1995, Moses et al. 1997, Anel et al. 2005, Donovan et al. 2001, 2004, King et al. 2004, Szabados 2006, Perkins et al. 1996, Yamaki et al. 2003). In the present study, cervical inseminations were performed by using frozen-thawed semen and similar pregnancy rates were obtained in Group 1 and Group 2 as 31.4% and 32.3% respectively. In comparison with other researches, this rate was acceptable (Karatzas et al. 1997, Donovan et al. 2001, 2004, Stanimir et al. 2016). Donovan et al. (2001) have compared the pregnancy rates of six different breeds of ewes after the cervical insemination with frozen-thawed semen. Surprisingly, the pregnancy rates were varied from 18% to 77%, and from these results, it was obvious that the breed has a major effect on the pregnancy outcome of the inseminations. In another study, the pregnancy rate was found 44% when the choice of the method was cervical inseminations (Donovan et al. 2004), although laparoscopic insemination method has yielded 71.6% (Hill et al. 1998). Despite the higher pregnancy rates obtained with laparoscopic insemination method, it is an invasive and highly expensive method in which many equipment and expert labor need. Furthermore, concerns about animal welfare limit the application of this method.

When the effect of age was focused regarding the success of AI practices, according to the study conducted on 44,448 Churra sheep, the fertility outcome of the intravaginal insemination was decreasing in 1.7% per year with the ewes being aged and the difference was more visible when the laparoscopic insemination method was performed (2.0%) (Anel et al. 2005). Furthermore, they discovered that the fertility rates of vaginal insemination increases until 3.5 years of age, peaks up to 4.5 and begins to decrease after that. In the present study, there was no significant difference between the 7 months old and 19 months old does regarding the pregnancy rates although the lambing rate was found higher in the younger age group.

In the present study, overall lambing rate was 1.19, which was varied from 1.45 to 0.9 regarding the age groups and was higher in younger animals; however, it was lower than the data collection of Andries (2017), in which the rate was found 1.84. Animal-related factors such as breed, age, body condition score, genetics, and environmental factors including season, weather, stress, nutrition, pasture composition have a great impact on the lambing rate. The change in the litter size with the aging was investigated by using the data from 29,567 Polypay and Suffolk breed ewes and resulted in the information that starting from the 1 year of age, the litter size increases, up to 4-7 years of age followed by a decrease after 7 years of age. Similarly, 15-month-old ewes had +0.21 litter size as compared to 12-month-old ewes (Notter 2000).

Apart from these factors, the difference in the lambing rate might have mainly been caused by two reasons. The enhanced prolificacy rate of younger animals can be linked with the increased hormonal response, considering the same PMSG doses were used for both groups. Besides, in our previous study (Tirpan et al. 2019), higher PMSG doses (400 to 500 IU) have led to the alterations in the timing of ovulation and 500 IU dose shortened the duration of estrus behaviors in Angora goats. In addition, it has been reported that the PMSG doses significantly affects the conception rates (Hill et al. 1998). The survey study of 28,444 Merino ewes, which were inseminated laparoscopically revealed that starting from the dose of 200 IU (62.4%) the conception rate increases with peaking at 300 IU (79.1%) and decreasing above 375 IU (69.4%).

Besides from that phenomenon, the embryonic mortality rate was higher in older does (25.0%) than in younger ones (5.8%). Embryonic failures may lead to critical economic loss to the breeders of seasonally bred reproducing animals such as sheep and goats since when it is detected, it is often far beyond the point to rebreed the females (Diskin and Morris 2008). Various factors such as breed, genetics,

nutrition, ovulation rate and previous pregnancy history could affect the survival rate of the embryos (Bolet 1986). Although similar embryonic mortality rates were observed among different species like pigs, sheep and goats, different mechanisms are accounted for these losses. On contrary to sheep, in pigs, the effect of the breed has more importance than the ovulation rate and the main reason behind the embryonic loss in goats is the failure of corpus luteum (Wentzel 1982) since as distinctive from the sheep; gestation is dependent on corpus luteum in goats. Samir et al. (2016), investigated the effect of parous and breed on the embryonic and fetal failure in Zaraibi, Damascus and crossed breeds and obtained that the overall incidence was 41.3%. According to the results, significant differences were obtained regarding the age and the breed. Similar to the present results, the incidences of embryonal and fetal failures were encountered more frequent in does older than 3 years of age (44%) compared to the younger ones (38%) ( $p < 0.05$ ). Although when the effect of the breed was also taken into account, this outcome was reversed in Zaraiebi breed as the higher embryonic mortality rate was obtained in younger animals. Furthermore, contrarily with the present study, the incidence has found higher in nulliparous does (42%) than parous ones (40%)  $p < 0.05$ . However, in Damascus and Crossed breeds, nulliparous does have shown the reversed results, with lower incidences ( $p < 0.05$ ). In sheep, a substantial-high 292 percentage of incidence in parous merino and Plevan blackhead sheep were observed without any significant difference in the Ile de France breed ( $p < 0.05$ ) (Yotov 2012). It was concluded that previous pregnancy status of the animals had a different effect on the embryo loss within each breed indicating the importance to build up strategies to optimize the fertility of small ruminants in each breed. The increase of the incidence of embryonic failure in parous females could be due to the possible microbial contamination of the uterus during the previous pregnancies that could lead to alterations in the environment of the uterus and/or could cause cytolytic effect on the embryo as well as the epithelial changes of the uterus (Yotov 2012, Vanroose et al. 2000).

In conclusion, Saanen does in younger ages, starting from the 7 months old age could be included in the breeding programs and could provide several benefits such as higher percentages of synchronization success and prolificacy in addition to the decreased frequency of embryonic failures; however, it is necessary to consider the variations of the reproductive parameters among different breeds. Besides, cervical insemination technique could easily be applied on a larger scale farm, and it could be considered as a method that simplifies the use of frozen buck semen in Turkey.

## REFERENCES

- Althouse G.** Artificial Insemination In: Comparative reproductive biology, Ed; Schatten H, Constantinescu GM, Ames IO, Blackwell. 2007; pp. 159-170.
- Andries KM.** Using Performance Ratios and EBVs for Selection in Meat Goats. In: Agricultural Research and Extension Program Langston University, Proceedings of the 32<sup>nd</sup> Annual Goat Field Day, April 29, Oklahoma, USA. 2017.
- Anel LM, Kaabi B, Abroug M, Alvarez E, Anel JC, Boixo LF.** Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in Churra ewes: a field assay. *Theriogenology*. 2005; 63: 1235-1247.
- Arrebola FA, Pardo B, Sánchez M, López MD, Pérez-Marín CC.** Factors influencing the success of an artificial insemination program in Florida goats. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2012; 10(2): 338-344.
- Bolet G.** Timing and extent of embryonic mortality in pigs, sheep and goats: Genetic Variability. In: Embryonic mortality in farm animals, Ed; Sreenan JM, Diskin M, Springer Dordrecht. 1986; pp. 12-43.
- Cognie Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P.** Current status of embryo technologies in sheep and goats. *Theriogenology*. 2003; 59: 171-188.
- Diskin MG, Morris DG.** Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim*. 2008; 43(2): 260-267.
- Donovan A, Hanrahan JP, Kummen E, Duffy P, Boland MP.** Fertility of the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at natural or synchronised oestrus. *Animal Reproduction Science*. 2004; 84: 359-368.
- Donovan A, Hanrahan JP, Lally T, Boland MP, Byrne GP, Duffy P, O'Neill DJ.** AI for sheep using frozen-thawed semen. ARMIS 4047 Project report under the Research Stimulus Fund; OPARDF measure 5b. 2001.
- Ehling C, Wirth P, Schindler L, Haderer KG, Döpke HH, Lemme E, Niemann H.** Laparoscopic intrauterine insemination with different doses of fresh conserved and frozen-thawed semen for the production of ovine zygotes. *Theriogenology*. 2003; 60: 777-787.
- Fernandez Abella D, Preve MO, Villegas N.** Insemination time and diluting rate of cooled and chilled ram semen affects fertility. *Theriogenology*. 2003; 60: 21-26.
- Hill JR, Thompson JA, Perkins NR.** Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28447 Merino ewes under commercial conditions: a survey. *Theriogenology*. 1998; 49: 697-709.
- Hyacinth AA, Terzungwe A, Daniel OL, Oluwabamise NJ.** *Biometrical Study of the Genitalia of Kano Brown Goats and Yankasa Sheep*. *IJAVMS*. 2016; 10(1): 3-8.
- Intrakamhaeng M, Kongbuntad W, Wangkahart E, Khalid M, Leethongdee S.** The anatomy of cervix and the cervical penetrability during oestrus in the Thai goat. *Reproduction in Domestic Animals*. 2011; 46: 113.
- Karagiannidis A, Varsakeli S, Karatzas G, Brozos C.** Effect of time of artificial insemination on fertility of progesterone and PMSG treated indigenous Greek ewes during non-breeding season. *Small Ruminant Research*. 2001; 39(1): 67-71.
- Karatzas G, Karagiannidis A, Varsakeli S, Brikas P.** Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology*. 1997; 48(6): 1049-1059.

- King ME, McKelvey WAC, Dingwall WS, Matthews KP, Gebbie FE, Mylne MJA, Robinson JJ.** Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen-thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology*. 2004; 62: 1236-1244.
- Kukovics S, Gyökér E, Németh T, Gergátz E.** Artificial insemination of sheep—possibilities realities and techniques at the farm level. In: *Artificial insemination in farm animals*. Ed; Manafi M, InTech Croatia. 2011.
- Kulaksiz R, Daskin A.** Reproductive performance of primiparous and multiparous Saanen goats after laparoscopic intrauterine insemination: a field study. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2012; 36(2): 201-204.
- Leboeuf B, Delgadillo JA, Manfredi E, Piacère A, Clément V, Martin P, De Cremoux R.** Management of goat reproduction and insemination for genetic improvement in France. *Reproduction in Domestic Animals*. 2008; 43: 379-385.
- Leboeuf B, Manfredi E, Boue P, Piacère A, Brice G, Baril G, Terqui M.** Artificial insemination of dairy goats in France. *Livestock Production Science*. 1998; 55(3): 193-203.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S.** Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 2000; 62(1-3): 113-141.
- Leethongdee S, Ponglowhapan S.** Artificial insemination in goats: an update. *Thaj J Vet Med*. 2014; 44(1): 73-77.
- Mellado M, Olivas R, Ruiz F.** Effect of buck stimulus on mature and pre-pubertal norgestomet-treated goats. *Small Ruminant Research*. 2000; 36(3): 269-274.
- Moses D, Martinez AG, Iorio G, Valcarcel A, Ham A, Pessi H, De Las Heras MAA.** Large-scale program in laparoscopic intrauterine insemination with frozen-thawed semen in Australian Merino sheep in Argentine Patagonia. *Theriogenology*. 1997; 48: 651-657.
- Motlomelo KC, Greyling JPC, Schwalbach LMJ.** Synchronisation of oestrus in goats: the use of different progestagen treatments. *Small Ruminant Research*. 2002; 45(1): 45-49.
- Notter DR.** Effects of ewe age and season of lambing on prolificacy in US Targhee Suffolk and Polypay sheep. *Small Ruminant Research*. 2000; 38(1): 1-7.
- Perkins NR, Hill JR, Pedrana RG.** Laparoscopic insemination of frozen-thawed semen into one or both uterine horns without regard to ovulation site in synchronised Merino ewes. *Theriogenology*. 1996; 46: 541-545.
- Purdy PH, Blackburn HD, Larson B, Stobart R.** Investigation of a Novel Non-Surgical Method of Artificial Insemination for Sheep. Publications from USDA-ARS / UNL Faculty. 1395. 2009: <http://digitalcommons.unl.edu/usdaarsfacpub/1395>
- Romano JE, Crabo BG, Christians CJ.** Effect of sterile service on estrus duration fertility and prolificacy in artificially inseminated dairy goats. *Theriogenology*. 2000; 53(6): 1345-1353.
- Salamon S, Maxwell WM.** Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*. 1995; 38(1-2): 1-36.
- Samir H, Karen A, Ashmawy T, Abo-Ahmed M, El-Sayed M, Watanabe G.** Monitoring of Embryonic/Fetal Losses in Different Breeds of Goats using Real Time B- Mode Ultrasonography. *Theriogenology*. 2016; 85(2): 207-215.
- Sanwal PC, Pande JK, Varshney VP, Mogha IV.** Gonadotrophin-induced ovulation in melengestrol acetate treated female goat. *Indian Journal of Physiology And Pharmacology*. 1983; 27(1): 57-60.
- Szabados T.** A cervikouterinális inszeminálás eredményességének vizsgálata juhászatokban /Study of effectiveness in cervico-uterinal insemination of ewes. PhD thesis, University of Western Hungary Faculty of Agriculture and Food Sciences, Mosonmagyaróvár Hungary, 2006.
- Tirpan MB, Tekin K, Cil B, Alemdar H, Inanc ME, Olgac KT, Stelletta C, Daskin A.** The effects of different PMSG doses on estrus behavior and pregnancy rate in Angora goats. *Animal*. 2019; 13(3): 564-569.
- Vanroose G, de Kruif A, Van Soom A.** Embryonic mortality and embryo–pathogen interactions. *Animal Reproduction Science*. 2000; 60: 131-143.
- Wentzel D.** Non-infectious abortion in Angora goats. 3<sup>rd</sup> Intern conference on goat production and disease. Tuscon, 10–15 Jan. 1982; pp: 155–161. Dairy goat Journal publishing Co. Scottsdale USA. 1982; pp: 155–161.
- Whitley NC, Jackson DJ.** An update on estrus synchronization in goats: A minor species *Journal of Animal Science*. 2004; 82(13): E270–276.
- Yamaki K, Morisawa M, Ribadulla A, Kojima J.** Sheep semen characteristics and artificial insemination by laparoscopy. *Tohoku Journal of Agricultural Research*. 2003; 54(1-2): 17-26.
- Yeni D, Gündoğan M.** Some andrological parameters and biochemical properties in relation to season in rams. *Kocatepe Veterinary Journal*. 2018; 11(1): 70-85.
- Yotov SA.** Ultrasound diagnostics of late embryonic and foetal death in three sheep breeds. *Journal of Veterinary Advances*. 2012; 2(3): 120-125.
- Yotov SA, Velislavova DV, Dimova LR.** Pregnancy rate in Bulgarian White milk goats with natural and synchronized estrus after artificial insemination by frozen semen during breeding season. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 2016; 5(2): 144-147.

## Influence of Trolox and Alpha-Lipoic Acid on Post-Thawed Pırlak Ram Sperm Parameters, Oxidative Stress and DNA Damage in Non-Breeding Season

Fatih AVDATEK<sup>1\*</sup>, Deniz YENİ<sup>1</sup>, Muhammed Kürşad BİRDANE<sup>2</sup>, Mustafa GÜNDOĞAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Reproduction and Artificial Insemination Department, 03200, Afyonkarahisar, Turkey

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Obstetrics and Gynecology Department, 03200, Afyonkarahisar, Turkey

### ABSTRACT

The present study was conducted to examine the protective roles of trolox and alpha-lipoic on post-thawed Pırlak ram sperm parameters, oxidative stress and DNA damage in non-breeding season. Semen samples from 5 healthy Pırlak rams (2-3 years of age) were used in the study. Six ejaculates for each ram were collected and pooled. Ejaculates were split into three aliquots and diluted to a final concentration of  $150 \times 10^6$  spermatozoa/ml with the base extender containing 1 mM alpha lipoic acid, 1 mM trolox and no additive (control) were cooled to 5 °C and equilibrated for 3 h then frozen in 0.25 ml French straws. Samples were thawed in 37 °C and evaluated in terms of spermatological parameters, DNA damage, oxidative stress. Sperm motility was increased, acrosome rate and DNA damage were decreased significantly ( $p < 0.05$ ) in ALA, head abnormal sperm rate and membrane integrity were increased, acrosome rate and DNA damage were decreased significantly ( $P < 0.05$ ) in trolox when compared to the control group. Compared with the control group, reductions in spermatozoon MDA and GSH levels were statistically significant ( $P < 0.05$ ) in lipoic acid and trolox groups. Results of this study suggest that alpha-lipoic acid and trolox improve sperm parameters, oxidative stress and DNA damage in non-breeding season.

**Keywords:** Alpha-lipoic acid, Non-breeding season, Ram sperm, Trolox.

\*\*\*

### Sezon Dışı Pırlak Koç Sperma Sulandırıcısına İlave Edilen Lipoik Asit ve Trolox'un Dondurma ve Çözdürme Sonrası Spermatolojik Parametreler, Oksidatif Stres ve DNA Hasarı Üzerine Etkileri

#### ÖZ

Bu çalışmanın amacı sezon dışı dönemde Pırlak koç sperma sulandırıcısına ilave edilen trolox ve alfa lipoik asitin (ALA) çözüm sonu spermatolojik parametreler, oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine etkileri araştırıldı. Çalışmada sperma örnekleri 5 sağlıklı Pırlak koçtan (2-3 yaş) elde edildi ve her koçtan 6 ejakulat toplanarak karıştırıldı. Ejakulatlar ml'de  $150 \times 10^6$  spermatozoon olacak şekilde antioksidan içermeyen (kontrol) ve antioksidan içeren 1 mM ALA ve 1 mM trolox sulandırıcılar ile sulandırıldı. Sulandırılan örnekler 0,25 ml'lik payetlerde 5 °C'de 3 saat ekilibrasyona tabi tutularak sıvı azot buharında donduruldu, 37 °C'de çözdürülerek spermatolojik parametreler, DNA hasarı, oksidatif stres açısından değerlendirildi. ALA grubunda kontrol grubuna göre spermatozoa motilitesi, akrozom ve DNA bütünlüğü istatistikî ( $p < 0.05$ ) olarak daha yüksek bulundu. Trolox grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek akrozom ve membran bütünlüğü ile daha az DNA hasarı tespit edildi. ( $p < 0.05$ ). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ALA ve trolox gruplarındaki oksidatif stres parametrelerindeki azalmalar istatistikî olarak önemli ( $P < 0.05$ ) bulundu. Bu çalışmanın sonuçlarına göre üreme mevsimi dışında Pırlak koç sperma sulandırıcısına ilave edilen ALA ve troloxun çözüm sonu spermatolojik parametreleri, oksidatif stresi ve DNA hasarına karşı koruyucu bir etki gösterdiği kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Alfa lipoik asit, sezon dışı üreme, koç spermatozoon, trolox.

To cite this article: Avdatek F, Yeni D, Birdane M.K, Gündoğan M. Influence of Trolox and Alpha-Lipoic Acid on Post-Thawed Pırlak Ram Sperm Parameters, Oxidative Stress and DNA Damage in Non-Breeding Season. Kocatepe Vet J. (2019) 12(3):363-369

Submission: 17.07.2019 Accepted: 29.08.2019 Published Online: 30.08.2019

ORCID ID; FA: 0000-0003-2345-8826, DY: 0000-0002-9105-5677, MKB: 0000-0002-9683-4979,

MG: 0000-0002-3292-4625

\*Corresponding author e-mail: favdatek@aku.edu.tr

## GİRİŞ

Günümüzde koç ve teke spermalarının dondurularak suni tohumlama uygulamalarında kullanılması sonucu elde edilen başarı tatmin edici değildir. Bunun da en önemli nedenlerinden bir tanesi dondurulup çözdürülmesi sonucunda elde edilen sperma kalitesinin istenen seviyede olmamasıdır. Gerek küçük ruminantlar da bu problemleri ortadan kaldırmak gerekse büyük ruminantlar da elde edilen başarıyı daha da ilerletmek için spermanın dondurulmasında farklı kimyasal maddeler kullanılarak spermanın uzun süre saklanma çalışmaları devam etmektedir. Genetik materyalin önemli bir parçasını oluşturan erkek gamet hücreleri olan spermatozoitlerin dondurulması nesli tükenmekte olan, değerli, eşsiz hayvanların genetik korunması için son derece önemli bir araç haline gelmiştir.

Kriyopreservasyon; hücrelerin dondurularak uzun yıllar saklanması anlamına gelmektedir. Kriyopreservasyon işleminde amaç çok düşük ısıda canlı bir hücrenin veya dokunun minimum hasarla fonksiyon kaybı olmaksızın uzun süreli saklanmasıdır. Spermanın sulandırılması, soğutulması, dondurulması ve çözdürülmesi aşamalarını kapsamaktadır (Trousseau 1990, Bailey ve Bilodeau 2000). Sperma sulandırıcısına katılan antioksidanlar ve katkı maddeleri spermatozoa mitokondrisi ve akrozomunun fonksiyonel bütünlüğü üzerine soğuktan koruyucu etki yapar. Böylece, ATP enerjisinin üretilmesini sağlayarak spermanın çözdürülmesi sonrası spermatozoa motilitesini artırmaktadır. (Shiva ve ark. 2010) Antioksidan ilavesi spermatozoitlerin saklanması işlemi süresince oksidatif stresi azaltarak etkileyebilmekte ve böylelikle soğutulmuş sperma kalitesini artırmaktadır. (Bilodeau ve ark. 2001) Antioksidanların sperma kalitesini artırarak, DNA hasarını önleyerek ve lökositler tarafından üretilen reaktif oksijen türevlerinin (ROI) süpürücüsü olarak spermatozoonları korumaktadır. Vitamin E yağda çözünen ve hücre membranındaki en önemli zincir kırıcı antioksidandır. Spermatozoon motilitesini ve sayısını artırır, lipid peroksidasyonu azaltıp spermatozoonun yaşayabilirliğini artırmaktadır. E vitamini; oksidatif strese karşı koruyucu özelliğe sahiptir. (Akiyama 1999) En aktif formu alfa-tokoferoldür. Çok güçlü bir antioksidan olan alfa-tokoferolün en önemli görevi serbest oksijen radikallerinin ataklarına karşı membran lipidlerindeki doymamış yağ asitlerini korumaktır (Rice ve Kennedy 1988) Alfa-tokoferolün antioksidan etkisi yüksek oksijen konsantrasyonlarında etkilidir (Deichsel ve ark. 2008). Genel olarak vitamin E alkoksil radikalini ve lipid peroksili nötralize ederek, lipid peroksidasyonu engellemektedir (Agarwal ve ark. 2003). E vitamini en önemli lipofilik antioksidan ve esasen hücre membranında bulunur bu yüzden membran stabilitesinin korunmasında yardım etmektedir. E vitamini, doymamış yağ asitlerinden

ziyade antioksidan moleküllerinden hidrojen atomu ayırarak serbest radikallerin oluşmasını sağlar böylece, serbest radikal reaksiyon zincirinin kırılmalar meydana gelerek unreaktif olarak bilinen antioksidan radikalleri ortaya çıkar (Ozden ve ark. 2009).

Alfa lipoik asit (ALA) açıl grup transferinde ve krebs döngüsünde bir koenzim gibi yardımcı molekül olarak 1951 yılında Reed ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. 1980'li yıllarda bilim camiası tarafından güçlü bir antioksidan olduğu ortaya kondu. ALA hayvanlar ve insanlar tarafından sentezlenebilmektedir (Carreau 1979) ALA'nın okside ve redükte formlarının antioksidan etkinlikleri vardır. (Packer ve ark. 1995). ALA (thioctic asit olarak bilinen) vitamin benzeri bir antioksidandır, hücre içini ve dışını çeşitli serbest oksijen radikallerine karşı korumaktadır (Suzuki ve ark. 1991). Alfa lipoik asit disülfid bir bileşiktir ve pyruvate dehydrogenase and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase için bir koenzim olarak mitokondride bulunmaktadır. Bu maddenin eksojen olarak ilave edilmesi bağlı olmayan alfa lipoik asit seviyesini artırmaktadır ki bu da hem in vivo hem de in vitro oksidatif stresin azaltılmasını ve kuvvetli bir antoksidan olarak davranması sağlanabilir. Alfa lipoik asit hem suda hem de yağda çözünen, hücre mebranında lipid peroksidasyonlar dahil serbest radikalleri azaltılmasında ve mitokondri kaynaklı serbest radikal süpürücüleri kadar etkinliği yüksektir (Selvakumar ve ark. 2005).

Bu çalışmada, Pırlak koçlarının spermasının uzun süreli saklanmasında sperma sulandırıcılarına katılan trolox ve ALA'nın sezon dışı dönemde çözüm sonu spermatozoa motilitesi, morfolojisi, ölü-canlı oranı, membran bütünlüğü, oksidatif stres parametreleri ve DNA hasarı üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapıldı.

## MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada hayvan materyali olarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde bulunan 2-3 yaşlı 5 adet Pırlak ırkı koç kullanıldı. Sezon dışı dönemde koçlardan haftada iki kez suni vajen yardımıyla her bir koçtan toplam 6 ejakulat alındı. Sperma örnekleri bir tüpte birleştirilerek (pooling) dondurma öncesi spermatozoolik muayeneleri yapıldıktan sonra 3 eşit hacme ayrıldı Çalışmada dondurma sulandırıcı olarak Tris ana stok solüsyonu (% 5 gliserol, % 20 yumurta sarısı) kullanılarak 1 mM trolox, 1 mM ALA ve herhangi bir antioksidan eklenmeyerek (kontrol) 3 farklı grup oluşturuldu. ml'de  $5 \times 10^8$  olacak şekilde dozajlanarak sulandırıldı. Sulandırılan spermalar 5°C'de 2-3 saat ekilibrasyondan sonra azot buharında dondurularak sıvı azot içinde saklandı.

## Spermatolojik Muayene

Sperma motilitesi 37°C'ta ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta (Olympus CX31, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) ve en az 5 alan olacak şekilde 200x lük büyütmede değerlendirilerek % olarak kaydedildi (Demirci 2002). Anormal spermatozoa oranı sıvı fikzasyon yöntemi ile belirlendi. Fikzasyon amaçlı 1 ml Hancock sıvısı içine 1-2 damla sperma numunesi damlatılıp iyice karışımları sağlandıktan sonra karışımdan bir damla sperma lam üzerine alınarak üzerine lamel kapatılarak immersiyon objektifinde 1000x faz-kontrast mikroskopta 400 spermatozoon sayılarak anormal spermatozoa oranı % ( olarak kaydedildi (Schafer ve Holzmann 2000). Spermatozoon membran bütünlüğü ve canlılığının belirlenmesi amacıyla Hipo Ozmotik Swelling Test-Eozin (HOST-E) testi uygulandı. Sperma örneklerinin 100 mOsm/l'te ayarlanmış fruktoz solüsyonu içerisinde % 1'lik eozin-Y ilave edilerek HOST-E solüsyonu hazırlandı. ve 35°C de 30 dakika inkübe edilip inkübasyon sonrası froti çekilen lamlar hızlıca kurutularak hazırlandı. Hazırlanan preparatlardan toplam 200 hücre sayıldı ve dört tipe (Tip I: kuyruk şişmiş ve baş boya almamış, HOST + /E- ;Tip II: kuyruk şişmemiş ve baş boya almamış, HOST- / E-; Tip III: kuyruk şişmiş ve baş boya almış, HOST + / E +; Tip IV: kuyruk şişmemiş ve baş boya almış, HOST- / E +) göre spermatozoon başının boya alma ve spermatozoon kuyruğunun kıvrılma durumuna göre değerlendirildi (Gündoğan ve ark. 2011). Spermatozoa GSH içeriği Sedlak ve Lindsay (1968) metodu kullanılarak ölçüldü. MDA konsantrasyonu Draper ve Hadley (1990) bildirdiği çift kaynatma metodu ile belirlendi. Spermatozoon DNA hasarının belirlenmesinde Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) yöntemi kullanıldı. Comet assay olarak da adlandırılan bu yöntemde İnanç ve ark. (2019) metodu kullanılarak alkali pH da farklı molekül ağırlıklarına ve elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda göçleri incelendi. Değerlendirme ise elde edilen DNA migrasyon görüntülerine göre yapıldı (Singh ve ark. 2003).

## İstatistiksel Analiz

**Tablo 1.** Dondurma-çözdürme sonrası spermatolojik parametreler ( $\bar{X} \pm SEM$ , n:6)

**Table 1.** Spermatological parameters after freezing-thawing ( $\bar{X} \pm SEM$ , n:6)

Gruplar	Motilite (%)	Baş (%)	Orta Kısım (%)	Kuyruk (%)	Toplam (%)	Akrozom (%)
<b>Kontrol</b>	50.0±2.58 <sup>b</sup>	1.08±0.30 <sup>b</sup>	0.33±0.10	7.58±0.59	9.0±0.71	28.83±3.17 <sup>a</sup>
<b>Trolox (1 mM)</b>	45.0±2.23 <sup>b</sup>	3.41±0.62 <sup>a</sup>	0.25±0.11	6.66±1.06	10.33±1.31	17.66±2.21 <sup>b</sup>
<b>ALA(1mM)</b>	58.3±1.66 <sup>a</sup>	1.66±0.44 <sup>b</sup>	0.08±0.08	8.41±0.98	10.16±0.66	17.91±2.74 <sup>b</sup>

a-b: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî açıdan önemlidir (P < 0.05).

ALA: alfa lipoik asit.

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Gruplar arası farkın önemini belirlemek için Post-hoc Duncan testi kullanıldı. Analizler bilgisayar ortamında SPSS (16.0) paket programında gerçekleştirildi.

## BULGULAR

### Dondurma-Çözdürme Sonrası Spermatolojik Parametreler

Dondurma-çözdürme sonrası elde edilen motilite, anormal spermatozoon ve akrozomla ilgili elde edilen bulgular Tablo 1'de sunulmuştur. En yüksek motilite ALA grubunda (% 58.3±1.66) tespit edildi (P<0.05). Akrozom bütünlüğü antioksidan içeren gruplarda (%17,66±2,21; %17,91±2,74) kontrol grubuna göre (28,83±3,17) tüm daha yüksek bulundu (P<0.05).

### Dondurma-Çözdürme Sonrası HOST-E Test Parametreleri

Dondurma-çözdürme sonrası **HOST-E** sonucunda elde edilen bulgular Tablo 2'de verildi. Tip I (HOST+/E-) oranı açısından kontrol grubuna göre ALA grubundaki artış, Tip II (HOST-/E-) oranı yönünden kontrol grubuna göre trolox grubundaki azalış ve Tip III (HOST+/E+) oranı bakımından kontrol grubuna göre trolox grubundaki artışın önemli (P<0.05) olduğu belirlendi.

### Dondurma-Çözdürme Sonrası DNA Hasarları

Dondurma-çözdürme sonrası DNA hasarı yönünden elde edilen bulgular Tablo 3'de sunuldu. Buna göre kontrol grubuna göre trolox ve ALA içeren gruplarında daha yüksek DNA bütünlüğü tespit edildi (P<0.05).

### Dondurma-Çözdürme Sonrası Oksidatif Stres Parametreleri

Dondurma-çözdürme sonrası oksidatif stres parametrelerine ait bulgular Tablo 4'de verildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, lipoik asit ve trolox gruplarında spermatozoon MDA ve GSH düzeylerinde , azalmalar istatistikî olarak önemli (P<0.05) bulundu.



**Tablo 2.** Dondurma-çözdürme sonrası HOST-Eparametreleri ( $\bar{X} \pm SEM$ , n:6)**Table 2.** HOST-E parameters after freezing-thawing ( $\bar{X} \pm SEM$ , n:6)

Gruplar	HOST+/E- (%)	HOST-/E- (%)	HOST+/E+ (%)	HOST-/E+ (%)
<b>Kontrol</b>	42.33±4.58 <sup>b</sup>	22.50±1.31 <sup>a</sup>	17.00±4.01 <sup>b</sup>	18.16±2.76 <sup>b</sup>
<b>Trolox (1 mM)</b>	34.66±1.66 <sup>b</sup>	13.33±1.60 <sup>b</sup>	28.33±1.87	23.66±2.23 <sup>a</sup>
<b>ALA (1mM)</b>	55.83±2.03 <sup>a</sup>	23.16±2.37 <sup>a</sup>	<sup>a</sup> 9.50±1.50 <sup>b</sup>	11.50±1.31 <sup>ab</sup>

a-b: Aynı sütun içerisindeki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki olarak önemlidir (P < 0.05).

ALA: alfa lipoik asit.

HOST + /E- : kuyruk şişmiş ve baş boya almamış

HOST- / E-: kuyruk şişmemiş ve baş boya almamış

HOST + / E +: kuyruk şişmiş ve baş boya almış,

HOST- / E +: kuyruk şişmemiş ve baş boya almış.

**Tablo 3.** Dondurma-çözdürme sonrası DNA Hasarları ( $\bar{X} \pm SEM$ , n:6)**Table 3.** DNA damages after freezing-thawing ( $\bar{X} \pm SEM$ , n:6)

Gruplar	DNA (AU)
<b>Kontrol</b>	49.00±7.09 <sup>a</sup>
<b>Trolox (1 mM)</b>	30.50±3.55 <sup>b</sup>
<b>ALA (1mM)</b>	25.33±3.44 <sup>b</sup>

a-b: Sütun içerisindeki farklı harfler taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir (P < 0.05).

ALA: alfa lipoik asit.

**Tablo 4.** Dondurma-çözdürme sonrası oksidatif stres parametreleri ( $\bar{X} \pm SEM$ , n:6)**Table 4.** Oxidative stress parameters after freezing-thawing ( $\bar{X} \pm SEM$ , n:6)

Gruplar	MDA (nmol/ml)	GSH (mg/dl)
<b>Kontrol</b>	6.3 ± 0.61 <sup>a</sup>	7.2 ± 0.64 <sup>a</sup>
<b>Trolox (1 mM)</b>	4.2 ± 0.47 <sup>b</sup>	3.1 ± 0.45 <sup>b</sup>
<b>Lipoik (1mM)</b>	3.2 ± 0.24 <sup>b</sup>	3.7 ± 0.43 <sup>b</sup>

a-b: Herbir sütundaki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir (P < 0.05).

ALA: alfa lipoik asit.

## TARTIŞMA

Koç spermasının uygun bir şekilde dondurularak sun'i tohumlamada kullanılması koyun yetiştiriciliğini ve ıslahını doğrudan olumlu yönde etkilmektedir. Spermanın dondurulması ve bu esnada gelişen olaylar spermatozoonların fonksiyonlarının hasar görmesine yol açmaktadır. Sperma sulandırıcılarına ilave edilen kryoprotektif maddeler ile antioksidanlar dondurma işleminin ve beraberinde gelişen olumsuz etkilerin en aza indirmesini sağlamaktadır. Dondurulmuş-çözdürülmüş spermada azalan antioksidan kapasite ve artan ROT oluşumu, spermatolojik özellikleri ve

fertiliteyi olumsuz olarak etkiler. Bu nedenle koç spermasının dondurulmasında antioksidan maddeler, çözdürme sonrası spermatolojik parametreler üzerine olumlu etkileri olabileceği düşünüldüğünden sperma sulandırıcılarına katılmaktadır (Chen ve ark. 1993, Sinha ve ark. 1996).

Subjektif motilite açısından ALA grubu kontrol grubuna göre belirgin bir üstünlük sağladı (P<0.05). Akrozom bütünlüğü açısından antioksidan içeren gruplar kontrol grubuna göre olumlu etkisi gözlemlendi (P<0.05). Başpınar ve ark. (2011) tris bazlı Merinos koç sperması sulandırıcısına farklı

konsantrasyonlarda (1, 2, 4 mM) ALA ilavesi ile dondurma-çözdürme sonucunda kontrole göre 1mM ilave edilen grupta artışın önemli olduğu bildirdiler. Andreea ve Stela (2010) tris bazlı sperma sulandırıcısına vitamin E ve sistein ilave ederek dondurdukları koç spermasında çözüm sonrası vitamin E ilave edilen grupta motilite % 59,16 olarak bildirmektedirler. Anghel ve ark. (2010) tris bazlı koç sperma sulandırıcısına farklı konsantrasyonlarda bovine serum albumin (BSA), sistein ve Vitamin E ilave ederek dondurdukları spermalarda çözüm sonrası 1 mM vitamin E grubunda motilite % 62,61 olarak bildirmektedir. O'Flaherty ve ark. (1997) tris sulandırıcısı (kontrol) ve tris sulandırıcısına vitamin E ilave ederek iki grup halinde dondurdukları boğa spermalarında çözüm sonrası anormal akrozom oranı sırasıyla % 7 ve % 9 olarak bildirmektedir. Anghel ve ark. (2010) tris bazlı koç sperma sulandırıcısına farklı konsantrasyonlarda bovine serum albumin (BSA), sistein ve vitamin E ilave ederek dondurdukları spermalarda çözüm sonrası 1 mM vitamin E ilave edilerek dondurulan grupta anormal spermatozoon oranlarını düşürmesi istatistikî olarak anlamlı olduğu bildirmektedir. Elde edilen sonuçlar bazı araştırmacılar ile uyum gösterirken bazı çalışmalardan yüksek ya da düşük sonuçlar ortaya çıkmasının nedenleri arasında ırk, mevsim, koçlardaki genotipik değişiklikler, sperma sulandırıcısının içeriği, sulandırıcıda kullanılan yumurta sarısının oranı, sulandırıcıların içerdiği komponentlerin miktar ve oranlarının, farklılığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu farklılıklar spermanın sulandırılmasında ve dondurulmasında kullanılan tekniklerden çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişimlerden ve analizi yapan kişi gibi faktörlerden kaynaklanabilir.

Membran bütünlüğü ve ölü-canlı spermatozoon oranının belirlendiği modifiye HOST-Ebulguları Tablo 2'de sunuldu. Buna göre, HOST+/E- oranı açısından kontrol grubuna göre ALA grubundaki artış, HOST-/E- oranı yönünden kontrol grubuna göre trolox grubundaki azalış ve HOST+/E+ oranı bakımından kontrol grubuna göre trolox grubundaki artışın önemli (P<0.05) olduğu belirlendi. Gündoğan ve ark. (2011) Pırlak koçlarda farklı sulandırıcılar ile kısa süreli saklama çalışmalarında tris bazlı sulandırıcı grubunda sulandırma sonrası 0. saatteki ortalama HOST+/E- , HOST-/E- , HOST+/E+ ve HOST-/E+ oranlarını sırasıyla % 62, % 26, % 3 ve % 9 olarak bulmuşlardır. Gündoğan ve ark. (2010)'nın Pırlak koçlarda spermanın tris ile sulandırılması sonrası 0. saatteki 25 ve 100 milyon yoğunluklu gruplarda HOST+/E- oranlarını sırasıyla ortalama % 58 ve % 49 olarak bildirmektedirler. Akman (2007) Swiss Albino ırkı fare spermatozoonlarındaki optimal hipozmotik ozmolariteyi 20-60 mosm olarak belirledikleri çalışmalarında ortalama HOST+/E-, HOST-/E-, HOST+/E+ ve HOST-/E+ oranlarını sırasıyla % 29.6 ± 3.2, %23.8 ± 5.0, % 18.1 ± 2.7 ve

% 28.6 ± 1.0 olarak bulmuştur. Gözlenen farklılıkların temelini ırk, mevsim ve sperma alma metodu gibi faktörlerin yanı sıra sperma sulandırıcılarına katılan antioksidanların farklılığı ve spermanın sulandırılmasında, saklanmasında ve değerlendirilmesinde kullanılan teknik, çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişim ve analizi yapan kişi gibi faktörlerinde oluşturabileceğini düşündürmektedir.

DNA hasarı yönünden kontrol grubuna göre trolox ve ALA içeren gruplardaki azalmalar istatistikî olarak önemli (P<0.05) bulundu. İbrahim ve ark. (2008) kızıl geyiklerde yaptıkları bir çalışmada ALA spermanın dondurma-çözdürme sonrası motilite ve yaşama gücünü artırdığı bununla beraber DNA hasarını ise azalttığını bildirmektedirler. Hughes ve ark. (1999) farklı yoğunluklarda X ışınlarına maruz kalmış insan spermasında meydana gelen DNA hasarı ve askorbik asit ile vitamin E ( $\alpha$ -tekoferol)'ün bu DNA bütünlüğünü ne derece koruduğunu comet analiz yöntemiyle araştırdıkları çalışmalarında 300  $\mu$ M askorbik asitin ve 30  $\mu$ M  $\alpha$ -tekoferol'ün DNA bütünlüğünün korunmasında etkili olduğunu bildirmektedirler. DNA hasarında gözlenen farklılıklar arasında ırk, mevsim ve sperma alma metodu gibi faktörlerin yanı sıra dondurma işleminde kullanılan sulandırıcılar ile sulandırıcıların içerdiği komponentlerin miktar ve oranları ile sperma sulandırıcılarına katılan antioksidanların farklı olması, spermanın sulandırılmasında ve dondurulmasında kullanılan tekniklerin farklılığı çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişimler gibi etkenlerin de rolü olabilir.

Oksidatif stres parametreleri (MDA ve GSH) açısından ALA ve trolox içeren gruplarda kontrol grubuna göre olumlu etkiler gözlemlendi (P<0.05). Silva ve ark. (2010) Santa Inês koç sperma sulandırıcılarına ilave ettikleri 50  $\mu$ M Trolox/10<sup>8</sup> dondurma çözdürme sonrası lipid peroksidasyon düzeyleri üzerine kontrol ve diğer gruplara göre olumlu etki yaptığını ve oksidatif stresin kontrolü amacıyla sperma sulandırıcısına ilave edilmesi gerektiğini bildirmiştir. O'Flaherty ve ark. (1997) tris sulandırıcısına vitamin E ilavesi ile dondurdukları boğa spermalarında çözüm sonrası MDA seviyesinin azaldığı bildirilmiştir. Sicherle ve ark. (2011) süt bazlı sperma sulandırıcısına 100  $\mu$ g/ml katalaz ve 100 $\mu$ M trolox ilave ederek dondurdukları koç spermasında çözüm sonrası trolox grubunda MDA seviyesinde kontrole göre düşüş görülmüştür. Andreea ve Stela (2010) tris bazlı sperma sulandırıcısına vitamin E ve sistein ilave ederek dondurdukları koç spermasında çözüm sonrası vitamin E ilave edilen grupta MDA seviyesindeki azalmanın kontrol grubuna göre önemli olduğunu bildirmektedirler. Başpınar ve ark. (2011) tris bazlı Merinos koç sperması sulandırıcısına farklı konsantrasyonlarda (1, 2, 4 mM) ALA ilavesi ile dondurma-çözdürme sonucunda 1mM ilave ALA grubunda MDA seviyesi kontrole göre yüksek

olduğunu bildirmektedirler. Oksidatif stres parametrelerinde literatür bilgileri ile aralarında gözlenen farklılıklar dondurma işleminde kullanılan sulandırıcılar ile sulandırıcıların içerdiği komponentlerin miktar ve oranlarının ve sulandırıcının antioksidan ilave edilmeden önce santrifüj yapıp yapılmadığından kaynaklanmış olabileceği gibi spermanın sulandırılmasında ve dondurulmasında kullanılan tekniklerdeki farklılıklara, çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişimlere, analizin yapıldığı yöntem ve analizi yapan kişi gibi faktörlere bağlı olarak da meydana gelmiş olabilir.

Sonuç olarak Pırlak ırkı koçların spermalarının sezon dışı dönemde uzun süreli saklanması sırasında kullanılan ALA ve trolox'un çözüm sonu spermatolojik parametreleri, oksidatif stres parametreleri ve DNA hasarını koruyucu etki sağladığı tespit edilmiştir. Trolox ve ALA ilavesinin koç spermasının uzun süreli saklanmasındaki yararlı sonuçlarının ileriki araştırmalarda suni tohumlama sonrasında fertilité sonuçlarıyla desteklenebileceği kanaatine varıldı.

## TEŞEKKÜR

*Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 17.KARİYER.78 nolu proje ile desteklenmiştir.*

*Bu çalışma International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology (ICABB 2017) kongresinde sözlü olarak sunulmuştur.*

## KAYNAKLAR

- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA.** Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* 2003; 79: 829-843.
- Akiyama M.** In vivo scavenging effects of ethylcysteine on reactive oxygen species in human semen. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi.* 1999; 90: 421-428.
- Akman O.** Swiss Albino Irkı Farelerde Sperma Kalitesinin Belirlenmesi Amacıyla Hos Testi Sonuçları ve Diğer Spermatolojik Parametreler Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Doktora Tezi Selçuk Ü. Sağ. Bil. Enst. 2007.
- Andreea A, Stela, Z.** Role of antioxidant additives in the protection of the cryopreserved semen against free radicals. *Romanian Biotechnological Letters.* 2010; 15 (3): 33-41.
- Anghel A, Zamfirescu S, Copenan D, Sogorescu E.** The effects of cystein, bovine serum albumin and vitamin e on the caltative parameters of frozen-thawed ram semen. *Annals of RSCB.* 2010; 16 (2): 26-32.
- Bailey JL, Bilodeau JF.** Corneir Semen Cryopereservation in domestic animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon *J. of And.* 2000; 21 (1): 1-7.
- Başpınar N, Çoyan K, Bucak MN, Ömür AD, Ataman MB, Akalın PP, Güngör Ş, Öztürk C.** Koç spermasının ekilibasyon ve dondurma-çözdürme sonrası

spermatolojik ve biyokimyasal parametreleri üzerine lipoik asitin etkisi. *Eurasian J. Vet. Sci.* 2011; 27 (2): 87-92.

- Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sırard MA.** Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology.* 2001; 56 (2): 275-286.
- Carreau JP.** Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids. *Methods Enzymol.* 1979; 62: 152-158.
- Chen Y, Foote RH, Brockett CC.** Effect of Sucrose, Trehalose, Hypotaurine, Taurine and Blood Serum on Survival of Frozen Bull Sperm. *Cryobiology.* 1993; 30: 423-431.
- Deichsel K, Palm F, Koblıschke P, Budık S, Aurich C.** Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. *Theriogenology.* 2008; 69: 940-945.
- Demirci E.** Evcil hayvanlarda reproduksiyon, sun'i tohumlama ve androloji ders notları (1nd ed). F.Ü.Vet.Fak., Ders Teksiri No:53 Elazığ. 2002.
- Draper HH, Hadley M.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 421-430.
- Gündoğan M, Avdatek F, Yeni D.** Effect of extenders on motility, morphology and osmotic resistance parameters of ram sperm during liquid storage. *Revue Méd. Vét.* 2011; 162 (11): 546-551.
- Gündoğan M, Yeni D, Avdatek F, Fidan AF.** Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.* 2010; 122: 200-207.
- Hughes CM, Mckelvey-Martin VJ, Lewis SEM.** Human sperm DNA integrity assessed by the Comet and ELISA assays. *Mutagenesis* 1999; 14 (1): 71-75.
- Ibrahim SF, Osman K, Das S, Othman AM, Majid NA, Rahman MPA.** A study of the antioxidant effect of alpha lipoic acids on sperm quality. *Clinics.* 2008; 63: 545-50.
- İnanç ME, Çil B, Yeni D, Avdatek F, Orakçı D, Tuncer PB, Türkmen R, Taşdemir U.** The effect green tea extract supplementation in bull semen cryopreservation. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 2019; 25:703-708.
- O'Flaherty CM., Beconi MT., Beorlegui NB.** Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia.* 1997; 29: 269-275.
- Özden S, Catalgol B, Gezcinci S, Arda P, Bolkent S, Alpertunga B.** Methiocarb-induced oxidative damage following subacute exposure and the protective effects of vitamin E and taurine in rats. *Food and Chemical Toxicology.* 2009; 47: 1676-1684.
- Packer L, Witt EH, Tritschler HJ.** Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* 1995; 19: 227-250.
- Rice D, Kennedy S.** Vitamin E: function and effects of deficiency. *Br. Vet. J.* (1988; 144: 482-492.
- Schafer S, Holzmann A.** The use of transmiration and Spermac™ stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 59: 201-211.
- Sedlak J, Lindsay RHC.** Estimation of total, protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. *Anal. Biochem.* 1968; 25: 192-205.
- Selvakumar E, Prahalthan C, Mythili Y, Varalakshmi P.** Beneficial effects of DL-α-lipoic acid on

cyclophosphamide-induced oxidative stress in mitochondrial fractions of rat testis. *Chemico-Biological Interactions*. 2005; 152: 59–66.

**Shiva SRN, Jagan M, Atreja SK.** Effect of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm following cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 2010; 119: 183-190.

**Sicherle CC, Maia MS, Bícudo SD, Rodello L, Azevedo HC.** Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. *Small Rum. Res.* 2011; 95: 144–149.

**Silva MS, Bícudo SD, Sicherle CC, Rodello L, Gallego IC.** Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.* 2010; 122: 118-123.

**Singh NP, Muller CH, Berger RE.** Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil. Steril.* 2003; 80 (6): 1420-1430.

**Sinha MP, Sinha AK, Prasad RL.** The effect of glutathione on motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Anim. Reprod. Sci.* 1996; 41: 237-243.

**Suzuki YJ, Tsuchiya M, Packer L.** Thiocctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. *Free. Rad. Res. Commun.* 1991; 15: 255-263.

**Trounson AO.** Cryopreservation. *Brit. Med. Bull.* 1990; 147: 427-433.

## Instruction for Authors

Kocatepe Veterinary Journal (KVJ) has the policy with One Medicine One Health. Research article, reviews, brief communication and case reports, letters to editor and book reviews are also welcome for consideration to publish articles of high scientific and ethical standards.

The journal is published four times a year. The publication of the text and figures is **free** of charge.

Acceptance of papers for the KVJ is undertaken by Editors. Editorial Board members adjudicate in the case of conflicting or adverse reports.

Manuscripts are accepted for consideration on the understanding that they are for publication solely in KVJ and that they neither have been published nor are under consideration for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher.

Each author accepts all ethical responsibility of the article and all authors agree with the content of the study. After article is checked by Professional Plagiarism Prevention program, article will be sent to authors. Articles are checked by iThenticate® program, when plagiarism or self-plagiarism are detected, they will not be evaluated for publication.

If animals are used in the studies, study should be approved by an Ethical Committee, Name of Ethical Committee and Approved Number should be mentioned in the Material and Method section. Editor may be reject directly the article, if animal is exposed to stressful or painful conditions.

Authors accept ethical rules when article is sent for publication. Author(s) should send Copyright Transfer Agreement, after acceptance of article.

Each author accepts all ethical responsibility of the article and all authors agree with the content of the study.

**Article should be written using Garamond, font of 11 point, with 1.5 line spacing, margins of the A4 paper should be 2.5 cm from all edges (Word97-2010.doc). Abbreviations should be written in SI. Research article submitted to Kocatepe Veterinary Journal should be divided into the following sections:**

**Title page** (Abstract, Key words without authors name and address), **Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, Tables, Graphics, Figures.**

**Title page:** Papers should be headed with the full title, the initial letters of name and surnames of the authors, the name and address of the institution where the work is carried out. The telephone number, fax number and e-mail address of the corresponding author should also be provided. The title should be short, specific and informative.

**Abstract** Should be no more than 200 words, outlining in a single paragraph.

**Keywords**, 5 keywords that describe the crucial points of the paper should be provided. Keywords should be chosen from Turkey Science Term ([www.bilimterimleri.com](http://www.bilimterimleri.com))

**Introduction**, an updated literature related to paper and aim(s) of the study should be clearly given in this section.

**Materials and methods**, a clear account of materials used and methods employed should be given and it should be applicable/repeatable by other researchers.

**Results**, as concise as possible. Text, tables and figures illustrating the same data should be limited and succinctly outline the pertinent outcomes of the study.

**Discussion:** Results of the study should be discussed with directly relevant references. This section may also be divided into subsections.

**Conclusions:** This section should state clearly the main conclusions of the research. Results should not be repeated.

**Acknowledgements**, it is advised to acknowledge persons or institutions directly or indirectly involved in the study.

### References

References in the text should be made as follows: **Kara (2012)** described. / . was reported (**Zemheri 2015, Eryavuz and Yeni, Eryavuz et al. 2015**). List of references should be given alphabetically in the reference list. Different publications having the same author(s) of same year should be written as **2011a, 2011b**. Web address should be referenced as **anonim** for example **Anonim 2015**. Only official web pages should be used. Author name(s) and date should be written bold. The reference list at the end of the paper should be written as below.

**Journal:**

**Ince S, Kucukkurt I, Cigerci IH, Fidan AF, Eryavuz A.** The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2010; 24(3):161-164.

**Book section:**

**Juneja R, Koide SS.** Molecular Biology of Reproduction, In: *Reproduction in Farm Animals*, Ed; HafezB, Hafez ESE, 7<sup>th</sup> Ed., LippincottWilliams and Wilkins, Philadelphia, USA. 2000; pp. 354-361.

**Web page:**

**Anonymous.** [http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb\\_id=46&cust\\_id=13](http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=46&cust_id=13);Accessien date: 02.01.2012.

**Thesis:**

**Yeni D.** Some andrological parameters and biochemical properties in relation to season in rams. PhD thesis, Afyon Kocatepe University Health Science Institute, Afyonkarahisar, 2010.

**Tables:** Tables should be presented in a separate page at the end of manuscript.

**Graphics:** Figures should be presented in a separate page at the end of manuscript.

**Figures :** Figures should be presented in a separate page at the end of manuscript. Figures should be 80 or 160 mm, minimum 300 dpi.

**Titles of tables, graphics and figures should be both Turkish and English.**

**Brief Communications:** Brief communications should be concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later publication. They should not exceed 1600 words. They should bear no more than two tables or figures. An ABSTRACT should be given but no other sections. Typescripts should be clearly marked Brief Communication.

**Review Articles:** Review articles related to all medical topics are welcome for publication. They should give an update on recent advances in a particular field and be targeted at research veterinarians or clinicians who are not necessarily working in the same field. The length should not exceed 4500 words. It should have a precise abstract. Author of review should have at least two citations. For each issue maximum 2 reviews are published.

**Case Reports:** Reports of SINGLE or small numbers of cases will be considered for publication in KVJ if the case(s) are particularly unusual/rare or the report contributes materially to the literature. A case report should not exceed 1500 words and must comprise a Summary (maximum 150 words), Introduction, Case History and Discussion. The report should accomplish one of the followings:

- To be a substantially novel presentation
- To be a technique or treatment that would substantially alter management and prognosis of the described condition
- The first clinical report or first case(s) of diseases in a particular location where epidemiology is an important factor
- To exemplify best practice in medical science.

**Letters to The Editor:** Letters describing case reports or original material may be published in the KVJ and will be peer-reviewed prior to publication. Letters making criticisms on recently published papers in the KVJ will also be considered and the corresponding authors of the original paper will be invited to respond accordingly.

**All articles sent to KVJ (Kocatepe Veterinary Journal) ONLINE submission only.**

**During submission documents which are listed below, have to install to the system;**

1. **Title Page:** Author and institution names
2. **Main text:** Author and institution names should NOT be. Tables(s), graphic(s) and figure(s) etc. Should be on the last page of article, also title of them both in Turkish and English.
3. **Article addition:** Table(s), graphic(s) and figure(s) should have been installed to the system separately.
4. **Author Approval Form (Cover Letter):** All authors need to sign it and install to the system. Signatures should be wet signatures and send to the Editorial Board of Kocatepe Veterinary Journal.
5. **Copyright:** All authors need to sign it and install to the system. Signatures should be wet signatures and send to the Editorial Board of Kocatepe Veterinary Journal.