

ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES

Konya İli Kadınhanı ve Sarayönü İlçelerinde İthal ve Yurt İçinden Temin Edilen Hayvanlarla Sığır Besiciliği Yapan İşletmelerin Ekonomik Analizi..... 01
Economic Analysis of Cattle Fattening Enterprises with Imported and Providing Domestic Animals in Kadınhanı and Sarayönü District of Konya Province
Ö. GEZGİNÇ, A. GÜNLÜ

Aydın/Bozdoğan Yöresinde Yetiştirilen Gökkuşluğu Alabalıklarında (Oncorhynchus mykiss) Paraziter Yaygınlığın Araştırılması..... 10
The Investigation of Parasite Prevalence of Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) Reared in Aydın/Bozdoğan Province
E. ŞİMŞEK, O.S. ALDEMİR

Prevalence and Serotype Distribution of Listeria monocytogenes Isolated from Retail Raw Meats..... 22
Satışa Sunulan Etlerde Listeria monocytogenes Prevalansı ve Serotip Dağılımının Belirlenmesi
S. ŞAHİN, M.N. MOĞULKOÇ, R. KALIN

Kedilerdeki Abdominal ve Ortopedik Hastalıkların Prevalansı..... 28
Prevalence of Abdominal and Orthopedic Diseases in Cats
K. PARLAK, M. YALÇIN, E.T. AKYOL, M. ARICAN

Survey of Theileria, Babesia and Anaplasma Infections of Cattle and Ticks from Sivas Province of Turkey..... 32
Sivas Yöresinde Sığır ve Kenelerde Theileria, Babesia ve Anaplasma Enfeksiyonlarının Araştırılması
K. ALTAY, A.D. ATAS, Y.Z. OGRAK, E. OZKAN

The Effects of Different Additives on the Fermentation and Physical Characteristics of Lenox Silage..... 39
Farklı Katkı Maddelerinin Lenox Silajının Fermantasyon ve Fiziksel Özellikleri Üzerine Etkileri
H. GÜMÜŞ, F. KARAKAŞ OĞUZ, M.N. OĞUZ, K.E. BUĞDAYCI, E. KUTER

The Effect of Milkman on Productivity and Revenue in Dairy Herds..... 45
Süt Sığircılığı İşletmelerinde Sağımcinin Verimlilik ve İşletme Gelirine Etkisi
A. AKÇAY, S. SARIÖZKAN, M. KÜÇÜKOFLAZ, G. GÜNGÖR

Effect of Prostaglandin E2 on Corpus Luteum Function During Early Luteal Phase in Sheep..... 50
Prostaglandin E2'nin Koyunlarda Erken Luteal Dönemde Korpus Luteum Üzerine Etkisi
A. GRAM

Investigation of the Effects of Boric Acid on Preventing Lung Damage in the End of the Lower Extremity Ischemia Reperfusion in Rats..... 57
Sıçanlarda Alt Ekstremitte İskemi Reperfüzyonu Sonucunda Gelişen Uzak Doku Akciğer Hasarının Önlenmesinde Borik Asidin Etkilerinin İncelenmesi
C. ÖZCAN, AŞ. BENGÜ, HT. AKKOYUN, A. ULUCAN, M. BAYRAMOĞLU AKKOYUN

The Investigation of Serum Estrogen, Progesterone, AMH and IGF-1 Profiles in Lactating and Non Lactating Mares after Altrenogest Administrations..... 63
Laktasyonda Olan ve Laktasyonda Olmayan Kısıraklarda Altrenogest Uygulaması Sonrası Serum Östrojen, Progesteron, AMH ve IGF-1 Düzeylerinin Araştırılması
İM. POLAT, Ö. KORKMAZ, TB. ELİFOĞLU, İP. YAĞCI, HE. ÇOLAKOĞLU, M. PEKCAN

DERLEMELER / REVIEW ARTICLES

Bisfenoller ve Fitalatların Halk Sağlığı Üzerine Etkileri..... 68
Effects of Bisphenols and Phthalates on Public Health
Y. YILDIRIM, N. ERTAŞ ONMAZ, Z. GÖNÜLLALAN, H. HIZLISOY, S. AL, C. CANDEMİR GÜNGÖR, H. Burak DİŞLİ, A. DIŞHAN, M. BAREL

Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) Çalışmalarında Uygun Housekeeping Genlerin (HKGs) Seçimi ve Validasyonu..... 76
Selection and Validation of Suitable Housekeeping Genes (HKGs) in Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) Studies
Ö. KORKMAZ AĞAOĞLU, Ö. SIDEKLİ

OLGU SUNUMLARI / CASE REPORTS

Squamous Cell Carcinoma of the Third Eyelid Membrane in an African Grey Parrot (Psittacus erithacus)..... 84
Bir Afrika Gri Papağanında Üçüncü Göz Kapağının Skuamöz Hücreli Karsinomu
A. DEMİR, K. GERBAGA ÖZSEMİR, Ö. ERDOĞAN BAMAÇ



ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ
Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

17(1): 1-87, 2020

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

ISSN-1304-7280

Yıl/Year: 2020
Cilt/Volume: 17
Sayı/Number: 1

Yılda 3 sayı yayımlanır / Published 3 issues per year
<http://ercivet.erciyes.edu.tr>
E-posta: ercvet@gmail.com



ISSN-1304-7280

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

Journal of Faculty of Veterinary Medicine,
Erciyes University

Yılda 3 sayı yayımlanır
Published 3 issues per year

Bu dergi EBSCO Host, CABI Abstracts, World Agricultural Economics and Rural Sociology Abstract, Global Health, Tübitak-Ulakbim TR Dizin ve Türkiye Atıf Dizini tarafından dizinlenmektedir.

This journal is reviewed by EBSCO Host, CABI Abstracts, World Agricultural Economics and Rural Sociology Abstract, Global Health, Tubitak-Ulakbim TR Dizin and Turkey Citation Index.

Yıl / Year : 2020
Cilt / Volume : 17
Sayı / Number : 1

<http://ercivet.erciyes.edu.tr>

E-posta: ercvet@gmail.com

Baskı Tarihi: Nisan 2020

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi
Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University
Yılda 3 sayı yayımlanır
Published 3 issues per year

Sahibi / Owner

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Adına
Prof. Dr. Abdullah İNCİ (Dekan)

Editörler Kurulu / Editorial Board

Baş Editör / Editor-in Chief

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Editör Kurul Üyeleri / Editorial Board

Prof. Dr. Güner KÜÇÜK BAYRAM (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Berrin KOCAOĞLU GÜÇLÜ (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Öznur ASLAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Seçil ABAY (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Aytaç AKÇAY (İstatistik) (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Emel ALAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Kanber KARA (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Dr. Öğr. Üyesi Fatih Doğan KOCA (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Dr. Öğr. Üyesi İmdat ORHAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Dr. Öğr. Üyesi Serhat AL (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Arş. Gör. Gamze YETİŞMİŞ (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

İngilizce Dil Danışmanı/ Language Editor

Okt. Mustafa AKGÜL (Erciyes Üniv. Yabancı Diller YO.)

Danışma Kurulu / Advisory Board

Prof. Dr. Ali AYDIN (İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Vet. Fak.)

Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT (Kırıkkale Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Aytekin GÜNLÜ (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Assoc. Prof. Dr. Corneliu BRASLASU (Univ. Agricultural Sci. Vet. Med, Bucharest)

Prof. Dr. Ender YARSAN (Ankara Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Funda KIRAL (Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak.)

Dr. Gediminas VALKIUNAS (Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania)

Prof. Dr. İ. Safa GÜRCAN (Ankara Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. İsa ÖZAYDIN (Kafkas Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ (Uludağ Üniv. Vet. Fak.)

Ass. Prof. Dr. Klaus RIEDELBERGER (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria)

Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ (Afyon Kocatepe Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Mehmet DOĞANAY (Erciyes Üniv. Tıp Fak.)

Prof. Dr. Mustafa GARİP (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Münir AKTAŞ (Fırat Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Nuh KILIÇ (Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Oğuz KUL (Kırıkkale Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Oktay GENÇ (Ondokuz Mayıs Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Özcan ÖZGEL (Mehmet Akif Ersoy Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Rahşan ÖZEN (Fırat Üniv. Vek. Fak.)

Prof. Dr. Sinan AKTAŞ (Atatürk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Staffan BENSCH (University of Lund, Vilnius, Lithuania)

Prof. Dr. Şükrü Metin PANCARCI (Balıkesir Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Taylan AKSU (Yüzüncü Yıl Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Thomas RÜLİCKE (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria)

Prof. Dr. Thomas WITTEK (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria)

Yazışma Adresi / Correspondence

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Dergisi Editörlüğü
38039-Kayseri / TÜRKİYE

<http://ercivet.erciyes.edu.tr>

E-posta : ercivet@gmail.com

Tel : 0 352 339 94 84

Fax : 0 352 337 27 40

Yayın Türü / Publication Type: Yaygın süreli ve hakemli/ Common term and peer reviewed

Mizanpaj / Designer: Erhan GÜMÜŞ

Basım / Print: Erciyes Üniversitesi Matbaası, Melikgazi/KAYSERİ

ISSN-1304-728

ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES

- Konya İli Kadınhanı ve Sarayönü İlçelerinde İthal ve Yurt İçinden Temin Edilen Hayvanlarla Sığır Besiciliği Yapan İşletmelerin Ekonomik Analizi..... 01**
Economic Analysis of Cattle Fattening Enterprises with Imported and Providing Domestic Animals in Kadınhanı and Sarayönü District of Konya Province
Ö. GEZGINÇ, A. GÜNLÜ
- Aydın/Bozdoğan Yöresinde Yetiştirilen Gökkuşuğu Alabalıklarında (Oncorhynchus mykiss) Paraziter Yaygınlığın Araştırılması..... 10**
The Investigation of Parasite Prevalence of Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) Reared in Aydın/Bozdoğan Province
E. ŞİMŞEK, O.S. ALDEMİR
- Prevalence and Serotype Distribution of Listeria monocytogenes Isolated from Retail Raw Meats..... 22**
Satışa Sunulan Etlerde Listeria monocytogenes Prevalansı ve Serotip Dağılımının Belirlenmesi
S. ŞAHİN, M.N. MOĞULKOÇ, R. KALIN
- Kedilerdeki Abdominal ve Ortopedik Hastalıkların Prevalansı..... 28**
Prevalence of Abdominal and Orthopedic Diseases in Cats
K. PARLAK, M. YALÇIN, E.T. AKYOL, M. ARICAN
- Survey of Theileria, Babesia and Anaplasma Infections of Cattle and Ticks from Sivas Province of Turkey..... 32**
Sivas Yöresinde Sığır ve Kenelerde Theileria, Babesia ve Anaplasma Enfeksiyonlarının Araştırılması
K. ALTAY, A.D. ATAS, Y.Z. OGRAK, E. OZKAN
- The Effects of Different Additives on the Fermentation and Physical Characteristics of Lenox Silage..... 39**
Farklı Katkı Maddelerinin Lenox Silajının Fermantasyon ve Fiziksel Özellikleri Üzerine Etkileri
H. GÜMÜŞ, F. KARAKAŞ OĞUZ, M.N. OĞUZ, K.E. BUĞDAYCI, E. KUTER
- The Effect of Milkman on Productivity and Revenue in Dairy Herds..... 45**
Süt Sığırcılığı İşletmelerinde Sağımıcının Verimlilik ve İşletme Gelirine Etkisi
A. AKÇAY, S. SARIÖZKAN, M. KÜÇÜKOFLAZ, G. GÜNGÖR
- Effect of Prostaglandin E2 on Corpus Luteum Function During Early Luteal Phase in Sheep..... 50**
Prostaglandin E2'nin Koyunlarda Erken Luteal Dönemde Korpus Luteum Üzerine Etkisi
A.GRAM
- Investigation of the Effects of Boric Acid on Preventing Lung Damage in the End of the Lower Extremity Ischemia Reperfusion in Rats..... 57**
Sıçanlarda Alt Ekstremitte İskemi Reperfüzyonu Sonucunda Gelişen Uzak Doku Akciğer Hasarının Önlenmesinde Borik Asidin Etkilerinin İncelenmesi
C. ÖZCAN, AŞ. BENGÜ, HT. AKKOYUN, A. ULUCAN, M.BAYRAMOĞLU AKKOYUN
- The Investigation of Serum Estrogen, Progesterone, AMH and IGF-1 Profiles in Lactating and Non Lactating Mares after Altrenogest Administrations..... 63**
Laktasyonda Olan ve Laktasyonda Olmayan Kısıraklarda Altrenogest Uygulaması Sonrası Serum Östrojen, Progesteron, AMH ve IGF-1 Düzeylerinin Araştırılması
İM. POLAT, Ö. KORKMAZ, TB. ELİFOĞLU, İP. YAĞCI, HE. ÇOLAKOĞLU, M. PEKCAN

DERLEMELER / REVIEW ARTICLES

- Bisfenoller ve Fitalatların Halk Sağlığı Üzerine Etkileri..... 68**
Effects of Bisphenols and Phthalates on Public Health
Y. YILDIRIM, N. ERTAŞ ONMAZ, Z. GÖNÜLALAN, H. HIZLISOY, S. AL, C. CANDEMİR GÜNGÖR, H. Burak DİŞLİ, A. DIŞHAN, M. BAREL
- Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) Çalışmalarında Uygun Housekeeping Genlerin (HKGs) Seçimi ve Validasyonu..... 76**
Selection and Validation of Suitable Housekeeping Genes (HKGs) in Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) Studies
Ö. KORKMAZ AĞAOĞLU, Ö. SİDEKLİ

OLGU SUNUMLARI / CASE REPORTS

- Squamous Cell Carcinoma of the Third Eyelid Membrane in an African Grey Parrot (Psittacus erithacus)..... 84**
Bir Afrika Gri Papağanında Üçüncü Göz Kapağının Skuamöz Hücreli Karsinomu
A.DEMİR, K.GERBAGA ÖZSEMİR, Ö. ERDOĞAN BAMAÇ



ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

Araştırma Makalesi / Research Article
17(1), 1-9, 2020
DOI: 10.32707/ercivet.687716

Konya İli Kadınhanı ve Sarayönü İlçelerinde İthal ve Yurt İçinden Temin Edilen Hayvanlarla Sığır Besiciliği Yapan İşletmelerin Ekonomik Analizi*

Ömer GEZGİNÇ¹, Aytekin GÜNLÜ²

¹Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu, Van İl Koordinatörlüğü, Van-TÜRKİYE

²Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Hayvancılık Ekonomisi ve İşletmeciliği ABD, Konya- TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Aytekin GÜNLÜ, E-posta: agunlu@selcuk.edu.tr; ORCID: 0000-0002-1989-8119

Atıf yapmak için: Gezginç Ö, Günlü A. Konya ili Kadınhanı ve Sarayönü ilçelerinde ithal ve yurt içinden temin edilen hayvanlarla sığır besiciliği yapan işletmelerin ekonomik analizi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020; 17(1):1-9.

Özet: Bu çalışmada, Konya iline bağlı Kadınhanı ve Sarayönü ilçelerinde canlı hayvan materyalini yurt içinden ve ithalat yoluyla temin ederek sığır besiciliği yapan işletmelerin teknik, ekonomik ve yapısal özellikleri karşılaştırılmıştır. Besi materyalini yurt içinden temin eden 58 işletme (I. grup), ithal olarak temin eden 10 adet işletme (II. grup); toplamda 68 adet işletme ile anket yapılarak ekonomik analiz için gerekli veriler elde edilmiştir. İncelenen işletmeler için; masraf unsurları olan besi materyali, yem, işçilik, veteriner-sağlık giderleri, amortismanlar, bakım-onarım masrafları, genel idare giderleri ve diğer giderlerin toplam giderler içindeki oransal dağılımı sırasıyla işletmeler genelinde %49.22, %32.98, %8.67, %1.40, %1.09, %1.44, %2.91, %2.29; I. grup işletmelerde %48.83, %32.81, %9.16, %1.45, %1.09, %1.44, %2.91, %2.30; II. grup işletmelerde ise %51.48, %33.98, %5.83, %1.08, %1.07, %1.45, %2.91, %2.20 olarak bulunmuştur. İncelenen besi işletmelerinin bir kg karkas maliyeti, bir kg CA artışı maliyeti ve bir kg CA maliyeti sırasıyla işletmeler genelinde 24.20 TL, 10.59 TL, 13.03 TL ve I. grup işletmelerde 24.39 TL, 10.50 TL, 12.98 TL ve II. grup işletmelerde 23.06 TL, 11.08 TL, 13.36 TL olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda ithal ve yurt içinden temin edilen hayvanlarla yapılan beside bir kg karkas maliyeti ve bir kg canlı ağırlık maliyetleri bakımından gruplar arasında farklılık tespit edilememiştir (P>0.05). Sonuç olarak, ithal ve yerli orjinli hayvanlarla yapılan beside birim maliyet açısından bir farklılık olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Ekonomik analiz, sığır besiciliği, üretim masrafları

Economic Analysis of Cattle Fattening Enterprises with Imported and Providing Domestic Animals in Kadınhanı and Sarayönü District of Konya Province

Summary: In this study, the technical, economic and structural characteristics of fattening live material from the domestic market and importing enterprises in Kadınhanı and Sarayönü districts affiliated to the province of Konya were compared. For this aim, 58 enterprises (Group I), who supplied the fattening material from the domestic market and 10 enterprises (Group II) that supplied them as imports; A total of 68 enterprises were surveyed and necessary data were obtained. In addition, evaluations were made on the whole enterprises basis. For the enterprises examined; fattening material, feed, labor, veterinary-health expenses, depreciation, maintenance and repair expenses, general administrative expenses, other expenses proportional distribution in total expenses were found respectively, 49.22%, 32.98%, 8.67%, 1.40%, 1.09%, 1.44%, 2.91%, 2.29% for all enterprises; 48.83%, 32.81%, 9.16%, 1.45%, 1.09%, 1.44%, 2.91%, 2.30% in group I enterprises and 51.48%, 33.98%, 5.83%, 1.08%, 1.07%, 1.45%, 2.91%, 2.20% in group II enterprises. One kg carcass cost, one kg live weight increase cost, one kg live weight cost in the enterprises were found as; 24.20 TL, 10.59 TL, 13.03 TL in all enterprises; 24.39 TL, 10.50 TL, 12.98 TL in group I enterprises and 23.06 TL 11.08 TL, 13.36 TL in group II enterprises, respectively. As a result of the study, it was found that there was no statistically significant difference between the groups in terms of one kg carcass cost and one kg live weight costs (p>0.05). In conclusion, it is determined that there is no difference in terms of unit cost in animal fattening activities with imported and domestic origin animals.

Key words: Cattle fattening, economic analysis, production costs

Giriş

Besicilik, kasaplık hayvanlarda et kalitesinin, et ve yağ miktarının artırılmasının yanında, endüstri kalıntılarının ve çeşitli hayvan yemlerinin daha iyi bir biçimde değerlendirilmesine olanak sağlayan ve aynı za-

manda ekonomiye yeni istihdam sağlayarak katkıda bulunan bir işletme kolu olarak tanımlanmaktadır (Sakarya ve Günlü, 1996).

Kırmızı et içerdiği esansiyel aminoasitler yönüyle insanların beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Dünyada nüfus ve gelir düzeyinde yaşanan artış, hayat standartlarının yükselmesi, tüketicilerin beslenme konusunda bilinçlenmeleri sonucunda hayvansal proteinlere olan talep artmaktadır. Ülkeler bu talebi

Geliş Tarihi/Submission Date : 19.01.2019

Kabul Tarihi/Accepted Date : 30.07.2019

*Çalışma 1 Nolu yazarın yüksek lisans tezinden üretilmiş ve 11-14 Ekim 2018 tarihinde Antalya'da düzenlenen Üçüncü Ulusal Hayvancılık Ekonomisi Kongresi'nde sunulmuştur.

karşılıklı olarak için hayvansal ürünlerde üretim ve verimliliğin artırılması, fiyat ve pazar mekanizmasını geliştirici, hayvansal üretim-sanayi entegrasyonuna yönelik yapısal reformlar gibi farklı politika ve stratejiler geliştirilmektedir (GTHB HAYGEM, 2015).

Türkiye’de de artan nüfusun meydana getirdiği talep artışı ile yükselen sosyo-ekonomik refah düzeyi et üretiminin artırılmasını zorunlu kılmaktadır. Ancak, ülkemizde özellikle son yıllarda kırmızı et üretiminin yetersizliği söz konusudur. Bu kırmızı et açığı bazı dönemlerde kasaplık hayvan ve et ithalatı ile kapatılmaya çalışılmıştır. Kasaplık hayvan ve et ithalatı kısa süreli olarak üretim açığını kapatmakta ancak devamında sektörden, üretimden vazgeçmelere sebep olmakta; uzun dönemde üretim açığının artarak devam etmesine neden olmaktadır. Başka bir ifadeyle; ithalat kısa dönem et açığının kapatılmasının çözümünde etkili gibi olsa da orta ve uzun vadede sektörde olumsuz sonuçlara neden olmaktadır (Aydın ve ark., 2011a; Aydın ve ark., 2011b; Sakarya ve Aydın 2011).

Konuyla ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, İmik ve ark. (2000), sığır besiciliğinin ekonomisi üzerine Afyon ilinde yaptıkları çalışmada, maliyet unsurlarının giderler içerisindeki paylarını; besilik hayvan maliyeti %51.13, yem maliyeti %24.80, işçilik %6.72, veteriner-sağlık harcamaları %3.05, amortisman ve bakım onarım masrafları %1.13, stopaj giderleri %2.03, genel idare giderleri %1.02 ve diğer masraflar ise %9.85 olarak tespit etmişlerdir. Afyon ilinde sığır besiciliği üzerine yapılan başka bir çalışmada, girdi unsurlarının toplam giderler içerisindeki payları şu şekildedir: besilik materyal %53.60, yem giderleri %29.95, işçilik giderleri %6.25, veteriner-sağlık harcamaları %2.27, amortisman ve bakım-onarım %1.28, diğer giderler ise %6.47’dir (Çiçek, 2002). Aydın ve Sakarya (2012), Kars ve Erzurum illerinde entansif sığır besiciliği yapan işletmelerin ekonomik analizlerinin yapılması amacıyla yürüttükleri çalışmada işletmeler genelinde masraflar genel toplamı içerisinde besilik materyalin oranı %50.56, yem giderinin oranı %27.33, işçiliğin oranı %11.08, veteriner-sağlık giderlerinin oranı %1.23, bakım-onarım gideri %1.24, diğer giderler ise %6.07 olarak bildirilmiştir. Can (2015), yaptığı çalışmada besi materyali maliyeti, yem maliyetleri, işçilik giderleri, veteriner sağlık giderleri, pazarlama giderleri, amortismanlar, bakım-onarım giderleri ve diğer giderlerin toplam maliyetler içindeki paylarını sırasıyla %62.87, %23.53, %4.58, %1.80, %1.39, %1.09, %0.83 ve %3.91 olarak bulmuştur.

Bu çalışmada Konya ili Kadınhanı ve Sarayönü ilçelerinde ithalat yolu ile besi materyali temin eden işletmeler ile ülkemizdeki mevcut hayvan ırkları ile besicilik yapan işletmelerin karlılığının karşılaştırılması yapılmış, bu işletmelerin teknik ve ekonomik değerlendirilmeleri yapılarak ithal ve Türkiye orjinli hayvanlarla besi faaliyetlerinin sonuçları ortaya konulmaya çalışılmıştır.

İthal edilen besilik hayvanların Türkiye koşullarındaki besi performansları ve ithalatın besicilik sektöründeki işletmelerin karlılığına olan etkileri incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Araştırmanın materyalini, Konya ili Kadınhanı ve Sarayönü ilçeleri ve bu ilçelere bağlı köylerde sığır besiciliği yapan işletmelerden yüz yüze uygulanan anket yoluyla sağlanan veriler oluşturmuştur. İkincil veri olarak araştırma bölgesinde kamu kurum/kuruluşlarının bilgilerinden ve konu hakkında daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen literatür bilgilerinden yararlanılmıştır. Araştırmanın verilerini oluşturan anketler 2017 yılı Ekim-Aralık aylarında uygulanmış ve 2016-2017 üretim periyodu verileri esas alınmıştır.

Örneğe dahil edilecek işletmelerin belirlenmesinde tabakalı örnekleme yöntemi kullanılmıştır. Tabakalı örnekleme yöntemi için yapılan güç analizleri sonucu, gerekli örneklem genişliği seçilecek işletme sayısı için en az 58 işletme olarak belirlenmiştir (Esfahani ve Dougherty, 2018). Bu çalışmada besi materyalini ithal olarak temin eden işletmelerin sayısı 10, ülkemizdeki mevcut hayvan ırkları ile besicilik yapan işletmelerin sayısı 58 olmak üzere toplam 68 adet işletmeye anket uygulanmıştır.

İstatistik analizlerde SPSS 22 (SPSS Statistics for Windows, Version 22.0) programı kullanılmıştır. Veri analizi yapılırken iki grup arasındaki farklılıkları değerlendirmek amacıyla parametrik test ön şartlarının sağlandığı durumda “Student’s t Test”; sağlanmadığında ise “Mann Whitney-U testi” kullanılmıştır. Verilerin değerlendirilmesi sonucunda işletmelerin teknik, ekonomik ve rantabilite rasyolarına ilişkin hesaplamalar yapılmıştır. Ancak sınırlı sayıda işletme (2 ya da 3 adet işletme) yabancı sermaye kullandığı için ekonomik rantabilite hesabı yapılmamıştır. Teknik, ekonomik ve rantabilite rasyolarına ilişkin hesaplamalar için Çiçek (2002) ve Aydın (2011)’nin bildirdikleri ekonomik analiz yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular

İşletmeler, beside kullanılan materyali yerli pazardan (Türkiye menşeli) ve ithal olarak temin etme durumlarına göre iki grup olarak değerlendirilmiştir. Araştırma kapsamındaki işletmelere ait teknik bulgular Tablo 1, ekonomik değerlendirme sonuçları Tablo 2, Tablo 3, Tablo 4, ve Tablo 5 olarak, sosyo-ekonomik bulgular ise Tablo 6’da verilmiştir.

İncelenen dönemde I. grup işletmelerde 3412 baş sığır, II. grup işletmelerde 2073 baş sığır ve toplamda ise 5485 baş sığır besiye alınmıştır. İşletme başına düşen ortalama hayvan sayıları I. grup işletmeler için 58.82 adet, II. grup işletmeler için 207.3 adet, tüm işletmeler için 80.66 adettir. İşletmeler genelinde top-

Tablo 1. İncelenen işletmelere ait teknik bulgular

Besli İşletmelerinin Bazı Teknik Verileri	I. Grup	II. Grup	Ortalama
	$X_{\pm} \overline{S_{\overline{X}}}$	$X_{\pm} \overline{S_{\overline{X}}}$	$X_{\pm} \overline{S_{\overline{X}}}$
İşletme Sayısı (adet)	58	10	68
Toplam Kurulu Kapasite (baş)	9410	5990	15400
Besiye Alınan Toplam Hayvan Sayısı (baş)	3412	2073	5485
Kapasite Kullanım Oranı (%)	36.26	34.60	35.62
Besi Süresi (gün)	302.93±7.34	304.50±13.77	303.16±6.54
Besi Başı Canlı Ağırlık (kg/baş)	245±5.56	284.40±7.01	250.79±5.13
Besi Sonu Canlı Ağırlık (kg/baş)	616.47±7.68	694.50±29.27	627.94±8.43
Canlı Ağırlık Artışı (kg/baş)	371.47±8.25	410.10±32.07	377.15±8.51
Günlük CAA (g)	1 226±0.02	1 340±0.07	1 250±0.02
1 kg CAA İçin Tüketilen Kuru Madde Cinsinden Yem Miktarı (kg)	10±0.41	11.91±1.25	10.28±0.40
Sıcak Karkas Ağırlığı (kg/baş)	326.97±3.90	400.60±14.48	337.79±5.03
Karkas Randımanı (%)	53.17±0.45	56.86±1.68	53.71±0.48

I. grup: Yerli orjinli hayvan kullanan işletmeler; II. grup: İthal orjinli hayvan kullanan işletmeler

lam kurulu kapasite 15 400, I. grup işletmelerde 9 410, II. grup işletmelerde 5 990 baştır. Kapasite kullanım oranının I. grup işletmelerde %36.26, II. grup işletmelerde %34.60, toplamda ise %35.62 olduğu tespit edilmiştir.

İncelenen işletmeler için; masraf unsurları olan besi materyali, yem, işçilik, veteriner-sağlık giderleri, amortismanlar, bakım-onarım masrafları, genel idare giderleri, diğer giderlerin toplam giderler içindeki oransal dağılımı sırasıyla işletmeler genelinde % 49.22, %32.98, %8.67, %1.40, %1.09, %1.44, %2.91, %2.29; I. grup işletmelerde %48.83, %32.81, %9.16, %1.45, %1.09, %1.44, %2.91, %2.30; II. grup işletmelerde ise %51.48, %33.98, %5.83, %1.08, %1.07, %1.45, %2.91, %2.20 olarak bulunmuştur.

İncelenen işletmeler için besi sonu maliyetleri olarak

bir kg karkas maliyeti, bir kg CA artışı maliyeti ve bir kg CA maliyeti hesaplanmıştır. Bir kg CA artışı maliyeti ve bir kg CA maliyeti sırasıyla işletmeler genelinde 24.20TL (7.75\$), 10.59TL (3.40\$), 13.03TL (4.18 \$); I. grup işletmelerde 24.39TL (7.82\$), 10.50TL (3.37\$), 12.98TL (4.16\$) ve II. grup işletmelerde 23.06TL (7.40\$), 11.08TL (3.55\$), 13.36TL (4.28\$) olarak bulunmuştur.

İşletmelerin gruplar itibariyle besi materyalini ithal veya yerli orjinli hayvan tercih etmesinin bir kg karkas maliyeti ve bir kg canlı ağırlık maliyetleri bakımından $p < 0.05$ şartı sağlanamadığı için gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı anlaşılmıştır.

İşletmelerin net kar/zarar durumları her iki grup için de pozitif çıkmıştır. I. grup işletmelere ait net/kar zarar durumu işletmeler genel ortalamasının altında

Tablo 2. Girdi unsurlarının masraflar genel toplamı içindeki payları (%)

Girdi Unsurları	I. Grup	II. Grup	Genel
Besi Materyali Maliyeti	48.83	51.48	49.22
Yem Giderleri	32.81	33.98	32.98
İşçilik Giderleri	9.16	5.83	8.67
Veteriner Sağlık Giderleri	1.45	1.08	1.4
Amortismanlar	1.09	1.07	1.09
Bakım - Onarım Giderleri	1.44	1.45	1.44
Genel İdare Giderleri	2.91	2.91	2.91
Diğer Giderler	2.3	2.2	2.29

I. grup: Yerli orjinli hayvan kullanan işletmeler; II. grup: İthal orjinli hayvan kullanan işletmeler

iken II. grup işletmelerde ise işletmeler genel ortalamasının üstünde olduğu bulunmuştur. II. grup işletmelerin daha karlı olduğu tespit edilmiştir.

eğilimindedir. Üreticiler bunun sebebi olarak besilik hayvan materyali ve yem maliyetlerinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Tablo 3. İncelenen besi işletmelerinin besi sonu maliyet değerleri

Bazı İşletme Sonu Değerleri	I. Grup	II. Grup	Genel	Min/Maks.	P
	$X_{\pm} S_{\bar{X}}$	$X_{\pm} S_{\bar{X}}$	$X_{\pm} S_{\bar{X}}$		
İşletme Sayısı (N)	58	10	68		
Bir kg Karkas Maliyeti (TL)	24.39±2.93	23.06±2.85	24.20±2.93	19.45/35.11	0.121
Bir kg CA Artışı Maliyeti (TL)	10.50±2.49	11.08±3.70	10.59±2.68	7.72/21.70	
Bir kg CA Maliyeti (TL)	12.98±1.85	13.36±2.00	13.03±1.86	10.19/19.79	

I. grup: Yerli orjinli hayvan kullanan işletmeler; II. grup: İthal orjinli hayvan kullanan işletmeler

Yapılan rantabilite faktörü değerlendirmesine göre; her 100 TL'lik gayri safi hasılanın I. grup işletmeler için 3.86'sı, II. grup işletmeler için 5.13'ü ve işletmeler genelinde ise 4.04'ü saf hasıla olarak çıkmıştır. İncelenen dönemde cari faiz oranı 4.73 olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada besi sistemi olarak daha çok açık serbest dolaşimli besi sistemi (%79,31) tercih edilmiştir. Bu sistem; hayvanların bakım, besleme ve idaresi kolay olması nedeniyle daha çok tercih edilmiştir. Bunun dışında besi performansının daha iyi olması ve diğer sistemlere göre daha karlı olmasının da açık serbest dolaşimli besi sisteminin tercih edilmesinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

İşletme sahiplerinin %14.7'si sığır besiciliği ile ilgili seminer gibi eğitim faaliyetlerine katılmışlardır. I.

Tablo 4. İşletmelerin hayvan başına toplam gelir, toplam maliyet ve net kar/zarar değerleri

Parametreler	I. Grup	II. Grup	Min/Maks.	Genel
	$X_{\pm} S_{\bar{X}}$	$X_{\pm} S_{\bar{X}}$		$X_{\pm} S_{\bar{X}}$
İşletme Sayısı (N)	58	10		68
Toplam Gelir (TL/Baş)	7 250.35±131.44	9 357.04±535.75	5 833.67/ 11 798.96	7 560.16±162.84
Toplam Maliyet (TL/Baş)	6 938.97±111.44	8 820.52±455.63	5 804.55/ 11 708.81	7 215.67±140.50
Net Kar/Zarar (TL/Baş)	311.38±73.58	536.52±278.10	-779.35/ 2 809.82	344.49±74.57

I. grup: Yerli Orjinli Hayvan Kullanan İşletmeler; II. grup: İthal Orjinli Hayvan Kullanan İşletmeler

grupta iki veteriner hekim, II. grupta ise bir veteriner hekim hekimliğin yanında sığır besiciliği de yapmaktadır.

İşletme sahiplerinin %86.76'sı yılda bir defa, %10.29'u yılda iki defa, %2.94'ü yılda üç defa besi faaliyeti sürdürmektedir. Bu durum araştırma bölgesinde sığır besi faaliyetlerinin belirli dönemlerde yoğunlaşa-

İşletme sahiplerinin %41.18'i sığır besiciliğini bırakma

Tablo 5. İşletmelere ait rantabilite rasyoları ve çıktı/girdi oranı

Rantabilite Rasyoları	I. Grup	II. Grup	Genel
	$X_{\pm} S_{\bar{X}}$	$X_{\pm} S_{\bar{X}}$	$X_{\pm} S_{\bar{X}}$
Mali Rantabilite (%)	4.58±0.83	5.67±1.95	4.74±0.76
Rantabilite Faktörü (%)	3.86±0.87	5.13±2.41	4.04±0.82
Çıktı/Girdi Oranı	1.07±0.01	1.03±0.03	1.05±0.11

I. grup: Yerli orjinli hayvan kullanan işletmeler; II. grup: İthal orjinli hayvan kullanan işletmeler

Tablo 6. Kadınhanı ve Sarayönü ilçeleri sığır besi işletme sahiplerine ait bazı sosyo-ekonomik özellikleri

Özellik	İlçelerde Dağılım	I. Grup		II. Grup		Genel	
		Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)
Sığır Besiciliği İle İlgili Eğitim Durumu	Evet	7	12	3	30	10	14.70
	Hayır	51	88	7	70	58	85.30
Sığır Besiciliği Yapma Nedeni	Karlı Olduğu İçin	9	15.52	4	40	13	19.12
	Ek İş	25	43.10	4	40	29	42.65
	Başka İş Seçeneği Olmadığı İçin	24	41.38	2	20	26	38.23
Besiciliği Sürdürme Eğilimi	Bırakmayı Düşünüyor	26	44.83	2	20	28	41.18
	Bırakmayı Düşünmüyor	32	55.17	8	80	40	58.82
Tercih Edilen Besi Sistemi	Açık Serbest Dolaşım	46	79.31	6	60	52	76.47
	Açık Bağlı	0	0	0	0	0	0
	Kapalı Serbest Dolaşım	2	3.45	3	30	5	7.35
	Kapalı Bağlı	10	17.24	1	10	11	16.18
Yılda Yapılan Besi Sayısı	1	54	93.10	5	50	59	86.76
	2	3	5.17	4	40	7	10.29
	3	1	1.73	1	10	2	2.94

I. grup: Yerli orjinli hayvan kullanan işletmeler; II. grup: İthal orjinli hayvan kullanan işletmeler

rak arzın da bir dönemde artmasına ve yıl genelinde arz-talep dengesinin istenildiği şekilde sağlanamamasına neden olmaktadır. Bu şekilde işleyen bir piyasa yapısında önemli fiyat dalgalanmaları meydana gelmekte ve üreticilerin dezavantajına durumlar yaşanabilmektedir.

Tartışma ve Sonuç

Araştırma kapsamında yer alan işletmelerin çoğunluğunda sığır besiciliği, bazı tarımsal ve diğer hayvancılık faaliyetleriyle birlikte yürütülmektedir. Bu durum özellikle I. grup işletmelerde daha yoğun görülmektedir. II. grup işletmelerin büyük bir kısmında birincil iş olarak sığır besiciliği yapılmaktadır. I. grup işletmelerin çoğunluğu aile işletmesi konumundadır. Ancak II. grup işletmelerde ise daha modern ve daha bilinçli bir sığır besiciliği faaliyeti yürütülmektedir. II. grup işletmeler günümüzde makineleşmenin artmasıyla silo yem karma ve dağıtma römorku, yem kırma makinesi, genel takip için otomasyon sistemleri, canlı ağırlık artışı takibi için kantar, sağlık yönünden tırnak kesme ve ayak banyoluğu, atık yönetimi için gübre karıştırıcı, gübre seperatörü gibi makine-ekipmanlara sahip ve işletme kayıtları düzenli tutulan modern işletmelerdir.

Besi süresi işletmeler genelinde ortalama 303.16±6.54 gün olarak bulunmuştur. I. ve II. grup işletmelerde bu değer genel ortalamaya yakın olduğu görülmüştür. Besi süresi günlük canlı ağırlık artışı ve bir kg CAA için tüketilen kuru madde cinsinden yem miktarına etki etmektedir. Nitekim, yapılan bir çalışmada besi süresi uzadıkça; günlük CA artışının düştüğü, bir kg CAA için tüketilen kuru madde cinsinden yem tüketiminin arttığı bildirilmiştir (Özlütürk ve

ark., 2008). Besi süresinin uzaması neticesinde gerçekleşen geç kesimlerden dolayı çok büyük kaynak kayıpları da ortaya çıkmaktadır (Topcu, 2004). Besi devam ederken günlük besi giderinin, günlük canlı ağırlık artışı değerine eşit olduğu zaman besiyeye son verilmelidir (Sakarya ve Günlü, 1996). Tespit edilen besi süresi bazı çalışmalardan (İmik ve ark., 2000; Çiçek, 2002; Hazneci, 2007; Yücel, 2007; Aydın ve Sakarya, 2012; Can, 2015; Çelik ve Sarıözkan, 2017) yüksek bulunmuştur. Besi süresi açısından çalışmadaki işletmelerin karlı bir besicilik yapmadıkları söylenebilir.

Sığır besicilik faaliyetinde besi başı canlı ağırlığın işletmenin karlılığı üzerine önemli etkisinin bulunduğunu ve besi başı canlı ağırlık azaldıkça; işletme karlılığının arttığı yapılan bir çalışmada belirlenmiştir (Cevger ve ark., 2003). Yapılan incelemede araştırma kapsamındaki işletmelerde besi başı canlı ağırlığın genel ortalaması 250.79±5.13 kg olarak bulunmuştur. I. grup işletmeler genel ortalamaya yakın iken II. grup işletmelerde bu değer 284.4 kg'a kadar yükselmiştir. Bulunan bu besi başı canlı ağırlığı değerlerinin çalışmadaki işletmelerin karlılığına olumsuz olarak yansıdığı söylenebilir. Bulunan bu değerler Akbulut ve ark.'ın (1995) yaptığı çalışmadan düşük; yapılan bazı çalışmalardan (İmik ve ark., 2000; Çiçek, 2002; Altuntaş ve Arpacık, 2004; Aydın ve Sakarya, 2012; Can, 2015; Çelik ve Sarıözkan, 2017) ise yüksek çıkmıştır.

İşletmeler genel ortalamasında günlük canlı ağırlık artışı 1250±0.02 gr olarak tespit edilmiştir. I. grup işletmeler genel ortalamaya yakın iken II. grup işletmelerde bu değer genel ortalamadan yüksektir. Bu durum, I. grup işletmelerde kullanılan rasyon içeriği-

ni bilinçli bir şekilde hazırlanamamasından kaynaklanabileceği gibi; II. grup işletmelerin beside daha çok kültür ırkları ve melezlerini kullanmasına da bağlanabilir. Tespit edilen ortalama günlük canlı ağırlık artışı yapılan bazı araştırmalardaki (Sakarya ve Günlü, 1996; Hazneci, 2007; Aydın ve Sakarya, 2012; Çelik ve Sarıözkan, 2014; Can, 2015; Muižniece ve Kairiša, 2016) değerlerden yüksek bulunmuştur. Elde edilen bu değerler bazı çalışmalar (İmik ve ark., 2000; Çiçek, 2002; Syruček ve ark., 2017) ile benzer bulunmuştur.

Sığır besiciliğinde, genç olan hayvanların yemden yararlanma oranının daha yüksek olması ve bir kg CAA için tüketilen kuru madde cinsinden yem miktarındaki azalması sebepleriyle işletmenin de karlılığının arttığı bildirilmektedir (Tüzemen, 1995; İmik ve ark., 2000; Cevger ve ark., 2003). Araştırma kapsamına alınan işletmelerde bir kg canlı ağırlık artışı için tüketilen kuru madde cinsinden yem miktarı genel ortalaması 10.28±0.40 kg bulunmuştur. I. ve II. grup işletmelerde bu değer genel ortalamaya yakın olduğu görülmüştür. Bu değerler bazı çalışmalardan (Sakarya ve Günlü, 1996; İmik ve ark., 2000; Çiçek, 2002; Cevger ve ark., 2003; Aydın ve Sakarya, 2012; Can, 2015) yüksek olduğu tespit edilmiştir.

İşletme karlılığını doğrudan etkileyebilecek bir başka teknik özellik olan karkas randımanı sırasıyla, işletmeler genel ortalaması %53.71; I. grup işletmelerde %53.17; II. grup işletmelerde %56.86 olduğu görülmüştür. I. grup işletmelerde bu değer genel ortalama ile benzer iken II. grup işletmelerde ise genel ortalamadan yüksek çıkmıştır. Genel ortalama İmik ve ark. (2000), Gözener ve Sayılı'nın (2015) çalışmalarına benzer; Koç ve Akman (2003), Aydın ve Sakarya'nın (2012) bulduğu değerden ise düşüktür.

Araştırma kapsamındaki işletmelerde maliyeti oluşturan masraf unsurları arasında besilik materyal maliyeti ilk sırayı almaktadır. Genel ortalama %49.22 olarak bulunmuş, I. ve II. grup işletmelerin ortalaması bu genel ortalamaya yakındır. Bu değerler Çiçek (2002) ve Can (2015)'in yaptığı çalışmadan düşük, bazı çalışmaların (İmik ve ark., 2000; Yücel, 2007; Uğurtaş, 2008; Aydın ve Sakarya, 2012; Çelik ve Sarıözkan, 2014; Malole ve ark., 2014; Gözener ve Sayılı, 2015) bildirdiği değerlerden yüksektir. Diğer çalışmalardan yüksek olmasının nedeni, işletme verilerinin alındığı tarihte Türkiye kırmızı et piyasasında yaşanan fiyat dalgalanmaları, artışları ve ithalat kararlarının canlı hayvan fiyatlarında meydana getirdiği artışlar olabilir.

Masraf unsurları içerisinde ikinci en büyük pay %32.98'lik genel ortalama ile yem masraflarına aittir. I. ve II. grup işletmelerin ortalaması bu genel ortalamaya yakındır. Bu değerler bazı çalışmalardaki (İmik ve ark. 2000; Çiçek, 2002; Aydın ve Sakarya 2012; Can, 2015) değerlerden yüksektir. Bu durumun nede-

ni olarak incelenen işletmeler yem teminini kendi üretiminden çok yemi satın alarak sağlaması ve yem fiyatlarındaki (özellikle kesif yem) son dönemdeki dalgalanmalar gösterilebilir. Yine bulunan bu değerler bazı çalışmalardan (Uğurtaş, 2008; Malole ve ark., 2014) düşük iken bazı çalışmalara (Çelik ve Sarıözkan, 2014; Yücel, 2007) ise yakındır. İşletmelerin optimum sayıda besi hayvanını besiyeye almaları, silaj yem kullanımı ve yem üretimini kendilerinin yapması ile birim maliyetleri azaltmaları mümkün olabilir.

Üretim masrafları içerisinde işçilik masrafları üçüncü sıradadır. İşletmeler genel ortalaması %8.67 olarak bulunmuştur. I. grup işletmelerdeki bu değer genel ortalamaya benzer iken II. grup işletmelerde ise bu değer genel ortalamadan düşük çıkmıştır. Bunun nedeni olarak II. grup işletmeler daha modern ve teknoloji kullanımı ile besicilik yapmaları gösterilebilir. Bu durum II. grup işletmelerde işgücünün daha verimli kullanıldığını gösterir. İşçiliğin işletmeler ortalaması Aydın ve Sakarya (2012), Çelik ve Sarıözkan (2017)'in bulduğu değerlerden düşük, bazı çalışmalardaki (İmik ve ark., 2000, Çiçek, 2002, Yücel, 2007, Uğurtaş, 2008, Malole ve ark., 2014, Can, 2015) değerlerden ise yüksektir. Bu durumun nedeni olarak aile iş gücünün hesaplanmasındaki metod farklılığı ve yıllar arasındaki iş gücü maliyetlerindeki değişimlerden kaynaklandığı söylenebilir.

Aydın ve Sakarya (2012) yaptıkları çalışmada bir kg karkas, bir kg CAA, bir kg CA maliyetini sırasıyla 12.29 TL (8.09\$), 5.84 TL (3.84\$), 6.99 TL (4.60\$) olarak bulmuşlardır. Köknaroğlu ve ark. (2006)'ın yaptıkları çalışmada bu değerler; 7.64 TL (5.64\$), 4.73 TL (3.49\$) ve 4.35 TL (3.21\$) olarak çıkmıştır. Gözener ve Sayılı 2015 yılında yaptıkları çalışmada yerli, melez ve kültür ırkında sırasıyla bir kg CA maliyeti, 8.23 TL (4.44\$), 7.02 TL (3.79\$) ve 5.47 TL (2.95\$); bir kg CA artış maliyeti, 4.26 TL (2.30\$) ile en yüksek düzeyde yerli ırk, 3.15 TL (1.70\$) ile de en düşük düzeyde kültür ırkı hayvanlara ait olduğunu bildirmişlerdir.

İşletmelerin karlılık durumları değerlendirildiğinde, II. grup işletmelerin daha bilinçli, daha modern ve teknoloji kullanımı ile besicilik yapmaları ya da birinci öncelikli yaptıkları işin besicilik olması nedeniyle daha karlı oldukları söylenebilir.

İşletmelere ait rantabilite rasyoları ile çıktı-girdi oranları değerlendirildiğinde işletmelerin cari faiz oranının altında ya da cari faiz oranına çok yakın bir kar elde ettikleri belirlenmiştir. Bu şartlar altında sığır besiciliğinin çok karlı olmadığı, sermayenin alternatif maliyeti göz önüne alındığında alternatif maliyetin altında bir gelir elde edildiğini söylemek mümkündür.

Yapılan sosyo-ekonomik incelemeler neticesinde, I. grup işletme sahiplerinin %50'sinin ilköğretim mezunu II. grup işletme sahiplerinin ise %40'ının lise ve üniversi-

te mezunu olduğu; yani iki grup arasında eğitim düzeyi yönünden farklılık olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bazı araştırmalar sonucunda işletme sahiplerinin eğitim düzeyi yükseldikçe işletmelerin; kültür ırkı hayvan temini, besi süresi, besi şekli, hayvanların günlük canlı ağırlık artışı ve işletme net karı gibi konularda daha etkili ve verimli olduğu tespit edilmiştir (Eren, 2006; Köknaroglu ve ark., 2007).

İşletme sahiplerinin büyük bir kısmı sığır besiciliğini ek iş olarak yapmaktadırlar. Yapılan bir çalışmada, işletme sahiplerinin besicilik dışında ek iş yapmalarının bu iş koluna yeterli emek ve zaman harcamalarına engel olduğu için elde edilen net karın olumsuz yönde etkilendiğini bildirmişlerdir (Çelik ve Sarıözkan, 2017). Aynı çalışmadaki işletme sahiplerinin az bir kısmı ise karlı bir iş olduğu için sığır besiciliği yaptıklarını bildirmişlerdir.

İşletme sahipleri ile yapılan anketler neticesinde sığır besiciliği ile ilgili tespit edilen bazı sorunlar ve bunların çözümüne ilişkin öneriler şöyledir:

Kasaplık hayvan tedarikinde ve pazarlanmasında aracılardan piyasa bozması ve piyasadaki oligopsonik yapı üreticiler aleyhine işlemekte ve istikrarsızlığa neden olmaktadır. Bu sorun gerek girdi tedarikinde gerekse besi sonu hayvanların/kesime sevk edilmesinde üretici maliyetlerinden bağımsız tek yanlı bir fiyat oluşmasına neden olmaktadır. Bu durum üreticilerin kazancının düşmesine, tüketicinin ise daha pahalıya ürün almasına yol açmaktadır. Üretici ve tüketici refahını olumsuz etkilemektedir. Bu anlamda hem aracı sayısının hem de aracı marjlarını azaltıcı tedbirler alınması gerekmektedir. Kasaplık hayvan ve et ticareti konusunda ülke içerisinde üreticiden tüketiciye kadar olan zincirde hem üreticiyi hem de tüketiciyi koruyacak önlemler alınmalıdır. Bu önlemler hayvansal ürünlerde üretim ve verimliliğin artırılması, üretim maliyetlerinin düşürülmesi ve pazarlama zincirinin kısaltılarak verimliliğin yükseltilmesi, üretimde kalite ve sağlık koşullarını iyileştirici, fiyat ve pazar mekanizmasını geliştirici tedbirler olabilir.

Sığır besiciliğinde en önemli girdi unsurlarından olan yem giderlerinin yüksek oluşu da üreticilerin karlılığını etkileyen önemli bir faktördür. Besiciler için yem maliyetinin önemli ölçüde azaltılması büyük önem arz etmektedir. Bu bakımdan yem bitkisi üretimine yönelik desteklerin artarak devam etmesi, mera ıslah çalışmalarına hız verilmesi ve meraların korunması üzerine birtakım tedbirlerin alınmasının besiciler için faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Süt sığırcılığının dönemsel olarak karlı olmaması nedeniyle yaşanan sorunlar ve buna bağlı zaman zaman ortaya çıkan damızlık hayvan kesimleri de besicilik için önemli sorunlardan biridir. Süt ve kırmızı et alt sektörleri birbirinin rakibi veya alternatifi değil bütünleyicisidir. Süt fiyatlarındaki dalgalanmaların ve

inek sütü ile sığır eti üretiminin birbirlerini olumsuz etkilemesinin önüne geçecek yeni stratejilerin ortaya konulması gerekmektedir. Ayrıca süt sığırcılığının çıktısı olan erkek buzağlar sığır besiciliğinin girdisi olması nedeniyle buzağı ölümlerinin azaltılması için gerekli tedbirler kısmen alınmış olsa da bu tedbirlerin artırılması ve geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmalıdır.

Bulaşıcı hayvan hastalıkları da sığır besiciliğinde karlılığı etkilemektedir. Hayvan hastalıkları ile mücadele ve eradikasyon çalışmalarında uygulanan yöntemler ve stratejiler geliştirilmelidir. Ülke içi ve dışı hayvan hareketleri denetimleri daha yeterli ve etkili hale getirilmelidir. Bu konuda özellikle celeplere ciddi yaptırımlar uygulanmalıdır. Çünkü hastalık çıkışı yapılan bölgelerden veteriner sağlık raporu almadan hayvan satışı yaparak bulaşıcı hayvan hastalıklarının yayılmasına sebebiyet vermektedirler. Bulaşıcı hayvan hastalıklarının mücadelesinde uygulanan aşılama kampanyaları ile üreticilerin eğitim, seminer gibi faaliyetlerle bilinçlenmeleri sağlanmalıdır.

Yapılan çalışmada hayvancılık desteklemeleri için üreticiler her ne kadar olumsuz bir görüş bildirmeseler de aslında desteklemeler tam anlamıyla istenilen amaca hizmet etmemektedir. Hayvancılık desteklemeleri üretimi teşvikten daha çok bulaşıcı hayvan hastalıklarının aşılmasının yaptırılması, hayvan hareketlerinin kontrolü gibi bazı uygulamalar için aracı olarak kullanılmaktadır. Desteklemelerin üreticilerin taleplerini ve ihtiyaçlarını karşılayacak düzeyde, üretimi daha çok teşvik edici olmasına özen gösterilerek geliştirme çalışmaları yapılmalıdır. Özellikle desteklemeler ve bir takım politikalar üretim sürecinde üreticilerin aleyhine işleyecek bir hale dönüştürülmemeli ve besi başlangıcında mevcut şartlara göre kendini hazırlayan üreticilerin ekonomik faaliyetini olumsuz etkileyecek girişimlerden uzak durulmalıdır.

Kasaplık hayvan ve et ithalatı kırmızı et üretiminde istenmeyen yanları ile sıkça tartışılmaktadır. Yapılan ithalat ve uygulama süresindeki belirsizlik, fiyatların düşeceği tedirginliğini oluşturarak besicilerin ellerindeki kesim olgunluğuna ulaşmamış hayvanlarını kesime göndermelerine neden olabilmektedir. Hatta bazı üreticiler işletmelerindeki bütün hayvanlarını elden çıkararak sektörü bırakma kararı alabilmektedir. İthalat başlangıçta et arzının artmasını ve et fiyatlarının düşmesini sağlayabilmektedir. Ancak orta ve uzun vadede kesim olgunluğuna ulaşmamış hayvanların kesilmesi, bazı üreticilerin sektörü bırakması, fiyat istikrarsızlıklarının oluşması, bulaşıcı hastalık tehlikesi gibi ciddi sorunlara yol açmakta ve kırmızı et üretiminde tamamen dış bağımlılığa neden olabilmektedir (Aydın ve ark., 2011a; Sakarya ve Aydın, 2011; Aydın ve ark., 2011b). Kasaplık hayvan ve et ithalatının önüne geçilmesi ya da kademeli olarak ithalatın sonlandırılması için ülke içinde kasaplık hayvan üretimi ve canlı hayvan stokunun artırılarak, kırmızı et piya-

şasında arz talep dengesi sağlanarak gerçekleştirilebilir (Kırmızı Et Sektörü Komisyonu, 2011). İthalat bu amacın gerçekleştirilmesinin bir aracı olarak görülmemiştir.

Sonuç olarak, yerli orijinli ve ithal besi materyali kullanan işletmelerin maliyeti oluşturan masraf unsurlarında, bir kg CA maliyeti ve bir kg karkas maliyetinde önemli bir farklılık tespit edilememiştir. Bu iki grup işletmenin gelirleri ve karları arasında az miktar farklılık bulunsa da; bu durum ithal besi materyali ile besicilik yapan işletmeler diğer gruba göre daha bilinçli, teknolojiyi kullanabilen, daha modern işletmecilik anlayışında olmalarından kaynaklanabilir. Kasaplık hayvan ve et ithalatı, sektördeki sorunların çözümü için her ne kadar önerilmese de alınan kararlarla bazı dönemlerde gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmanın sonuçları ithalat konusunda karar vericilere ve sektördeki üreticilere yol gösterici olması bakımından önemlidir.

Teşekkür

Çalışmanın gerçekleştirilmesindeki katkılarından dolayı Dr. Öğretim Üyesi M. Bahadır Çevrimli'ye teşekkürlerimizi sunarız.

Kaynaklar

- Akbulut Ö, Tüzemen N, Aydın R, Eşmer ve Siyah-Alaca tosunların açık ahırlarda besi performansı ve karkas özellikleri. *Tübitak Doğa-Vet Hay Derg* 1995; 19(1): 409-16.
- Altuntaş M, Arpacık R. Farklı yaşlarda besiye alınan Simental tosunların besi performansı ve optimum kesim ağırlıkları. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg* 2004; 44(1): 7-16.
- Aydın E. Kars ve Erzurum illeri sığır besi işletmelerinin ekonomik analizi, Doktora tezi, Ankara Üniv Sağ Bil Ens, Ankara 2011; ss. 72-82.
- Aydın E, Can MF, Aral Y, Cevger Y, Sakarya E. Türkiye'de canlı hayvan ve kırmızı et ithalatı kararlarının sığır besicileri üzerine etkileri. *AB Uyum Sürecinde Türkiye Hayvancılık Kongresi*, 20-22 Ekim 2011a; 733-44, Ankara-Türkiye.
- Aydın E, Can MF, Aral Y, Cevger Y, Sakarya E, İşbilir S. Türkiye'de son 25 yılda kırmızı et fiyatlarındaki değişimler ve ithalat kararlarının etkilerinin analizi. *Vet Hekim Der Derg* 2011b; 82(1): 3-13.
- Aydın E, Sakarya E. Kars ve Erzurum illeri entansif sığır besi işletmelerinin ekonomik analizi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 2012; 18(6): 997-1005.
- Can MF. Ankara ili merkez ilçelerindeki sığır besi işletmelerinin ekonomik analizi. *Eurasian J Vet Sci* 2015; 31(2): 87-94.
- Cevger Y, Güler H, Sarıözkan S, Çiçek H. The effect of initial live weight on technical and economic performance in cattle fattening. *Turk J Vet Anim Sci* 2003; 27(5), 1167-71.
- Çelik C, Sarıözkan S. Kırşehir ili merkez ilçede sığır besiciliği yapan işletmelerin ekonomik analizi. *Haran Üniv Vet Fak Derg* 2017; 6(1): 38-45.
- Çiçek H. Afyon ili sığır besiciliği işletmelerinde karlılık ve verimlilik analizleri. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg* 2003; 43(2):1-13.
- Eren E. Kahramanmaraş ili Göksun ilçesinde sığır besiciliği yapan işletmelerin yapısı ve sorunları, Yüksek lisans tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv Fen Bil Enst, Kahramanmaraş 2006; s. 27
- Esfahani MS, Dougherty ER. Effect of separate sampling on classification accuracy. *Bioinformatics* 2014; 30(2):242-50.
- Gözener B, Sayılı M. Tokat ili Turhal ilçesinde sığır besiciliğinde üretim maliyeti ve canlı ağırlık artışına etki eden faktörler. *Tar Bil Derg* 2015; 21(2) 288-99.
- Hazneci K. Amasya ili Suluova ilçesinde sığır besiciliği yapan işletmelerin etkinlik analizi, Yüksek lisans tezi, On dokuz Mayıs Üniv Fen Bil Enst, Samsun 2007; s. 84.
- İmik H, Günlü A, Tekerli M, Koçak S. Afyon ilinde yapılan sığır besiciliğinin ekonomik analizi ve karlı bir besicilik için alınması gerekli önlemler. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg* 2000; 40(2): 1-15.
- Kırmızı Et Sektörü Komisyonu. Kırmızı et sektörü komisyonu çalışma sonuç raporu, AB Uyum Sürecinde Türkiye Hayvancılık Kongresi. 20-22 Ekim 2011; Ankara-Türkiye.
- Koç A, Akman N. Farklı ağırlıklarda besiye alınan ithal edilmiş siyah-alaca tosunların besi gücü ve karkas özellikleri. *Hayvansal Üretim* 2003; 44(1): 26-36.
- Köknaoroğlu H, Demircan V, Yılmaz H, Dernek Z. Besi sığırıcılığı üretim faaliyetinde üreticilerin eğitim düzeylerinin besi performansı ve karlılığa etkisi. *V. Ulusal Zootekni Kongresi*. Eylül, 5-8, 2007; Van-Türkiye.
- Köknaoroğlu H, Yılmaz H, Demircan V. Afyon ili besi sığırıcılığı işletmelerinde kesif yem oranının besi performansı karlılığa etkisi. *Süleyman Demirel Üniv. Ziraat Fak Derg* 2006; 1(1): 41-51.
- Malole JL, Kadigi RJM, Sangeda AZ. Costs and benefits of beef cattle fattening schemes in some selected areas of north west Tanzania. *IJAS* 2014; 4(4): 699-706.

- Muižniece I, Kairiša D. Different beef breed cattle fattening results analysis. *Agricultural Sciences (Crop Sciences, Animal Sciences)* 2016; (1): 27-62.
- Özlütürk A, Esenbuğa N, Yanar M, Ünlü N, Macit M, Kopuzlu S. The effect of duration of finishing period on the performance, slaughter, carcass, and beef quality characteristics of Eastern Anatolian Red Bulls. *Turk J Vet Anim Sci* 2008; 32(6): 441-8.
- Sakarya E, Günlü A. Limuzin x Jersey (F1) melezi ve Holştayn ırkı tosunlarda optimal besi süresinin tespiti üzerine bir araştırma. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1996; 43(1): 113-20.
- Sakarya E, Aydın E. Türkiye'nin canlı hayvan ve sığır eti ithalatı. *ATB Yayın Organı, Borsa Vizyon Dergisi* 2011.
- Syrůček J, Kvapilík J, Bartoň L, Vacek M, Stádník L. Economic efficiency of bull fattening operations in the Czech Republic. *Acta Unive Agric Silvic Mendel Brun*, 2017; 65(2): 527-36.
- T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (GTHB) HAYGEM. Kırmızı Et Stratejisi. Ankara, 2015; 55-64.
- Topcu Y. Erzurum ili sığır besiciliği işletmelerinde girdi kullanımı ve üretim maliyeti üzerine bir araştırma. *Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg* 2004; 35(1-2): 65-73.
- Tüzemen N. Farklı yaş ve farklı barındırma sistemlerinde esmer ırkı tosunların besi performansları. *Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg* 1995; 26(1): 9-20.
- Uğurtaş FT. Konya ili Beyşehir ilçesi Doğanbey beldesinde sığır besiciliğine yer veren tarım işletmelerinin ekonomik analizi, Yüksek lisans tezi, Atatürk Üniv Fen Bil Enst, Erzurum 2008; ss. 58-61.
- Yücel S. Ankara ili tarım işletmelerinde sığır besiciliği üretim faaliyetlerinin teknik ve mali analizi, Yüksek lisans tezi, Ankara Üniv Fen Bil Enst, Ankara 2007; 24-34.



ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

Araştırma Makalesi / Research Article
17(1), 10-21, 2020
DOI: 10.32707/ercivet.687724

Aydın/Bozdoğan Yöresinde Yetiştirilen Gökkuşuğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Paraziter Yaygınlığının Araştırılması (*)(**)

Emrah ŞİMŞEK¹, Osman Selçuk ALDEMİR²

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

²Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Emrah ŞİMŞEK; E-posta: emrahsimsek@erciyes.edu.tr ORCID: 0000-0002-0492-9840

Atf yapmak için: Şimşek E, Aldemir OS. Aydın/Bozdoğan yöresinde yetiştirilen gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) paraziter yaygınlığının araştırılması. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020; 17(1):10-21.

Özet: Çalışma, Aydın/Bozdoğan İlçesi sınırları içinde, Akçay üzerinde kurulu olan Kemer Barajı (37° 30' Kuzey enlemi 28° 35' Doğu boylamı)'ndaki kafeslerde ve Akçay üzerindeki havuzlarda yetiştiriciliği yapılan gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) paraziter yaygınlığı belirlemek amacıyla Eylül 2013-Ağustos 2014 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. İncelenen 348 balıktan 153'ünün (%44) çeşitli metazoon ve protozoonlarla enfekte olduğu saptanmıştır. Enfeksiyon saptanan balıkların; 118'i (%33.9) *Trichodina fultoni*, 19'u (%5.4) *Ichthyophthirius multifiliis*, 5'i (%1.4) *Apiosoma* sp., 4'ü (%1.1) *Lernaea* sp., olmak üzere tek türle enfekte iken, 7'sinde (%2) ise *T. fultoni* + *I. multifiliis* (%1.4) ve *T. fultoni* + *Apiosoma* sp. (%0.6)'den kaynaklanan miks enfeksiyon tespit edilmiştir. Bulunan parazitlerin enfeksiyon oluşturmada etkili olduğu düşünülen bazı parametrelerin etki paylarının belirlenmesi amacıyla lojistik regresyon analizi yapılmıştır. Buna göre, kış mevsiminde enfeksiyon görülme oranının yaza göre 0.41 kat daha az olduğu ortaya konmuştur. Su sıcaklığındaki bir birimlik (°C) artış enfeksiyonun odds oranını (OR) 1.116 kat artırırken, çözülmüş oksijen miktarındaki bir birimlik artışın (O₂ mg/L) ise 0.842 kat azalttığı görülmüştür. Yine aynı şekilde balık boylarındaki bir birimlik (cm) artış enfeksiyonun odds oranını (OR) 0.88 kat azaltırken, ağırlıktaki bir birimlik (g) artış ise 0.99 kat azalttığı görülmüştür. Sonuç olarak çalışma boyunca incelenen balıklarda %44 gibi yüksek bir enfeksiyon oranı belirlenmiş olup, tespit edilen parazitler arasında baskın türün *T. fultoni* olduğu görülmüştür. Özellikle su sıcaklığının arttığı dönemlerde, stok yoğunluğunun fazla olması, suyun yem artıkları ve ölü balıklarla kirlenmesi su kalitesinin bozulmasına sebep olmaktadır. Bu gibi stres faktörlerinin, paraziter enfeksiyonların görülme sıklıklarının artmasında etkili olabileceği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Gökkuşuğu alabalığı, *Ichthyophthirius multifiliis*, *Lernaea* sp., *Trichodina fultoni*

The Investigation of Parasite Prevalence of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Reared in Aydın/Bozdoğan Province

Summary: This study was carried out to investigate the parasite prevalence on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) which were raised in cage in Kemer Dam Lake built on Akçay River and pools located on the river between September, 2013 and August, 2014. The cage and pools are located between 37° 30' northern 28° 35' eastern longitudes, in Bozdoğan/Aydın, in western Turkey. One hundred fifty three (44%) fish were detected as positive various protozoans and metazoans at a total of 348 fishes. The number of cases and their percentages values in parenthesis in case of infection with one species are as follows: 118 (33.9%) *T. fultoni*, 19 (5.4%) *I. multifiliis*, 5 (1.4%) *Apiosoma* sp., 4 (1.1%) *Lernaea* sp. Seven of the 153 fishes (2%) were infected with mixed infection of *T. fultoni* + *I. multifiliis* (1.4%) and *T. fultoni* + *Apiosoma* sp. (0.6%). The logistic regression analysis was done in order to determine the effect share of the parameters which were supposed to have a role in the occurrence of the infection. The analyses indicated that the rate of infection in winter was 0.41 times less than it was in summer. An increase of one unite in water temperature result an 1.116 fold increase in infection odd ratio (OR), while 0.842 fold decrease was observed in response to one unite increase in dissolved oxygen amount (O₂ mg/L). Likewise, an increase of one unite in fish length (cm), induced 0.88 fold decrease in infection odd ratio (OR), while an increase of one unite in fish weight (g) caused 0.99 fold reduction in infection odd ratio (OR). Consequently, high infection rate was detected as 44% and the dominant species among the parasites was observed as *T. fultoni*. Especially, when the water temperature increase; high stock density and contamination of water with feed residues/dead fish cause water quality to decrease. It was determined that such stress factors may be effective in increasing the prevalence of parasitic infections.

Key words: *Ichthyophthirius multifiliis*, *Lernaea* sp., rainbow trout, *Trichodina fultoni*

Geliş Tarihi/Submission Date : 06.05.2019

Kabul Tarihi/Accepted Date : 06.08.2019

*Bu çalışma, 5-9 Ekim 2015 tarihlerinde Erzurum'da düzenlenen 19. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Uluslararası Katılımlı Ekinokokkozis Sempozyumu'nda sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

**Bu çalışma, aynı başlıklı Doktora tezinden özetlenmiş olup VTF 14012 kodlu tez projesi kapsamında Adnan Menderes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

Giriş

Tatlı sularda ve kısmen de denizlerde yetiştiriciliği yapılan en önemli balık türlerinden birisi gökkuşuğu alabalığıdır (*Oncorhynchus mykiss*). Bu tür, gözlü

yumurta naklinin kolaylığı, kuluçka süresinin kısa ve hastalıklara karşı dirençli olması nedeniyle dünyanın birçok bölgesine yayılmış olup yetiştiricilikte sıklıkla tercih edilmektedir (Emre, 2004). Yüksek adaptasyon yeteneğine rağmen yetiştiricilik ortamında, doğal koşullardan farklı olarak gelişen bir takım olumsuzluklar sonucu ciddi kayıplar yaşanabilmektedir. Kötü su kalitesi, yetersiz su değişimi, stok yoğunluğunun fazla olması, yetersiz/fazla besleme ve stres gibi faktörlere bağlı oluşan hastalıklar kayıpların başlıca sebepleri arasında yer almaktadır (Pillay, 1992; Öge, 1999; Scholz, 1999). Bu sektörde ürün kaybının en aza indirilebilmesi için hastalık oluşturan etkenlerin bilinmesi ve mücadele çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Hastalık etkenlerinin önemli bir bölümünü oluşturan parazitler, balıklarda meydana getirdikleri patojenite sonucu ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Bu kayıplar, yalnızca ölümlerle ilişkili değildir. Hayatta kalan bireylerde gözlenen kondisyon kayıplarının da etkisinin büyük olduğu belirtilmektedir. Konak üreme sisteminde meydana getirdikleri hasarlar sonucunda yeni nesillerin devamlılığı da etkilenmekte ve büyük ekonomik kayıplar yaşanabilmektedir. Aynı zamanda hastalık etkenlerinin oluşturdukları lezyonlara bağlı olarak da balığın kısmi kullanımı söz konusu olmaktadır. Tüm bunların yanı sıra bazı parazitlerin insanlarda enfeksiyon oluşturabilmesinden dolayı zoonotik önemleri de gündeme gelmektedir (Öge, 1999).

Balık parazitleri içinde protozoonlar, monogenea alt sınıfına ait parazitler ve bazı crustacealar büyük yer kaplamaktadırlar. Protozoonlar arasında en yaygın olarak *Trichodina*, *Ichthyophthirius*, *Epistylis*, *Apiosoma*, *Scyphidia*, *Oodinium* ve *Chilodonella* cinslerine ait türlere rastlanmaktadır. Bu türler sıklıkla konağının deri ve solungaçlarına yerleşim göstermektedirler (Tonguthai, 1997). Copepodlar, crustacealar içinde en yaygın olan patojen parazitler olup, konakta oluşturdukları lezyonların yanı sıra açtıkları yaralardan sekonder bakteriyel enfeksiyon girişine zemin hazırlamaktadırlar (Tonguthai, 1997). *Dactylogyrus* ve *Gyrodactylus* gibi deri ve yüzgeçlere yerleşen monogenea cinlerine ait türlerin birçoğu direk yaşam siklusuna sahip olup, genellikle konak spesifiktirler. Konağın solungaç dokularında sayılarının arttığı durumlarda, şiddetli hasara sebep olarak solunumu olumsuz etkileyebilmektedirler (Tonguthai, 1997; Buchmann ve Bresciani, 2006). Trematodlar endoparazitik helmintler olup, bir veya daha fazla ara konak kullanan heteroxene parazitlerdir (Berra ve Au, 1978). Birçok erişkin trematod balıkların sindirim sisteminde parazitlenmekte ve genellikle konak spesifik özellik göstermektedir. Trematod enfeksiyonlarında asıl patojenik etki metaserker döneminde meydana gelmektedir. Metaserkerler erişkinlere göre daha az konak spesifik olup, son konak olan evcil hayvanlar ve insanlarda enfeksiyon oluşturmaktadırlar (Tonguthai, 1997; Paperna ve Dzikowski, 2006). Cestodlar, endoparazitik

helmintler olup heteroxene parazitlerdir. Balıklar son konak, paratenik konak ya da ara konak olabilmektedirler. Erişkin cestodlar sindirim sistemi kanalında bulunurken diğer gelişim dönemleri farklı organlara yerleşebilmektedir (Dick ve ark., 2006).

Parazitlerin balıklardaki enfeksiyon oranları; yaşam sikluslarına ve siklusa ara konak bulunup bulunmamasına, yaşadığı ortamın ekolojik özelliklerine, balıkların beslenme alışkanlıklarına, yaşlarına, boylarına, endo ve ektoparazit olarak yaşayan başka bir parazit ile enfekte olup olmamalarına göre değişiklik göstermektedir (Saygı, 1999). Tüm bunlar dikkate alındığında, parazitlerin olumsuz etkilerini azaltabilmek ve ekonomik kayıpları minimuma düşürebilmek için parazitlerin; türlerinin, konaklarının, yaşam sikluslarının, mevsimsel dağılım ve enfeksiyon oranlarının, yaş ve cinsiyete bağlı etkilerinin belirlenmesi önem arz etmektedir.

Dünyanın farklı coğrafik bölgelerinde yoğun bir şekilde yetiştiriciliği yapılan gökkuşluğu alabalıklarında yürütülen çalışmalarda birçok metazoon ve protozoon türü tespit edilmiştir (Moravec, 2004; Saghari Fard ve ark., 2007; Atkinson ve Bartholomew, 2010; Skovgaard ve Buchmann, 2011; Rubio-Godoy ve ark., 2012). Türkiye'deki veriler değerlendirildiğinde ise çalışmaların daha çok ektoparazit protozoonlar üzerine olduğu, tüm parazitler faunayı belirlemeye, mevsimsel dağılımlarını ortaya koymaya ve enfeksiyon oluşumunda etkili parametrelerin etki paylarının belirlenmesine yönelik çalışmalara çok fazla rastlanamamıştır (Ögüt ve Akyol, 2007; Altunay ve Yavuzcan Yıldız, 2008; Balta ve ark., 2008; Özer ve ark., 2010; Balta ve Balta, 2017). Gökkuşluğu alabalıklarının metazoon parazit varlığı ve dağılımları hakkında sınırlı sayıda veri bulunmaktadır (Burgu ve ark., 1988; Sağlam, 2013; Avsever ve ark., 2016; Çevrimel ve Soylu, 2017; Balta ve Balta, 2018b). Metazoon parazit faunası ve mevsimsel dağılımları üzerine detaylı bir çalışma ise Pekmezci (2010) tarafından yapılmıştır.

Bu çalışmada, Aydın/Bozdoğan yöresinde yoğun bir şekilde yetiştiriciliği yapılan gökkuşluğu alabalıklarında enfeksiyon oluşturan parazit türlerinin ve bunların aylara-mevsimplere göre dağılımlarının belirlenmesi, balık boy ve ağırlıklarının, su sıcaklığının, çözünmüş oksijen miktarının ve pH'nın enfeksiyon oluşumundaki olası etkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Araştırma sahası

Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanan (No:64583101/2013/055) bu çalışma, Eylül 2013-Ağustos 2014 tarihleri arasında Aydın İli Bozdoğan İlçesi sınırları içerisinde yer alan Kemer Barajı (37° 30' Kuzey enlemi 28° 35' Doğu boylamı) ve Akçay üzerinde bulunan gökkuşluğu alabalığı işletmelerinde

Tablo 1. 4 cm²lik alandan alınan kazıntıda tespit edilen parazitlerin enfeksiyon düzeylerine karşılık gelen enfeksiyon dereceleri

Enfeksiyon Düzeylerinin Tanımlanması		Derecesi
Enfeksiyon yok	0 parazit	0
Düşük	1-10 parazit	1
Orta	11-30 parazit	2
Yüksek	31-75 parazit	3
Çok yüksek	75< parazit	4

yürütülmüştür. Çalışma süresince iki adet havuz işletmesi 12 ay boyunca düzenli olarak ziyaret edilerek her işletmeden aylık 12'şer adet balık numunesi olacak şekilde rastgele örneklem yapılmıştır. Barajdaki kafes işletmelerinde ise su sıcaklığına bağlı olarak yalnızca Aralık-Nisan ayları arasında üretim yapılabilmektedir. Bu sebeple kafes işletmesi toplam 5 ay boyunca ziyaret edilmiş ve aylık 12'şer balık örneklenmiştir. Çalışma süresince havuz işletmelerinden 288, kafes işletmesinden ise 60 adet balık olmak üzere toplam 348 adet balık parazitolojik yönden incelenmiştir. Balıkların alındığı kafes veya havuzların sıcaklık (°C), pH ve oksijen değerleri (O₂ mg/L) her ay dijital aletlerle (HANNA HI 9124 portable waterproof pH meters, HANNA HI 9142 portable waterproof dissolved oxygen meter) ölçülerek kaydedilmiştir.

Balıkların laboratuvara taşınması ve parazitler muayene

Balıklar havuz veya kafeslerden kepçe yardımıyla yakalanarak içerisinde ortam suyu bulunan taşıma kaplarıyla Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına canlı olarak getirilmiştir. Parazitler yönden incelemeye başlamadan önce balıkların boyları ve ağırlıkları ölçülerek kaydedilmiştir. Ardından balıklar çıplak gözle ve stereo mikroskop altında incelenerek makroskopik muayeneleri tamamlanmış, varsa ektoparazitlerin veya lezyonların fotoğrafları çekilmiştir. Daha sonra ilgili literatürlere göre balıkların rutin parazitolojik muayeneleri ve nekropsileri gerçekleştirilmiştir (Lom ve Dyková, 1992; Buchmann ve Bresciani, 1997; Erer,

ark., 2013) ilgili literatürlere göre yapılmıştır.

Parazitlerin enfeksiyon/enfestasyon oranı (%) ve yoğunluğunun (adet) hesaplanması Bush ve ark (1997)'nin, enfeksiyon derecelerinin belirlenmesi ise Rintamiiki-Kinnunen ve Valtonen, (1997), Schisler ve ark., (1999), Jorgensen ve ark., (2009)'nin belirttiği şekilde yapılmıştır (Tablo 1).

İstatistik analizler

Su sıcaklığı (°C), sudaki çözünmüş oksijen miktarı (O₂ mg/L), pH, balık boy ve ağırlığının, enfeksiyon pozitif ve negatif gruplardaki farklılığının istatistik önem kontrolü Student T-testi ile; mevsimin enfeksiyon görülme oranı üzerine etkisinin istatistik önem kontrolü Ki-kare testi ile yapılmıştır. Enfeksiyon görülme olasılığı üzerine etkili olduğu düşünülen bazı parametrelerin (mevsim, su sıcaklığı, suda çözünmüş oksijen miktarı, pH, balık boy ve ağırlığı) etki paylarının belirlenmesi amacıyla da tek değişkenli lojistik regresyon analizi yapılmıştır. İstatistik analizlerde, SPSS 14:01 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılmıştır.

Bulgular

Aydın'ın Bozdoğan İlçesinde bulunan karasal işletmelerdeki havuzlardan ve Kemer Barajı'ndaki kafes işletmesinden farklı boy ve ağırlıkta toplam 348 adet gökkuşluğu alabalığı örneklenerek parazitler açısından incelenmiştir. İncelenen balıkların ortalama boy ve ağırlıkları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Karasal ve baraj işletmelerinden alınan balıkların boy (cm) ve ağırlıkları (g)

	Balık			
	N	Minimum	Maksimum	$\bar{X} \pm S$
Boy	348	15	36	24.12±4.86
Ağırlık	348	33	437	185.50±92.66

N: Toplam incelenen balık sayısı $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$: Ortalama \pm Standart hata

2002; Buchmann, 2007). Tespit edilen parazitlerin morfolojik tanımlamaları ve ölçümlerini gerçekleştirebilmek için fotoğraf ataçmanlı (Olympus DP70) araştırma mikroskobu (Olympus BX61WI marka) kullanılmış ve teşhisleri (Lom ve Hoffman, 1964; Lom ve Dyková, 1992; Buchmann, 2007; Maceda Veiga ve

Enfeksiyonların seyirinde önemli olan su sıcaklığı (°C), sudaki çözünmüş oksijen miktarı (O₂ mg/L) ve pH değerleri de düzenli olarak ölçülerek kaydedilmiştir. Çiftliklerde ölçülen en yüksek su sıcaklığı Eylül 2013'te 25.1°C olarak, en düşük su sıcaklığı ise Ocak 2014'te 9.6°C olarak belirlenmiştir. Sudaki en yüksek

Tablo 3. Genel enfeksiyon oranının mevsimsel dağılımı

Mevsimler	Enfeksiyon				İncelenen Balık Sayı
	Pozitif		Negatif		
	Sayı	%	Sayı	%	
Sonbahar	39	54.2	33	45.8	72
Kış	34	31.5	74	68.5	108
İlkbahar	42	43.8	54	56.8	96
Yaz	38	52.8	34	47.2	72
Toplam	153	44	195	56	348

Tablo 4. Balıkların boy (cm) ve ağırlıklarının (g), genel enfeksiyon pozitif ve negatif gruplardaki farklılıkları

	Enfeksiyon				İstatistik Önem Kontrolü (Student T test)
	Pozitif		Negatif		
	N	$\bar{X} \pm S_x$	N	$\bar{X} \pm S_x$	
Boy	153	22.61±0.35	195	25.31±0.35	P<0.01
Ağırlık	153	142.76±0.62	195	219.03±0.64	P<0.01

N: Balık sayısı $\bar{X} \pm S_x$: Ortalama ± Standart hata

Tablo 5. Kafes ve havuzlardaki su sıcaklığının (°C), çözülmüş oksijen miktarının (O₂ mg/L) ve pH değerinin, genel enfeksiyon pozitif ve negatif gruplardaki farklılıkları

Kafes ve Havuzlar	Enfeksiyon				İstatistik Önem Kontrolü (Student T test)
	Pozitif		Negatif		
	N	$\bar{X} \pm S_x$	N	$\bar{X} \pm S_x$	
Sıcaklık	153	17.14±0.3	195	15.29±0.3	P<0.01
Oksijen	153	6.7±0.09	195	6.9±0.09	P<0.05
pH	153	7.98±0.02	195	7.94±0.02	P>0.05

N: Balık sayısı $\bar{X} \pm S_x$: Ortalama ± Standart hata

çözülmüş oksijen miktarı, 9.3 mg/L olarak Ocak 2014'te, en düşük 4.9 mg/L olarak Haziran 2014'te ölçülmüştür. pH'nın ise yıl boyunca 7.3 ile 8.3 arasında değiştiği görülmüştür.

İncelenen 348 adet balığın 153'ünün (%44) çeşitli parazitlerle enfekte olduğu görülmüştür. Tespit edilen parazitlerin 3'ü protozoon olup, Ciliata lar şubesinin *Oligohymenophorea* sınıfında, 1'i ise metazoon olup, Arthropoda şubesinin *Maxillapoda* sınıfında yer almaktadır. İncelenen balıkların; 118'i (%33.9) *Trichodina fultoni*, 19'u (%5.4) *Ichthyophthirius multifiliis*, 5'i (%1.4) *Apiosoma* sp., 4'ü (%1.1) *Lernaea* sp., olmak üzere tek türle enfekte iken, 7'sinde (%2) miks enfeksiyon tespit edilmiştir. Miks enfeksiyon tespit edilen balıkların 5'inin (%1.4) *T. fultoni* + *I. multifiliis*; 2'sinin (%0.6) ise *T. fultoni* + *Apiosoma* sp. ile enfekte olduğu belirlenmiştir.

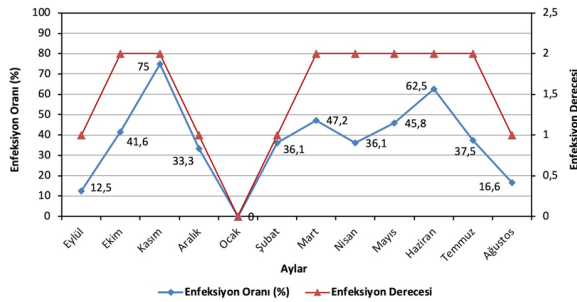
Örneklenen balıklarda her mevsim parazite rastlanmıştır. Genel enfeksiyon oranının mevsimsel dağılımı farklılık göstermiş olup (Tablo 3), istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0.01).

Balık boy ve ağırlıklarının, genel enfeksiyon pozitif ve negatif gruplardaki farklılıkları değerlendirildiğinde istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür (P<0.01). Buna göre, boyları kısa ve ağırlıkları düşük olan balıklarda paraziter enfeksiyonlar daha yoğun tespit edilmiştir (Tablo 4).

Diğer önemli parametreler olan su sıcaklığı ve çözülmüş oksijen miktarının, genel enfeksiyon pozitif ve negatif gruplardaki farklılıkları istatistiksel olarak önemli bulunurken, pH'nın (P>0.05) önemli olmadığı saptanmıştır. Buna göre, enfeksiyon tespit edilen su sıcaklığının daha yüksek olduğu belirlenirken, su sıcaklığıyla ters orantılı olan çözülmüş oksijen mikta-

rının ise daha düşük olduğu saptanmıştır (Tablo 5).

İncelenen balıkların 125'inde (%35.9) (miks enfeksiyonlar dahil) *Trichodina* enfeksiyonu tespit edilmiş, ilgili literatürlere göre yapılan morfolojik analizler sonucunda etken *T. fultoni* olarak tanımlanmıştır. Etkenin enfeksiyon oranı (%) ve enfeksiyon derecelerinin aylara göre dağılımı incelendiğinde Ocak ayı hariç diğer tüm aylarda farklı enfeksiyon derecelerinde enfeksiyona rastlanmıştır. En yüksek enfeksiyon oranı Kasım ayında %75 (18/24) oranında belirlenirken, bunu %62.5 (15/24) ile Haziran ayı takip etmiştir. En düşük enfeksiyon oranı ise %12.5 (3/24) ile Eylül ayında tespit edilmiştir. Diğer aylardaki enfeksiyon oranları ise %16.6 ile %47.2 arasında değişiklik göstermiştir. Eylül, Aralık, Şubat ve Ağustos aylarında düşük enfeksiyon derecesi (1) belirlenirken, enfeksiyonun görüldüğü diğer aylarda ise orta şiddette (2) enfeksiyonlar görülmüştür (Şekil 1).



Şekil 1. *Trichodina fultoni*'nin enfeksiyon oranı (%) ve enfeksiyon derecelerinin aylara göre dağılımı

Trichodina fultoni enfeksiyonuna her mevsim rastlanmış olup mevsimsel dağılımı farklılık göstermiştir ($P < 0.05$). En yüksek enfeksiyon oranı [(%43.1), 31/72] sonbahar mevsiminde tespit edilirken, en düşük [(%23.1), 25/108] kış mevsiminde saptanmıştır. İlkbahar ve yaz mevsimindeki enfeksiyon oranı ise sırasıyla %42.7 (41/96); %38.9 (28/72) olarak belirlenmiştir. Balık boy ve ağırlıklarının, enfeksiyon pozitif ve negatif gruplardaki farklılıkları da istatistiksel olarak önemli bulunmuş olup enfeksiyon tespit edilen balıkların boylarının daha kısa, ağırlıklarının ise daha düşük olduğu belirlenmiştir (Tablo 6).

Yine su sıcaklığı ve sudaki çözünmüş oksijen miktarının, *T. fultoni* pozitif ve negatif gruplardaki farklılıkları istatistiksel olarak önemli bulunurken, pH'nın ($P > 0.05$) önemli olmadığı görülmüştür. Buna göre *T. fultoni* enfeksiyonu tespit edilen su sıcaklığının daha yüksek olduğu, su sıcaklığıyla ters orantılı olan çözünmüş oksijen miktarının ise daha düşük olduğu saptanmıştır (Tablo 7).

Çalışma süresince balıklarda tespit edilen bir diğer protozoon olan *I. multifiliis*'in enfeksiyon oranı %6.9 (24/348) (miks enfeksiyonlar dahil) olarak belirlenmiştir. Etkenin enfeksiyon oranı (%) ve enfeksiyon derecelerinin aylara göre dağılımı incelendiğinde toplam beş ay enfeksiyona rastlanmıştır. En yüksek enfeksiyon oranı [(%33.3), 8/24] Ağustos ayında tespit edilirken bunu Kasım [(%29.1), 7/24] ve Eylül [(%20.8), 5/24] ayları takip etmiştir. En düşük enfeksiyon oranı ise Nisan [(%5.5), 2/36] ayında belirlenmiştir. En yüksek enfeksiyon derecesi (3) Eylül ayında belirlenirken, en düşük (1) Nisan ayında belirlenmiştir. Enfeksiyonun görüldüğü diğer aylarda ise orta (2) enfeksiyon derecesi saptanmıştır (Şekil 2).

Ichthyophthirius multifiliis enfeksiyonuna kış mevsimi haricindeki mevsimlerde rastlanmıştır. Enfeksiyonunun mevsimsel dağılımı farklılık göstermiş olup, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.01$). En yüksek enfeksiyon oranı [(%16.7), 12/72] sonbahar mevsiminde tespit edilirken, en düşük ilkbahar mevsiminde [(%2.1), 2/96] belirlenmiştir. Yaz mevsiminde ise %13.9 (10/72) olarak hesaplanmıştır. *Trichodina* enfeksiyonunda olduğu gibi balık boy/ağırlıklarının, su sıcaklığının ve sudaki çözünmüş oksijen miktarının, *I. multifiliis* pozitif ve negatif gruplardaki farklılıkları istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Tablo 8 ve 9).

Çalışmada tespit edilen bir diğer protozoon olan *Apiosoma* sp.'nin enfeksiyon oranı %2 (7/348) (miks enfeksiyonlar dahil) olarak belirlenmiştir. Bu protozoonu sadece Ocak ve Şubat aylarında rastlanmıştır. Ocak ayında enfeksiyon oranı %5.55 (2/36) iken Şubat ayında ise %8.33 (3/36) olarak hesaplanmıştır. Enfeksiyon derecesi Ocak ayında orta (2) olarak tespit edilirken, Şubat ayında ise yüksek (3) olarak belirlenmiştir.

Çalışma boyunca tespit edilen protozoonların enfeksiyon düzeylerine karşılık gelen enfeksiyon derecelerinin dağılımı ise Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 6. Balık boy (cm) ve ağırlıklarının (g), *T. fultoni* pozitif ve negatif gruplardaki farklılıkları

	Enfeksiyon				İstatistik önem Kontrolü (Student T test)
	Pozitif		Negatif		
	N	$\bar{X} \pm S_x$	N	$\bar{X} \pm S_x$	
Boy	125	22.78±0.39	223	24.87±0.33	P<0.001
Ağırlık	125	148.03±7.16	223	206.50±6.21	P<0.001

N: Balık sayısı $\bar{X} \pm S_x$: Ortalama ± Standart hata

Tablo 7. Kafes ve havuzlardaki su sıcaklığının (°C), çözülmüş oksijen miktarının (O₂ mg/L) ve pH değerinin *T. fultoni* pozitif ve negatif gruplardaki farklılıkları

Kafes ve Havuzlar	Enfeksiyon				İstatistik Önem Kontrolü (Student T test)
	Pozitif		Negatif		
	N	$\bar{X} \pm S_x$	N	$\bar{X} \pm S_x$	
Sıcaklık	125	16.75±0.30	223	15.74±0.30	P<0.05
Oksijen	125	6.61±0.1	223	7.00±0.08	P<0.01
pH	125	7.98±0.03	223	7.95±0.02	P>0.05

N: Balık sayısı $\bar{X} \pm S_x$: Ortalama ± Standart hata

Tablo 8. Balık boy ve ağırlıklarının, *I. multifiliis* pozitif ve negatif gruplardaki farklılıkları

	Enfeksiyon				İstatistik önem Kontrolü (Student T test)
	Pozitif		Negatif		
	N	$\bar{X} \pm S_x$	N	$\bar{X} \pm S_x$	
Boy (cm)	24	21.46±0.85	324	24.32±0.27	P<0.01
Ağırlık (g)	24	109.04±13.1	324	191.16±5.11	P<0.001

N: Balık sayısı $\bar{X} \pm S_x$: Ortalama ± Standart hata

Tablo 9. Kafes ve havuzlardaki su sıcaklığının (°C), çözülmüş oksijen miktarının (O₂ mg/L) ve pH değerinin, *I. multifiliis* pozitif ve negatif gruplardaki farklılıkları

Kafes ve Havuzlar	Enfeksiyon				İstatistik Önem Kontrolü (Student T test)
	Pozitif		Negatif		
	N	$\bar{X} \pm S_x$	N	$\bar{X} \pm S_x$	
Sıcaklık	24	20.33±0.76	324	15.79±0.22	P<0.001
Oksijen	24	6.33±0.07	324	6.9±0.15	P<0.05
pH	24	8.00	324	7.96±0.01	P>0.05

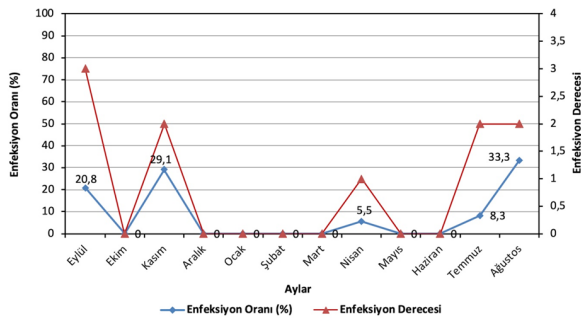
N: Balık sayısı $\bar{X} \pm S_x$: Ortalama ± Standart hata

Tablo 10. Tespit edilen protozoonların enfeksiyon derecelerinin dağılımı

Enfeksiyon Dereceleri	<i>T. fultoni</i>		<i>I. multifiliis</i>		<i>Apiosoma sp.</i>	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Düşük (1)	53	15.2	4	1.1	1	0.2
Orta (2)	62	17.8	15	4.3	3	0.9
Yüksek (3)	10	2.9	5	1.4	3	0.9
Toplam	125	35.6	24	6.8	7	2

Çalışmada bulunan tek metazoon olan *Lernaea* sp. ile enfeste balık oranı ise %1.1 (4/348) olarak belirlenmiş olup enfestasyona yalnızca Ocak ayında rastlanmıştır. Balıklar üzerinden toplam 32 adet *Lernaea* sp. toplanmış ve enfestasyon yoğunluğu 8 olarak belirlenmiştir. Balıkların makroskobik muayeneleri esnasında parazitlerin tutundukları vücut yüzeylerin-

de ödem ve yara izlerine rastlanmış olup, meydana gelen lezyonların çapının 5-9 mm arasında olduğu görülmüştür. Yapılan mikroskobik incelemeler sonucunda etkenlerin olgunlaşmış ve iki adet yumurta kesesine sahip dişi *Lernaea* sp. ler oldukları belirlenmiştir.



Şekil 2. *Ichthyophthirius multifiliis*'in enfeksiyon oranı (%) ve enfeksiyon derecelerinin aylara göre dağılımı

Tek değişkenli lojistik regresyon modelleri

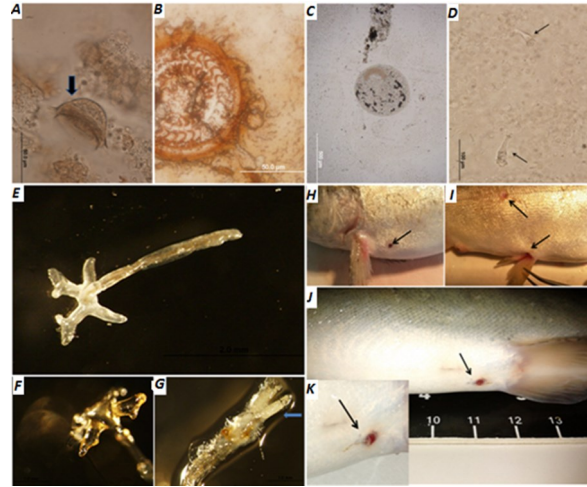
Mevsim, balık boy ve ağırlıkları, su sıcaklığı, sudaki çözülmüş oksijen miktarı ve pH modele dahil edilmiştir. Parazitlerin görülme oranları ve mevsimsel dağılımları arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür. Tek değişkenli lojistik

Tablo 11. Tek değişkenli lojistik regresyon modelleri

Değişken	Değişken Sınırları	$\hat{\beta}$	SE($\hat{\beta}$)	Wald	P Değeri	OR	OR'nin %95 Güven Aralığı
Mevsim	Yaz (Referans)			11.907	0.008		
	Sonbahar	0.056	0.334	0.028	0.867	1.057	0.549 2.036
	Kış	-0.889	0.314	8.010	0.005	0.411	0.222 0.761
	İlkbahar	-0.363	0.313	1.340	0.247	0.696	0.377 1.286
Boy	Sabit	0.111	0.236	0.222	0.638	1.118	
	Boy	-0.121	0.024	25.167	<0.001	0.886	0.845 0.929
	Sabit	2.665	0.586	20.663	<0.001	14.375	
Ağırlık	Ağırlık	-0.010	0.001	50.726	<0.001	0.990	0.987 0.992
	Sabit	1.633	0.279	34.118	<0.001	5.117	
Sıcaklık	Sıcaklık	0.110	0.027	16.460	<0.001	1.116	1.059 1.177
	Sabit	-2.025	0.455	19.811	<0.001	0.132	
Oksijen	Oksijen	-0.172	0.086	4.040	0.044	0.842	0.712 0.996
	Sabit	0.936	0.595	2.477	0.115	2.551	
pH	pH	0.380	0.345	1.210	0.271	1.462	0.743 2.877
	Sabit	-3.270	2.755	1.409	0.235	0.038	

$\hat{\beta}$: Kestirilen eğim katsayısı, $SE(\hat{\beta})$: Kestirilen eğim katsayısının standart hatası, **Wald**: Model için eğim katsayılarının sıfıra eşit olup olmadığını test eden Wald istatistiği, **P**: Wald istatistiğine ait P değeri, **OR**: Kestirilen odds oranı

regresyon analizi sonucuna göre kış mevsiminde enfeksiyon görülme oranının yazıya göre 0.41 kat daha az olduğu ortaya konmuştur. Balık boy ve ağırlıklarının, genel enfeksiyon pozitif ve negatif gruplardaki farklılıkları istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Boydaki bir birimlik (cm) artış, enfeksiyonun odds



Şekil 3. A) *Trichodina* sp. B) *T. fultoni* (gümüş nitrat boyama) C) *Ichthyophthirius multifiliis* (trofont) D) *Apiosoma* sp. E-K) *Lernaea* sp. F-G) Baş ve kuyruk kısmı, G) Yumurta keseleri H-K). Konak üzerinde oluşturduğu lezyonlar

oranını (OR) 0.88 kat azaltırken, ağırlıktaki bir birimlik (g) artışın ise 0.99 kat azalttığı görülmüştür. Su parametrelerinin, genel enfeksiyon pozitif ve negatif gruplardaki farklılıkları değerlendirildiğinde ise; su sıcaklığı ve çözülmüş oksijen miktarı istatistiksel olarak önemli bulunurken, pH'nın önemli olmadığı görülmüştür.

tür. Buna göre sıcaklıktaki bir birimlik ($^{\circ}\text{C}$) artış enfeksiyonun odds oranını (OR) 1.116 kat artırırken, çözülmüş oksijen miktarındaki bir birimlik artışın (O_2 mg/L) ise 0.842 kat azalttığı görülmüştür (Tablo 11).

Tartışma ve Sonuç

Türkiye’de gökkuşluğu alabalığı yetiştiriciliği her geçen gün artmakta ve ülke ekonomisine oldukça büyük katkı sağlamaktadır. Ancak, entansif yetiştiricilik koşullarında üretimi yapılan balıklar, doğal ortamda bulunanlara göre çok daha fazla strese maruz kalmakta ve enfeksiyonlara (paraziter, bakteriyel ve viral) açık hale gelmektedirler. Hastalık kaynaklı ölümlere ve tedavi giderlerine bağlı olarak ciddi ekonomik kayıplar yaşanmaktadır. Bu kayıpların en aza indirilebilmesi için balıkların önemli patojenlerinden olan paraziter etkenlerin yaygınlıklarının ve mevsimsel dağılımlarının belirlenmesi ayrıca hastalık oluşumunda etkili parametrelerin etki paylarının değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda, Aydın/Bozdoğan yöresinde yetiştirilen gökkuşluğu alabalıklarında paraziter yaygınlığı belirlenmeyi ve bazı parametrelerin hastalık oluşumu üzerindeki etkilerini ortaya koymayı amaçlayan çalışma kapsamında toplam 348 adet balık incelenmiş ve 153’ünün (%44) çeşitli parazitlerle enfekte olduğu tespit edilmiştir. Türkiye ve dünyanın farklı coğrafik bölgelerinde gökkuşluğu alabalıklarında yapılan bazı çalışmalarda paraziter enfeksiyonların genel prevalansı %18.14 ila %90 arasında rapor edilmiştir (Schisler ve ark., 1999; Altunay ve Yavuzcan Yıldız, 2008; Özer ve ark., 2010; Poulin ve ark., 2012). Paraziter enfeksiyonların prevalanslarındaki bu geniş aralık ise hastalık oluşumunda etkili olan çevre ve yetiştiricilik koşullarının çalışmanın yapıldığı coğrafik alana göre farklılık gösterebilmesine bağlanmaktadır.

Çalışma süresince incelenen balıkların; 118’i (%33.9) *T. fultoni*, 19’u (%5.4) *I. multifiliis*, 5’i (%1.4) *Apiosoma* sp., 4’ü (%1.1) *Lernaea* sp., olmak üzere tek türle enfekte iken, 7 tanesinde (%2) *T. fultoni*+*I. multifiliis* (%1.4); *T. fultoni*+*Apiosoma* sp. (%0.6)’den kaynaklanan miks enfeksiyonlar tespit edilmiştir. Türkiye’de gökkuşluğu alabalıklarında yapılan çalışmalarda *Trichodina* spp., *I. multifiliis*, *Apiosoma* sp., *I. necator*, *Chilodonella* spp., *Epistylis* sp., *Costia* sp. *Spironucleus salmonis* ve *Hexamita salmonis* gibi protozoonlar rapor edilmişlerdir. Balıklarda sıklıkla karşılaşılan *Trichodina* spp.’nin prevalansı %1.8-85 arasında, *I. multifiliis*’in prevalansı ise %5.88-20.69 arasında bildirilmiştir (Balta ve ark., 2008; Altunay ve Yavuzcan Yıldız, 2008; Özer ve ark., 2010; Çevrimel ve Soylu, 2017; Diler ve ark., 2018; Balta ve Balta, 2018a). Özer ve ark., (2010)’ı miks enfeksiyonu sadece bir balıkta (*Trichodina* spp.+*Chilodonella* spp.) rastladıklarını belirtirken, Altunay ve Yavuzcan Yıldız, (2008) ise iki etkenle enfekte balık oranının %66.6 olduğu bildirmiştir. İran’da gökkuşluğu alabalıklarında yapılan çalışmada

ise *I. multifiliis*, *Trichodina* sp., *Chilodonella* sp. tespit edilmiş olup prevalansları sırasıyla %16.4; 14; 1 olarak belirlenmiştir (Poulin ve ark., 2012). Yine Danimarka’da yapılan farklı çalışmalarda tespit edilen bir çok parazitin arasında *Trichodina* sp., *Apiosoma* sp., *I. multifiliis*, *T. fultoni* türlerinin yer aldığı dikkat çekmiştir. (Buchmann ve Bresciani, 1997; Jørgensen ve ark., 2009). Çalışmalarda genellikle *Trichodina* sp.’nin baskın protozoon olduğu ve prevalansının yüksek olduğu görülmekte ve mevcut çalışmanın bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Ayrıca çalışma süresince *Trichodina*’nın her mevsim enfeksiyon oluşturabilmesi ve yapılan bir çok çalışmada da tespit edilmiş olması, bu etkenin gökkuşluğu alabalığı işletmeleri için her zaman bir tehdit unsuru olabileceğini ortaya koymaktadır. Fırsatçı parazitler, her ne kadar konak üzerinde sayıları az olduğu dönemlerde ciddi enfeksiyonlar oluşturmasalar da, küresel ısınmanın gündemde olduğu son yıllarda su sıcaklıklarındaki değişikliklere bağlı olarak ortaya çıkan stres faktörleri sonucu söz konusu parazitlerin her zaman enfeksiyon oluşturabileceği ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır. Yine bu gibi olumsuz koşulların yanı sıra daha fazla kar amaçlayan işletmelerde stok yoğunluğunun artırılması ve aşırı yemleme gibi bilinçsiz yapılan yetiştiricilik uygulamaları sonucu, sularda biriken yem ve metabolizma atıkları, su kalitesinin bozulmasına ve sonuç olarak balıkların strese girmelerine sebep olmaktadır. Balıkların immun sistemlerinin zayıflamasına neden olan bu gibi durumlar fırsatçı parazitlere zemin hazırlamakta ve işletmeler için her zaman bir risk oluşturmaktadır (Karasev ve ark., 199; Durborow, 2003; Karvonen ve ark., 2010). Yine bu çalışmada *I. multifiliis* prevalansının diğer çalışmalara göre daha düşük olmasının sebebi su sıcaklığına bağlanmıştır. Nitekim Aihua ve Buchmann, (2001) bu protozoonun yaşam siklusuyla su sıcaklığı arasında pozitif bir korelasyonun bulunduğunu vurgulamıştır. Çalışmanın yapıldığı yörenin, sıcak bir bölgede yer alması, su sıcaklığının yaz aylarında yetiştiricilik koşullarının oldukça dışına çıkmasına sebep olmaktadır. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda *I. multifiliis* prevalansının oldukça yüksek olması beklenmektedir. Ancak, artan su sıcaklığına önlem olarak yaz mevsiminde barajdaki kafes işletmelerinde üretim durdurulmaktadır. Üretime ise daha düşük su sıcaklığına sahip baraj dip suyunun aktarıldığı karasal işletmelerde devam edilmektedir. Bu uygulamanın yetersiz kaldığı durumlarda ise havuzlar yer altı sularıyla desteklenerek su sıcaklığının bazı işletmelerde aşırı yükselmesi engellenebilmektedir. Böylelikle, özellikle su sıcaklığının ayarlanabildiği işletmelerde *I. multifiliis*’e daha az rastlanmakta ve buna bağlı olarak da parazitin genel prevalansı düşük olmaktadır. Nitekim çalışma süresince su sıcaklığındaki değişimlerin hastalık oluşumunda etkisi istatistikî olarak önemli bulunmuştur ($P<0.01$).

Çalışma boyunca balıklarda en yaygın olarak rastla-

nan protozoon türünün *T. fultoni* olduğu görülmüştür. Bu protozoon Ocak ayı haricindeki diğer aylarda farklı enfeksiyon oranları ve enfeksiyon derecelerinde tespit edilmiştir. Buchmann ve Bresciani, (1997) yaptıkları çalışmada *Trichodina* türleri tarafından oluşturulan enfeksiyonunun Mayıs, Haziran ve Eylül ayları hariç yıl boyunca görüldüğünü bildirmişlerdir. Jorgensen ve ark. (2009) Danimarka'da resirkülatif sistemin kurulu olduğu çiftliklerden örneklediği gökkuşağı alabalıklarında, Eylül, Aralık ve Nisan ayları haricinde *Trichodina* sp. enfeksiyonuna rastladıklarını rapor etmişlerdir. Altunay ve Yavuzcan Yıldız, (2008) ise *Trichodina* sp. enfeksiyonunu yıl boyunca %100'e varan enfeksiyon oranlarında tespit etmişlerdir. Yine Balta ve ark., (2008) *Trichodina* sp.'ye Mayıs-Eylül ayları arasında rastladıklarını ve en yüksek enfeksiyon oranının Ağustos ayında tespit edildiğini belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada ise balıklarda bir ay hariç yıl boyunca bulunan bu etkenin en yüksek enfeksiyon oranı Kasım (%75) ayında tespit edilmiş olup, diğer çalışmalarla farklılık göstermektedir. Enfeksiyon oranının özellikle bu ayda artmasının sebebi; Kasım ayı Bozdoğan yöresinde baraj suyunun yetiştiriciliğe uygun olmaya başladığı ay olup, balıkların bir kısmı barajdaki ağ kafeslere aktarılmaktadır. Bu nedenle hem su sıcaklığının uygun olması hem de balıkların pazara daha erken sürülebilmesi için karasal işletmelerde yoğun bir yemleme süreci başlamaktadır. Bu durum balıkların metabolizmasının hızlanmasına aynı zamanda aşırı su kirliliğine de sebep olarak balıklar üzerinde bir stres faktörü oluşturabilmektedir. Sonuç olarak strese bağlı immun sistemleri etkilenen balıkların bu gibi fırsatçı parazit enfeksiyonlara yakalanması kaçınılmaz olmaktadır. Nitekim Karasev ve ark. (1997)'nin yaptıkları çalışmada, *Trichodina nigra*'nın üreme ve çoğalmasında özellikle su sıcaklığı ve suda artan organik madde miktarının oldukça önemli olduğu belirtilmiştir.

Çalışma süresince tespit edilen diğer önemli bir protozoon *I. multifiliis* türüdür. Balta ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada Mayıs'tan Eylül'e kadar olan dönemde bu enfeksiyonun tespit edildiğini ve en yüksek prevalans oranına Ağustos ayında ulaştığını bildirirken, Buchmann ve Bresciani, (1997) *I. multifiliis*'in tipik olarak termofilik bir protozoon olduğunu ve Aralık'tan Haziran'a kadar olan dönemde herhangi bir enfeksiyon oluşturmadığını rapor etmişlerdir. En yüksek enfeksiyon oranına ise (%10-20 mortalite) Temmuz-Eylül ayları arasındaki dönemde ulaştığını, daha sonra azalarak Kasım'a kadar devam ettiğini belirtmişlerdir. Hastalığın, Temmuz'da %11, Ağustos'ta %23, Eylül'de %14, Ekim'de %4 ve Kasım'da %2'lik bir prevalansla seyrettiğini ortaya koymuşlardır. Özer ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada ise ilkbaharda *I. multifiliis*'e rastlanmazken diğer aylarda baskın tür olduğunu rapor etmişlerdir. Ögüt ve ark. (2005) Karadenizde *I. multifiliis*'in mevsimsel olarak dağılımını inceledikleri bir çalışmada enfeksiyonun en yüksek

prevalans, ortalama yoğunluk ve bolluk değerlerine Ağustos ayında ulaştığını ve kış mevsiminde enfeksiyon tespit edemediklerini belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada *I. multifiliis* enfeksiyonuna toplam beş ay rastlanmış olup en yüksek enfeksiyon oranı Ağustos (%33.3) ayında belirlenirken, bunu Kasım (%29.1) ayı takip etmiştir. En düşük enfeksiyon oranı ise Nisan (%5.5) ayında tespit edilmiştir. Diğer çalışmalarla benzer olarak, mevcut çalışmada *I. multifiliis* enfeksiyonunun genellikle su sıcaklığının yüksek olduğu aylarda tespit edildiği ve prevalansının Ağustos ayında pik yaptığı belirlenmiştir. Ayrıca *I. multifiliis* enfeksiyonu kış mevsimi haricindeki tüm mevsimlerde farklı enfeksiyon oranlarında tespit edilmiş olup, bu farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Bu protozoonun üreme ve çoğalmasında su sıcaklığı önem arz etmektedir. Bu nedenle yaz mevsiminde ve erken sonbahar döneminde bu protozoon daha sık rastlanmaktadır. Dickerson, (2006)'nın belirttiğine göre yaşam siklusundaki evreler ancak su sıcaklığının 21-23°C'ye ulaştığı dönemlerde tamamlanabilmektedir. Eğer ortam sıcaklığı 10°C'nin altındaysa kistlenme meydana gelmemekte ve bölünme şekillenmemektedir. Bu durum enfeksiyonun kış mevsiminde görülmesinin sebebinin açıkça ortaya koymaktadır. *I. multifiliis* enfeksiyonu üzerine su parametrelerindeki değişimlerin etkisi değerlendirildiğinde; Ögüt ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada su sıcaklığıyla ortalama yoğunluk arasında önemli bir ilişki bulunduğunu, ayrıca logaritmik bir artışın söz konusu olduğunu belirtmişlerdir. Su sıcaklığının 18°C'nin üzerine çıktığı dönemlerde konak üzerinde parazit sayısının arttığını ve prevalansının %80'nin üzerine çıktığını vurgulamışlardır. Enfeksiyonun geç yaz döneminde meydana gelmesinin sebebinin ise, su sıcaklığının yüksek olması, yağış miktarının az olmasına bağlı olarak su seviyesinin düşük olması ve gece-gündüz arasındaki su sıcaklık farkının az olması gibi yetiştiriciliği olumsuz etkileyebilecek koşullarla açıklamışlardır. Yine Buchmann ve Bresciani, (1997) bu etkenin prevalansının en yüksek olduğu sıcaklık aralığını 16-20°C olarak belirlemiş olup, sıcaklık arttıkça prevalansının arttığını bildirmişlerdir. Aihua ve Buchmann, (2001) bu protozoonun yaşam siklusuyla su sıcaklığı arasında pozitif bir korelasyonun bulunduğunu vurgulamıştır. Yaptığımız çalışmada su parametrelerindeki değişimlerin, *I. multifiliis* pozitif ve negatif gruplardaki farklılıkları değerlendirildiğinde; su sıcaklığının ve çözünmüş oksijen miktarının istatistiki olarak önemli olduğu görülürken, pH'nın önemli olmadığı ortaya konmuştur. Bu protozoonun tespit edildiği su sıcaklığının daha yüksek olduğu görülmüştür. Enfeksiyonun genellikle su sıcaklığının çok daha yüksek olduğu dönemlerde tespit edilmesi, yine su sıcaklığıyla ters orantılı olan çözünmüş oksijen miktarının düşük olmasıyla da bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. *T. fultoni* için bahsettiğimiz şekilde, su sıcaklığı ve çözünmüş oksijen miktarındaki yetiştiricilik aleyhine olan değişiklikler *I. multifiliis* enfeksiyonunun da oluş-

masına zemin hazırlayabileceği net bir şekilde görülmüştür.

Çalışma boyunca incelenen balıklardan 4 tanesinde sadece Ocak ayında çoğu iki adet yumurta kesesine sahip metazoon parazit olan dişi *Lernaea* sp.'ler tespit edilmiştir. Enfestasyon oranı %1.1 olarak hesaplanmış olup enfestasyon yoğunluğu ise önceki çalışmalarla benzer şekilde 8 olarak belirlenmiştir (Berry ve ark., 1991; Tokşen ve ark., 2014). Bu parazitin tespit edildiği havuzun boşaltılması sonucu yıl boyunca tekrar enfestasyona rastlanmamıştır. Parazitlerin tutundukları vücut yüzeylerinde daha önceki çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu şekilde ödem ve yara izlerine rastlanmış olup, meydana gelen lezyonların çapının 5-9 mm arasında değiştiği görülmüştür (Berry ve ark., 1991; Bednarska ve ark., 2009). Çoğunlukla sazan türlerini enfeste eden *Lernaea* sp.'nin bu çalışmada gökkuşluğu alabalıklarında tespit edilmesi, bulunduğu işletmede sazan yetiştiriciliği yapılmasında aynı kaynak üzerinde yapılıyor olması ve aynı zamanda kullanılan su kaynağında doğal olarak bu balık türlerinin yaşıyor olmasına bağlanmıştır. Nitekim, Polonya'da toplu ölümlerin görüldüğü gökkuşluğu alabalık işletmelerinde *L. cyprinacea* enfestasyonu saptanmış ve söz konusu balık türünün, sazan (*Cyprinus carpio*) ve benzeri balık türleriyle aynı ortamda yetiştirildiği vurgulanmıştır (Bednarska ve ark., 2009). Berry ve ark. (1991) dört yıl boyunca yürüttükleri çalışmada ilk *L. cyprinacea* enfestasyonunu her yıl yaz ortasında (Temmuz) tespit ettiklerini, parazitin en bol bulunduğu mevsimin ise sonbahar olduğunu belirtmişlerdir. Prevalansını ise Temmuz, Eylül ve Kasım aylarında %100 olarak hesaplamışlardır. Yine Bednarska ve ark., (2009)'nın belirttiğine göre normal koşullarda *L. cyprinacea*'nin optimum üreme sıcaklığı 23-30°C civarında olup, genellikle bu enfestasyona su sıcaklığının yüksek olduğu mevsimlerde rastlanmaktadır. Fakat su sıcaklığı 14°C'nin altına düştüğü durumlarda ise parazitin yaşam siklusu durmakta ve çiftleşen dişi parazitler kışı ya da o dönemi herhangi bir konak üzerinde atlatılmaktadır. Bu durum dikkate alındığında yaptığımız çalışmada parazitin tespit edildiği mevsim ve konak farklılığı net bir şekilde açıklanabilmektedir.

Bu çalışmanın bulgularından farklı olarak Türkiye'de gökkuşluğu alabalıklarında *Dactylogyrus* sp., *D. sphyrna*, *Gyrodactylus* sp., *Diplostomum* spp., *Clinostomum complanatum* (metaserker), *Pomphorhynchus laevis*, *Crepidostomum farionis*, *Hysterothylacium aduncum*, *H. gadi aduncum*, *Schulmanella petruschewskii* rapor edilmiştir (Burgu ve ark., 1988; Ögüt ve Akyol, 2007; Pekmezci, 2010; Sağlam, 2013; Avsever ve ark., 2016; Çevrimel ve Soylu, 2017; Balta ve Balta, 2018b). Mevcut çalışmada *Lernaea* sp., dışında yukarıda bahsi geçen herhangi bir metazoon parazit tespit edilememiştir. Bu durumun ise yetiştiricilik yapılan ortamda söz konusu bazı parazitlerin ara konaklarının bulunup bulunma-

ması veya balıkların beslenmesinde kullanılan yemlerin türü ve içeriğiyle ilgili olabileceği düşünülmektedir. Nitekim Pekmezci, (2010) yaptığı çalışmada *H. gadi aduncum* tespit ettiği gökkuşluğu alabalıklarının birkaç ay öncesinde denizden avlanan hamsilerle beslendiğini, bu balıkların etkenin larva 3 formuyla enfekte olabileceğini ve dolayısıyla enfeksiyonun bundan kaynaklandığına vurgu yapmıştır. Skov ve ark. (2014) denizde yetiştirilen gökkuşluğu alabalıklarında yaptıkları çalışmada *H. aduncum* tespit ettiklerini ve bu durumun ortamda artan ara/paratenik konaklarla (küçük balıklar, crustacealar vb.) ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Balıkların parazitler için bazen son bazen de arakonak olabildikleri dikkate alındığında, çiftliklerde yem olarak deniz balıklarının kullanılması, bazı metazoonların bulaşmalarında ve yayılmalarında risk teşkil ettiğini açıkça göstermektedir.

Sonuç olarak çalışma boyunca bulunan protozoonlar fırsatçı parazitler olup, konak üzerinde sayıları az olduğu dönemlerde ciddi bir enfeksiyon oluşturmazken, balıkların immun sistemini etkileyecek ve strese sokabilecek herhangi bir durumda önemli mortalitelere sebep olabilmektedirler. Yeterince stres faktörünün bulunduğu yetiştiricilik koşullarında bu gibi enfeksiyonların ortaya çıkması kaçınılmaz olmaktadır. Nitekim çalışmamız sonucunda bazı parametrelerin enfeksiyon varlığı üzerine olan etkisi ortaya konulmuş olup, kış mevsiminde enfeksiyon görülme oranının yaza göre 0.41 kat daha az olduğu belirlenmiştir. Özellikle su sıcaklığı, çözünmüş oksijen miktarı, balık boy ve ağırlıklarının enfeksiyon oluşumunda oldukça önemli olduğu görülmüştür. Çoğunlukla sazan türlerini enfeste eden *L. cyprinacea*, çalışma sırasında gökkuşluğu alabalıklarında tespit edilmiştir. Aynı su kaynağı üzerinde sazan yetiştiriciliği yapılıyor olması ya da yetiştiricilikte kullanılan suda doğal olarak söz konusu balık türünün bulunması, bu gibi durumların oluşabileceğine işaret etmektedir. Tüm bu durumlar göz önünde bulundurulduğunda, olumsuz şartların bir arada olduğu yetiştiricilik koşullarında su kalitesinin mümkün olduğunca iyi olmasına, stok yoğunluğunun fazla olmamasına, suların yem artıkları ve ölü balıklarla kirlenmemesine dikkat edilmelidir. Aynı zamanda doğal ortamdaki balıkların, hem protozoon hem de metazoon faunasınının mevsimlere göre dağılımlarını belirlemeye yönelik çalışmaların yapılması ve yetiştiricilik açısından oluşturdukları risk faktörlerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

- Aihua L, Buchmann K. Temperature- and salinity-dependent development of a Nordic strain of *Ichthyophthirius multifiliis* from rainbow trout. J Appl Ichthyol 2001; 17: 273-6.
- Altunay S, Yavuzcan Yıldız H. Kesikköprü Baraj Gölünde bir kafes işletmesinde yetiştirilen gökkuşluğu

- alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) ektoparazitolojik olarak incelenmesi. Ankara Üniv Tarım Bilim Derg 2008; 14(2): 154-62.
- Atkinson SD, Bartholomew JL. Disparate infection patterns of *Ceratomyxa shasta* (Myxozoa) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) correlate with internal transcribed spacer-1 sequence variation in the parasite. Int J Parasitol 2010; 4: 599-604.
- Avsever ML, Selver MM, Yazıcıoğlu Ö, Tokşen E, Tay S, Erdal G, Günen MZ. The first report of diplostomiasis from cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 2016; 63: 377-81.
- Balta F, Balta ZD. Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavrularında görülen Hexamitozis'in tanısı ve tedavisi. Anadolu Çev ve Hay Dergisi 2018a; 1: 4-8.
- Balta F, Balta ZD. Kültürü yapılan gökkuşluğu alabalıklar (*Oncorhynchus mykiss*)'ında *Gyrodactylus* spp. enfeksiyonu. Anadolu Çev ve Hay Dergisi 2018b; 3: 141-4.
- Balta F, Balta ZD. Kültürü yapılan karadeniz alabalığı (*Salmo coruhensis* syn. *Salmo labrax*)'nda görülen bazı dış siliat protozoon parazit enfestasyonları ve tedavileri. Anadolu Çev ve Hay Dergisi 2017; 2: 29-33.
- Balta F, Kayış S, Altınok I. External protozoan parasites in three trout species in the Eastern Black Sea region of the Turkey: intensity, seasonality, and their treatments. B Eur Assoc Fish Pat 2008; 28(4): 157.
- Bednarska M, Bednarski M, Soltysiak Z, Polechonski R. Invasion of *Lernaea cyprinacea* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Acta Sci Pol Med Vet 2009; 8(4): 27-32.
- Berra TM, Au RJ. Incidence of black spot disease in fishes in Cedar Fork Creek, Ohio. Ohio J Sci 1978; 78(6): 318-22.
- Berry CR, Babey GJ, Shrader T. Effect of *Lernaea cyprinacea* (Crustacea: Copepoda) on stocked rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Wildlife Dis 1991; 27(2): 206-13.
- Buchmann K, Bresciani J. Monogenea (Phylum Platyhelminthes). Woo PTK eds In: Fish Diseases and Disorders. 2nd Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections. UK: CAB International, Wallingford, 2006; pp. 297-344.
- Buchmann K, Bresciani J. Parasitic infections in pond-reared rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Denmark. Dis Aquat Organ 1997; 28(2): 125-38.
- Buchmann K. An Introduction to Fish Parasitological Methods-Classical and Molecular Techniques. Copenhagen: Biofolia Press, 2007.
- Burgu A, Oğuz T, Körting W, Güralp N. İç Anadolu'nun bazı yörelerinde tatlısu balıklarının parazitleri. Etlik Vet Mikrobiyol Derg 1988; 3(6): 143-65.
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revised. J Parasitol 1997; 83: 575-83.
- Çevrimel DS, Soylu E. The occurrence of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) in cagereared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from Işıklı Spring, Çivril, Turkey. Ege J Fish Aqua Sci 2017; 34 (3): 255-60.
- Dick TAC, Chambers C, Isinguzo I. Cestoidea (Phylum Platyhelminthes). Woo PTK eds In: Fish Diseases and Disorders. Second Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections. UK: CAB International, Wallingford, 2006; pp. 391-416.
- Dickerson HW. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). Woo PTK. Ed. In: Fish Diseases and Disorders. Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections. Second Press. UK: CAB International, Wallingford; 2006; pp. 116-53.
- Diler Ö, Görmez Ö, Terzioğlu S, Bayrak H. Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yetiştiriciliğinde görülen *Spironucleosis* enfeksiyonlarının tedavisinde *Artemisia campestris* (L.)'in kullanımı. Act Aqua Tr 2018; 14(4): 312-23.
- Durborow RM. Protozoon Parasites. Southern Regional Aquaculture Center, 2003: 4701.
- Emre Y. Alabalık yetiştiriciliği. TC Başbakanlık Güneydoğu Anadolu Projesi Bölge Kalkınma İdaresi Başkanlığı Yayını, 2004.
- Erer H. Balık Hastalıkları. Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi, 2002; s. 4-5.
- Jørgensen T.R, Larsen TB, Buchmann K. Parasite infections in recirculated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms. Aquaculture 2009; 289: 91-4.
- Karasev AB, Mitenev VK, Kalinina NR. Parasite fauna of cage-reared rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792) research in freshwater farms (Kola Peninsula, Russia). B Eur Assoc Fish Pat 1997; 17(5): 177-9.
- Karvonen A, Rintamäki P, Jokela J, Valtonen ET. Increasing water temperature and disease risk in aquatic systems: Climate change increases the risk of some, but not all, diseases. Int J Parasitol 2010; 40(3): 1483-8.

- Lom J, Dyková I. Protozoan Parasites of Fish. Volume 26: Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1992; p. 315-6.
- Lom J, Hoffman GL. Geographic distribution of some species of Trichodinids (Ciliata: Peritricha) parasitic on fishes. J Parasitol 1964; 50(1): 30-5.
- Maceda Veiga A, Monroy M, Salvado H, Cable J, De Sostoa A. Ectoparasites of native cyprinid *Barbus haasi*: First record of *Trichodina acuta* and *Trichodina fultoni* in Iberian catchments. B Eur Assoc Fish Pat 2013; 33(6): 187.
- Moravec F. Metazoan Parasites of Salmonid Fishes of Europe. Praha-Czech Republic: Academia Publishers, 2004.
- Öğüt H, Akyol A, Alkan MZ. Seasonality of *Ichthyophthirius multifiliis* in the Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Farms of the Eastern Black Sea Region of Turkey. Turk J Fish Aquat Sci 2005; 5(1): 23-7.
- Öğüt H, Akyol A. Prevalence and intensity of ectoparasites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from larvae stage to market size in Turkey. Isr J Aquac 2007; 59(1): 23-31.
- Öge H. Balık tüketiminde ekonomik ve sağlık yönünden önemli parazitler. Türkiye Parazit Derg 1999; 23(4): 440-5.
- Özer S, Koyuncu E, Dönmez E, Bulduklu PS, Erdoğan S. Mersin'de yetiştiriciliği yapılan gökkuşuğu alabalıklarındaki (*Oncorhynchus mykiss*, walbaum, 1792) saptanan ektoparazit protozoonlar. Pendik Vet Mikrobiyol Derg 2010; 37(1): 43-52.
- Paperna I, Dzikowski R. Digenea (Phylum Platyhelminthes). Woo PTK eds In: Fish Diseases and Disorders. Second Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections. UK: CAB International, Wallingford, 2006; pp. 345-90.
- Pekmezci Z. Samsun yöresinde yetiştirilen gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) metazoan parazit faunası. Doktora tezi, Ondokuz Mayıs Üniv Sağ Bil Ens, Samsun, 2010.
- Pillay TVR. Aquaculture and Environment. Blackwell Scientific Publication, 1992; p. 189.
- Poulin S, Sara MM, Javad S. A survey on ectoparasite fauna of cold water fish farms in Mazandaran province, Iran. Glob Vet 2012; 8 (1): 101-4.
- Rintamäki-Kinnunen P, Valtonen ET. Epizootiology of protozoans in farmed salmonids at northern latitudes. Int J Parasitol 1997; 27(1): 89-99.
- Rubio-Godoy M, Paladini G, Freeman MA, García-Vásquez A, Shinn AP. Morphological and molecular characterisation of *Gyrodactylus salmonis* (Platyhelminthes, Monogenea) isolates collected in Mexico from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Vet Parasitol 2012; 186(3-4): 289-300.
- Saghari Fard MR, Jørgensen A, Sterud E, Bleiss W, Poynton SL. Ultrastructure and molecular diagnosis of *Spironucleus salmonis* (Diplomonadida) from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Germany. Dis Aquat Organ 2007; 75(1): 37-50.
- Sağlam N. Infection of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). Afr J Agric Res 2013; 8(47): 5953-7.
- Saygı G. Genel Parazitoloji. Türkiye: Esnaf Ofset Matbaacılık, 1999.
- Schisler GJ, Walker PG, Chittum LA, Bergersen EP. Gill ectoparasites of juvenile rainbow trout and brown trout in the upper Colorado River J Aquat Anim Health 1999; 11(2): 170-4.
- Scholz T. Parasites in cultured and feral fish. Vet Parasitol 1999; 84(3-4): 317-35.
- Skovgaard A, Buchmann K. *Tetracapsuloides bryosalmonae* and PKD in juvenile wild salmonids in Denmark. Dis Aquat Organ 2012; 101(1): 33-42.
- Skov J, Mehrdana F, Marana MH, Bahloul QZM, Jaafar RM, Sindberg D, Jensen HM, Kania P, Buchmann K. Parasite infections of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from Danish mariculture. Aquaculture 2014; 434: 486-92.
- Tokşen E, Arif Zoral M, Şirin C. Occurrence of *Lernaea* spp. infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farmed in Turkey. B Eur Assoc Fish Pat 2014; 35(1): 8-13.
- Tonguthai K. Control of freshwater fish parasites: A Southeast Asian perspective. Int J Parasitol 1997; 21(10): 1185-91.



Prevalence and Serotype Distribution of *Listeria monocytogenes* Isolated from Retail Raw Meats*

Seyda ŞAHİN¹, Mahmut Niyazi MOĞULKOÇ², Recep KALIN²

¹Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Sivas-TURKEY

²Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Sivas-TURKEY

Corresponding author: Seyda ŞAHİN; E-mail: seydahin@cumhuriyet.edu.tr; ORCID:0000-0002-8173-7818

How the cite: Şahin S, Moğulkoç MN, Kalın R. Prevalence and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from retail raw meats. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020;17(1): 22-27.

Summary: *Listeria monocytogenes* is a foodborne pathogen, which has great importance for human and animal health. Although 13 serotypes have been identified for *L. monocytogenes*, four of these serotypes (1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b) are significant with regard to human listeriosis. With this study, beef, sheep and chicken meat samples were examined for *L. monocytogenes* and serotype of isolates were detected by molecular methods. A total of 156 marketed meat samples comprising of beef, sheep and chicken were collected from different supermarkets, butchers and retail shops. *L. monocytogenes* contamination rate was found as 12.8% in overall meat samples. In this study *L. monocytogenes* were detected in meat samples of beef, sheep and chicken meat samples as 14.8% (8 of 54), 9.6% (5 of 52), 14% (7 of 50), respectively. Common serotype was belonged to 1/2c in beef meats, 1/2a in chicken meats. *L. monocytogenes* strains of sheep were serotyped first time and dominant serotype was found to be 1/2c in Turkey. The presence of *L. monocytogenes*, contamination level and predominant serotype distribution in diverse foods should be elucidated with comprehensive studies mainly in animal products. Additionally, genetic relationship of human and animal isolates should be revealed and the role of animal products in human listeriosis should be investigated.

Key words: *Listeria monocytogenes*, mPCR, meat, serotype

Satışa Sunulan Etlerde *Listeria monocytogenes* Prevalansı ve Serotip Dağılımının Belirlenmesi

Özet: *Listeria monocytogenes*, gıda kaynaklı patojenlerden biri olup insan ve hayvan sağlığı açısından büyük öneme sahiptir. *L. monocytogenes*'in 13 serotipi bulunmasına rağmen, bunlardan dördü (1/2a, 1/2b, 1/2c ve 4b) insan listeriosis açısından önemlidir. Bu çalışmada sığır, koyun ve tavuk et örnekleri *L. monocytogenes* yönünden incelenerek, moleküler yöntemlerle serotipleri ortaya kondu. Sığır, koyun ve tavuk etinden oluşan toplam 156 örnek süpermarket, kasap ve perakende satış noktalarından alındı. Tüm et örneklerinin %12.8'i *L. monocytogenes* ile kontamine bulundu. Bu çalışmada, *L. monocytogenes* sığır et örneklerinde %14.8 (8/54), koyun et örneklerinde %9.6 (5/52), tavuk et örneklerinde %14.0 (7/50) oranında tespit edildi. Sığır etinde 1/2c, tavuk etinde ise 1/2a serotipi baskın olarak bulundu. Bu çalışmada, Türkiye'de koyun listeria suşları ilk defa serotiplendirildi ve baskın serotip 1/2c olarak belirlendi. Kapsamlı çalışmalar ile başta hayvansal gıdalar olmak üzere farklı kaynaklarda *L. monocytogenes* varlığı, kontaminasyon düzeyi ve predominant serotip dağılımı belirlenmelidir. Buna ilaveten, insan ve hayvan izolatlarının genetik ilişkileri ortaya konularak insan listeriosisinde hayvansal ürünlerin rolü araştırılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Et, *Listeria monocytogenes*, mPCR, serotip

Introduction

A significant rise has been observed in foodborne infections and intoxications throughout the world and one of the bacterial agents responsible for this is *L. monocytogenes*. European Food Safety Authority (EFSA) reports that *L. monocytogenes* ranks fifth among foodborne outbreaks (EFSA, 2015). According to Center for Disease Control and Prevention (CDC) data, 1500 people are being hospitalized and 260 people are losing their lives due to *L. monocytogenes* annually in the USA (CDC, 2016).

It has been reported that vast majority of human listeriosis cases originate from the consumption of ready to eat products and animal foods *L. monocytogenes* isolation was stated in red meat, chicken meat, raw milk and milk products and ready to eat foods (Norton and Braden, 2007).

L. monocytogenes has 13 serotypes (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e and 7) on the basis of somatic (O factor) and flagellar (H factor) antigens. Four of these serotypes, (1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b) are identified mostly in human listeriosis (Doumith et al., 2004). It has been stated that isolates obtained from human cases were mostly 4b serotype, and secondly common serotype was 1/2a in the USA (CDC, 2016). EFSA notified that 1/2a (57.5%) serotype was the most common isolate and followed by 4b, 1/2b, 1/2c, 3a and 3b serotypes for human listeriosis

Geliş Tarihi/Submission Date : 15.04.2019
Kabul Tarihi/Accepted Date : 06.08.2019

* This study was presented as poster in XII. National Veterinary Medicine Microbiology Congress, 30 August-2 September 2016, Nevşehir, Turkey.

osis (EFSA, 2015).

Rapid detection of agent and accurate determination of serotypes are crucial for struggling with disease. Consequently, agglutination, ELISA and PCR assays (Doumith et al., 2004; Kerouanton et al., 2010) are widely employed for serotyping. But agglutination method has several limitations such as high-cost antisera, being time-consuming, requirement of experience and low discrimination capacity (Kerouanton et al., 2010). In recent years, specific, rapid, reliable and cost-effective Multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR) method was replaced by conventional serotyping methods, for identification and serotyping of *L. monocytogenes* (Doumith et al., 2004).

The current study aimed to reveal the occurrence of *L. monocytogenes* and to determine the distribution of serotypes by molecular methods in meats samples that belong to different animal species (beef, sheep and chicken).

Materials and Methods

Food samples: A total of 156 marketed fresh meat samples comprising of beef (n=54), sheep (n=52) and chicken (n=50) were collected randomly from 55 different markets, butchers and retail shops between April and October 2016. Samples were brought to the laboratory in cold chain, immediately followed by isolation and identification processes.

Isolation and identification of *L. monocytogenes*: EN ISO 11290-1 culture technique was utilized for isolation of *L. monocytogenes*. A 225 ml Half Fraser Broth (Merck 1.10398.0500) was added onto 25 g of

at 37 °C for 24 hours. One loopful of broth was streaked on PALCAM agar (Polymyxin Acriflavine Lithium Chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol Oxoid CM0877-SR0150E) and plates were incubated at 37 °C for 48 hours. Presumptive colonies (black-centered, gray-black in color with a black halo) were subcultured onto TSA-YE (Tryptone Soy Agar-Yeast Extract, Oxoid CM0131) and incubated at 37 °C for 24 hours. Colonies grown on TSA-YE were transferred to TSB (Tryptone Soy Broth Oxoid CM0129) with 20% glycerol for further analysis and preserved at -20 °C.

DNA extraction and PCR: Isolates stored in TSB were thawed and 500 µl of broth was transferred to microcentrifuge tubes. Tubes were centrifuged at 10.000 rpm for 5 minutes (VMR International Galaxy 16DH) and the supernatant was decanted. Pellet was suspended in 300 µl of sterile distilled water and 300 µl of K buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,2 % Sodium Dodecyl Sulfate-SDS) and 5 µl of proteinase K (20 mg/ml) (Vivantis PC0712-100mg) were added. After the incubation of tubes at 56 °C for 2 hours, samples were heated in water bath at 100 °C for 10 minutes to inactivate Proteinase K. Tubes were centrifuged at 13.000 rpm for 10 minutes and the supernatant was discarded. Then 100 µl of sterile distilled water was added and used as template DNA in PCR assays.

Initially, DNA samples were analyzed for *Listeria* spp. with the *prs* gene specific primer pair. *Listeria* spp. positive samples were examined for *L. monocytogenes* with *prfA* gene specific primers. Then, serotypes of *L. monocytogenes* were determined by multi-

Table 1. Primer pairs used for *Listeria* spp., *L. monocytogenes* and serotyping

Target Gene	Primer sequence (5'-3')		Sizes (bp)	Reference
<i>prs</i>	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	All <i>Listeria</i> spp.	370 bp	(Doumith et al., 2004)
<i>prfA</i>	GATACAGAAACATCGGTTGGC GTGTAATCTTGATGCCATCAGG	<i>L. monocytogenes</i>	274 bp	(D'Agostino et al., 2004)
<i>lmo0737</i>	AGGGCTTCAAGGACTTACCC ACGATTTCTGCTTGCCATTC	1/ 2a, 1/2 c, 3a and 3c	691bp	(Doumith et al., 2004)
<i>lmo1118</i>	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA CGGCTTGTTCCGGCATACTTA	1/2 c and 3c	906 bp	(Doumith et al., 2004)
<i>orf2819</i>	AGCAAAATGCCAAAACCTCGT CATCACTAAAGCCTCCCATTTG	1/ 2 b, 3b, 4b, 4d and 4e	471 bp	(Doumith et al., 2004)
<i>orf2110</i>	AGTGGACAATTGATTGGTGAA CATCCATCCCTTACTTTGGAC	4b, 4d and 4e	597 bp	(Doumith et al., 2004)

each sample, and samples were homogenized for 2-3 minutes in the stomacher (Interscience BagMixer 400 cc, France). The suspension was incubated at 30 °C for 24 hours for pre-enrichment. After the pre-enrichment, 0.1 ml was taken and transferred to 10 ml Fraser Broth (Merck 1.10398.0500) and incubated

plex PCR using specific primer pairs (Table1).

Listeria spp., and *L. monocytogenes* PCR reactions were performed in a final volume of 50 µl including 5 µl 10X PCR Buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.1) and 0.1% Triton X-100) (Vivantis, ViBufferA), 5 µl 25 mM MgCl₂ (Vivantis, 50 mM), 250 µM each

deoxynucleotide triphosphate (Vivantis, NP2406 100mM), 20 pmol each primer (Biomatik, Canada), 1.25 U Taq DNA polymerase enzyme (Vivantis, PL1202 500 U) and 5 µl (25 ng) template DNA. Serotyping of *L. monocytogenes* was performed by mPCR described by Doumith et al. (2004). All PCR tests were carried out in Biorad-T100 thermal cycler (Biorad, USA). PCR amplification conditions were as follows: an initial denaturation at 94 °C for 3 min. 35 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 40s, annealing at 53 °C for 75 s and hybridization at 72 °C

for 75 s; final extension at 72 °C for 7 min. PCR products on gel were stained with Ethidium bromide (10 mg/ml) (Merck, 1.11608.0030), after electrophoresis at 110 V for 120 min. and visualized by ultraviolet transilluminator (Vilber Lourmat Quantum ST4) imaging system. For serotype definition was as such; if an isolate was determined as *lmo737* positive serotype 1/2a (or 3a), isolate was determined both *lmo737* and *lmo1118* positive determined as serotype 1/2c (or 3c), isolate was determined as *orf2819* positive determined as serotype 1/2b (or 3b), isolate was determined both *orf2819* and *orf2110* positive determined as serotype 4b (or 4d, 4e) (Figure 1). Reference strains of *L. monocytogenes* RSKK 471 (serotype 1/2a), *L. monocytogenes* RSKK 472 (serotype 1/2b), *L. monocytogenes* ATCC 7644 (serotype 1/2c) and *L. monocytogenes* RSKK 475 (serotype 4b) were used as positive control, as negative control sterile distilled water was used.

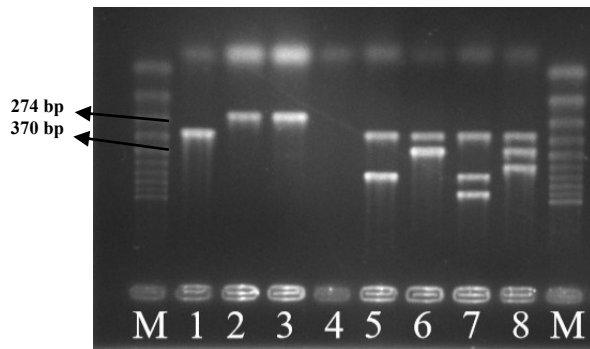


Figure 1. Serotype identification of *L. monocytogenes* isolates from chicken meat products by multiplex PCR

M: 100 bp DNA marker. Lane 1: *prs* gene positive *Listeria* sp. (370 bp) Lane 2: *prfA* gene positive *L. monocytogenes* (274 bp) Lane 3: Positive control (*L. monocytogenes* ATCC 7644) Lane 4: Negative control. Lane 5: *L. monocytogenes* serotype 1/2a (or 3a) (*Lmo0737* 691 bp) Lane 6: *L. monocytogenes* serotype 1/2b (or 3b) (*Orf2819* 471 bp). Lane 7: *L. monocytogenes* serotype 1/2c (or 3c) (*Lmo0737* 691 and *Lmo1118* 906 bp) Lane 8: *L. monocytogenes* serotype 4b (or 4d, 4e) (*Orf 2819* 471 and *Orf 2110* 597 bp)

Results

In PCR analysis, 60 isolates were found to contain *prs* genes and determined as *Listeria* spp. *Listeria* spp. detection rates were 24.1%, 23% and 70% in beef, sheep and chicken meat samples, respectively. Twenty out of 60 *Listeria* spp. isolates were identified as *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* contamination rate was found as 12.8% in overall meat samples. Contamination levels of *L. monocytogenes* were estimated as 14.8%, 9.6% and 14% in beef, sheep and chicken meat samples, respectively (Table 2).

In mPCR assays, four different serotypes (1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b) were observed among the 20 *L. monocytogenes* isolates. In this study, predominant serotype was 1/2c (55%), and followed 1/2a (25%), 4b (15%) and 1/2b (5%) in *L. monocytogenes* isolates, respectively (Table 3).

Table 2. Distribution of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in meat samples (%)

Meat samples	No. of samples (n)	<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
Beef	54	24.1% (13/54)	14.8% (8/54)
Sheep	52	23.0% (12/52)	9.6% (5/52)
Chicken	50	70.0% (35/50)	14.0% (7/50)
Total	156	38.5% (60/156)	12.8% (20/156)

Table 3. Serotype distribution of *L. monocytogenes* in meat samples

Meat samples	Number of serotype positive isolates (%)				Total isolates
	1/2a	1/2b	1/2c	4b	
Beef	0	0	6 (75)	2 (25)	8
Sheep	0	0	4 (80)	1 (20)	5
Chicken	5 (71.4)	1(14.3)	1 (14.3)	0	7
Total	5 (25)	1 (5)	11 (55)	3 (15)	20

Discussion and Conclusion

L. monocytogenes was detected in the meats of three animal species. Contamination rate was calculated as 12.8% in overall meat samples. The results obtained from this research (14.8%) are consistent with those of the studies conducted in other countries, although it was higher than the previous study carried out in Turkey. *L. monocytogenes* occurrence has been reported at 4.3-75% in beef meats especially 4.3% in Korea (Baek et al., 2000), 15.5% in Japan (Ochiai et al., 2010), 24.4% in Italy (Pesavento et al., 2010) and 75% in Iran (Mashak et al., 2015). The occurrence rate has been found to be between 0.9 and 6.32 % in Turkey (Cetinkaya et al., 2014; Dogruer et al., 2015).

L. monocytogenes has been isolated from various food sources mainly in meat and meat products (Norton and Braden, 2007). *L. monocytogenes* may contaminate in processes of animal production, slaughtering, selling or preparation of foods steps (Bouayad et al., 2015; Dogruer et al., 2015; Mead, 2004).

L. monocytogenes prevalence in chicken meats was reported as 14.3% in South Africa (Van Nierop et al., 2005), 20.2% in Turkey (Ayaz et al., 2009), 24.5% in Italy (Pesavento et al., 2010), and 30.2% in Korea (Baek et al., 2000). The prevalence of the agent revealed in this study (14%) was lower than those of the aforementioned studies. Interestingly, *L. monocytogenes* was detected in chicken meats by 14%, although isolation rate of *Listeria* spp. was 70%, higher *Listeria* spp. presence in chicken meats than red meat; might have resulted from cross contamination that happened during slaughtering excessive number of chicken per hour, bleeding, removal of feathers, evisceration and packaging steps (Mead, 2004).

L. monocytogenes occurrence in sheep meats were declared as 2% in India (Vinay Kumar et al., 2016), 8% in Iran (Mashak et al., 2015) and 16% in Romania (Carp-Carare et al., 2013), beside it was reported to be between 0-50 % in Turkey (Abay et al., 2012; Kahraman et al., 2005; Kocaman and Sarimehmetoglu, 2017). Reported studies in Turkey are Kocaman and Sarimehmetoğlu (2017) found that *L. monocytogenes* were in lamb meat samples of 15.8%, Abay et al. (2012) isolated *L. monocytogenes* in 50% of minced sheep meat samples. However, Kahraman et al. (2005) reported that they were not able to detect *L. monocytogenes* in lamb carcasses. In this study, *L. monocytogenes* frequency was defined to be 9.6% in sheep meat samples. The difference in prevalence of *L. monocytogenes* could be due to the regional difference, slaughter hygiene, sample types and counts and isolation methods.

L. monocytogenes causes abortions, septicemia and

central nervous system infections in humans. It was reported that among the food pathogens, *L. monocytogenes* has the highest mortality rate with 30%.

Consumption of foods contaminated with *L. monocytogenes* causes infection in humans (Schlech, 2000). So, the presence of *L. monocytogenes* on foods is limited via legislations in many countries. Zero tolerance policy on struggling with *L. monocytogenes* is applied in Turkey and many other countries such as the USA and European Union. According to this, 25 grams of ready-to-eat foods should not contain any *L. monocytogenes* agent (EFSA, 2015; Shank et al., 1996). However, no limit has been imposed on minced meat, red meats, chicken meats and meat preparations in Turkey (TFC, 2011). Determination of microbiological threats in meat products is substantial for taking precautionary measures against the risks that threaten human health.

In the current study, predominant serotype was 1/2c (55%), followed by 1/2a, 4b and 1/2b in *L. monocytogenes* isolates, respectively. Even 1/2c and 4b serotypes were isolated in beef meat samples in this study. Another study conducted in Estonian by Kramarenko et al. (2013) reports that common serotype was 1/2a, followed by 1/2c, 1/2b and 4b, respectively. Cetinkaya et al. (2014) demonstrated that common serotype in beef meats was 1/2a.

Although various studies have been conducted on the occurrence of *L. monocytogenes* in sheep meats, no data has been observed in literature upon serotype distribution in Turkey. To our knowledge, this is the first study to investigate the serotypes of *L. monocytogenes* from sheep meats. Most common observed serotypes were 1/2c (80%), secondly 4b (20%). This result is in agreement with result of a study in Romania (Carp-Carare et al., 2013).

Predominant serotypes in chicken meats vary from country to country. While Zhang et al. (2007) reported that the most prevalent serotype was 1/2b followed by 4b, Fallah et al. (2012) reported that the most common serotype was 4b and followed by 1/2a. The most dominant serotype was reported to be 1/2a in Turkey, Portugal and Estonia (Cetinkaya et al., 2014; Erol and Sireli, 1999; Guerra et al., 2001; Praakle-Amin et al., 2006; Siriken et al., 2014). This study revealed that the most predominant serotype was 1/2a (71.4%), followed by 1/2b and 1/2c in chicken meats. When overall the samples were evaluated, only 1/2c serotype was present in the meats of three animal species. Serotype 4b (15%) was indicated mostly in beef and sheep meat samples. Considering the serotype 4b, which is responsible for most human listeriosis cases, it can be asserted that beef and sheep meats may be riskier.

Rapid detection and accurate serotyping in Listeriosis cases are first steps of subtyping and revealing the transmission source and route of infection. Among the 14 serotypes of *L. monocytogenes* 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b serotypes are accounted for 95-98% of human listeriosis (CDC, 2016; Doumith et al., 2004; EFSA, 2015). Almost no serotype data has been introduced in human listeriosis cases in Turkey. Only 4b serotypes was reported in humans (Tekay et al., 2014).

Consequently, contamination of meats to different animal species by *L. monocytogenes* was found to be 12.8% and predominant serotype was 1/2c, followed by 1/2a. Serotype distribution of the pathogen in sheep meat samples was indicated for the first time in Turkey and most common serotype was detected as 1/2c. Comprehensive studies should be conducted on different sources mainly on animal foods to elucidate the presence of *L. monocytogenes*, contamination level and predominant serotype distribution. Also, the role of animal products in human listeriosis should be investigated by clarifying genetic relationships of human and animal isolates. To prevent listeriosis cases caused by meat samples, preventive measures in general hygiene and disinfection applications should be taken throughout the production line and during the cooking process.

Acknowledgements

We gratefully thank Prof. Dr. Göknur Terzi Gülel and Res. Asst. Dr. Tolga Uyanik, from the Department of Food Hygiene and Technology, Ondokuz Mayıs University, for supplying the reference strains of *L. monocytogenes*.

References

- Abay S, Aydın F, Sümerkan AB. Molecular typing of *Listeria* spp. isolated from different sources. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2012; 59(3): 183-90.
- Ayaz ND, Ayaz Y, Kaplan YZ, Kasımoğlu Doğru A, Aksoy MH. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in chicken carcasses by IMS-PCR. Ann Microbiol 2009; 59(4): 741-4.
- Baek SY, Lim SY, Lee DH, Min KH, Kim CM. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* from domestic and imported foods in Korea. J Food Protect 2000; 63(2): 186-9.
- Bouayad L, Hamdi TM, Naim M, Leclercq A, Lecuit M. Prevalence of *Listeria* spp. and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from broilers at the abattoir. Foodborne Pathog Dis 2015; 12(7): 606-11.
- Carp-Carare C, Vlad-Sabie A, Floristean CV. Detection and serotyping of *Listeria monocytogenes* in some food products from North-East of Romania. Rev Romana Med Lab 2013; 21(3): 285-92.
- CDC. Surveillance System Overview: The *Listeria* Initiative. https://www.cdc.gov/listeria/pdf/listeriainitiativeoverview_508.pdf; Accessed date:15.11.2016.
- Cetinkaya F, Elal Mus T, Yibar A, Guclu N, Tavsanlı H, Cibik R. Prevalence, serotype identification by multiplex polymerase chain reaction and antimicrobial resistance patterns of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. J Food Safety 2014; 34: 42-9.
- D'Agostino M, Wagner M, Vazquez-Boland JA, Kuchta T, Karpiskova R, Hoorfar J, Cook N. A validated PCR-based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model-towards an international standard. J Food Protect 2004; 67(8): 1646-55.
- Dogruer Y, Telli N, Telli AE, Güner A. Presence and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in retail meat and meat products. Int J Biol Res 2015; 3(2): 76-81.
- Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. J Clin Microbiol 2004; 42(8): 3819-22.
- EFSA. The European Union Summary Report. Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agent and Food-borne Outbreaks in 2015. EFSA Journal. 14(12), 4634. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4634>; Accessed Date: 16.07.2017.
- Erol İ, Şireli UT. Donmuş broiler karkaslarında *Listeria monocytogenes*'in varlığı ve serotip dağılımı. Turk J Vet Anim Sci 1999; 23(4): 765-70.
- Fallah AA, Saei-Dehkordi SS, Rahnama M, Tahmasby H, Mahzounieh MR. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Listeria* species isolated from poultry products marketed in Iran. Food Control 2012; 28(2): 327-32.
- Guerra MM, McLauchin J, Bernardo FA. *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. Food Microbiol 2001; 18(4): 423-9.
- Kahraman T, Büyükkunal SK, Çetin O. Microbiological contamination of lamb carcasses at abattoirs of İstanbul. Vet Glasnik 2005; 59(3-4): 437-44.
- Kerouanton A, Marault M, Petit L, Grout J, Dao TT, Brisabois A. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. J Microbiol Methods 2010; 80(2): 134-7.

- Kocaman N, Sarimehmetoğlu B. Isolation of *Listeria monocytogenes* in lamb meat and determination of the antibiotic resistance. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2017; 64(4): 273-9.
- Kramarenko T, Roasto M, Meremae K, Kuningas M, Poltsama P, Elias T. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. Food Control 2013; 30(1): 24-9.
- Mashak Z, Hamidreza AZ, Negin S, Afshin N, Basti A. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in different kinds of meat in Tehran province, Iran. Brit Food J 2015; 117(1): 109-16.
- Mead GC. Microbiological quality of poultry meat: a review. Braz J Poult Sci 2004; 6(3): 135-42.
- Norton DW, Braden CR. Foodborne listeriosis. Ryser ET, Marth EH. eds. In: *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Boca Raton, New York, US: CRC Press, 2007; pp. 305-56.
- Ochiai Y, Yamada F, Batmunkh O, Mochizuki M, Takano T, Hondo R, Ueda F. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in retailed meat in the Tokyo metropolitan area. J Food Protect 2010; 73(9): 1688-93.
- Pesavento G, Ducci B, Nieri D, Comodo N, Lo Nostro A. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. Food Control 2010; 21(5): 708-13.
- Praakle-Amin A, Hänninen ML, Korkeala H. Prevalence and genetic characterization of *Listeria monocytogenes* in retail broiler meat in Estonia. J Food Protect 2006; 69(2): 436-40.
- Schlech III WF. Foodborne listeriosis. Clin Infect Dis 2000; 31(3): 770-5.
- Shank FR, Elliot EL, Wachsmuth IK, Losikoff ME. US position on *Listeria monocytogenes* in foods. Food Control 1996; 7(4-5): 229-34.
- Siriken B, Ayaz ND, Erol I. *Listeria monocytogenes* in retailed raw chicken meat in Turkey. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2014; 127(1-2): 43-9.
- Tekay F, Özbek E, Kazancı E, Okur N, Demirel M, İpek MŞ. A case of neonatal sepsis due to *Listeria monocytogenes* serotype 4b: case report and literature review. Dicle Med J 2014; 41(3): 599-02.
- Turkish Food Codex (TFC) 2011. Microbiological Criteria Regulation. Republic of Turkey Ministry of Food, Agriculture and Livestock. Official Gazette: 29.12.2011. Issue: 28157, Ankara.
- Van Nierop W, Dusé AG, Marais E, Aithma N, Thothobolo N, Kassel M, Stewart R, Potgieter A, Fernandes B, Galpin JS, Bloomfield SF. Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter*. Int J Food Microbiol 2005; 99(1): 1-6.
- Vinay Kumar BN, Fairoza N, Madhavaprasad CB, Karabasanavar N, Kotresh AM, Nadoor P, Prashant S, Shilpa AG, Barbuddhe SB, Kurkure N, Chaudhary S. Molecular characterization and antibiogram of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken and mutton of retail markets. J Microbiol Inf Dis 2016; 6(2): 65-8.
- Zhang Y, Yeh E, Hall G, Cripe J, Bhagwat AA, Meng J. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. Int J Food Microbiol 2007; 113(1): 47-3.



Kedilerdeki Abdominal ve Ortopedik Hastalıkların Prevalansı*

Kurtuluş PARLAK¹, Mustafa YALÇIN¹, Eyüp Tolga AKYOL², Mustafa ARICAN¹

¹Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Cerrahi ABD, Konya-TÜRKİYE

²Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Cerrahi ABD, Balıkesir-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Kurtuluş PARLAK; E-posta: kparlak@selcuk.edu.tr; ORCID: 0000-0002-8656-037X

Atıf yapmak için: Parlak K, Yalçın M, Akyol ET, Arıcan M. Kedilerdeki abdominal ve ortopedik hastalıkların prevalansı. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020;17(1): 28-31.

Özet: Ülkemizde son yıllarda yapılan anket çalışmalarında %33' lük bir oranla kuşlardan sonra en çok kedi beslenildiği ve kedi sahiplenmelerinde ciddi bir artış olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla fakültemize gelen kedilerde sıklıkla gözlenen abdominal ve ortopedik hastalıkların belirlenmesi ve kedi sahiplerine, öğrencilere ve veteriner hekimlere, odaklanılması gereken öncelikli hastalıkların gösterilmesi amaçlanmıştır. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Cerrahi Kliniği' ne 2015-2018 yılları arasında getirilen 2347 kediden, ortopedik ve abdominal bölge kaynaklı şikayeti olan farklı ırk, yaş, cinsiyet ve ağırlıklara sahip 696 (%29.65) kedi çalışma materyalini oluşturdu. Anamnez ve Anabilim Dallarından (İç Hastalıkları, Doğum ve Jinekoloji) alınan konsültasyon bilgileri değerlendirildikten sonra klinik muayene, rutin sistemik kan ve biyokimyasal analizleri yapıldı. Ardından olguların teşhisi için tanısal işlemlere geçildi. Bunun için şüphelenilen bölgeye göre çeşitli pozisyonlarda (cranio-caudal, ventro-dorsal, dorso-ventral, latero-lateral vb.) direkt ve indirekt radyografik ve ultrasonografik muayeneler yapıldı. Getirilen toplam 2347 kedi içerisinde, %7.03 (n=165) abdominal ve % 22.62 (n=531) ortopedik problemlere rastlanılmıştır.

Anahtar kelimeler: Abdominal bozukluklar, kedi, ortopedik bozukluklar

Prevalence of Abdominal and Orthopedic Diseases in Cats

Summary: In recent years, a significant increase in cat ownership has been reported in our country. Cat owners are in the second place among other animal owners with a rate of 33%. Therefore, it is aimed to determine the frequently observed abdominal and orthopedic diseases in cats brought to our faculty and to evaluate the diseases that need to be focused on cats by the cat owners, students and veterinarians. Between 2015 and 2018, 696 (29.65%) cats out of 2347 with different breed, age, gender and weights that were brought to the surgery clinic with orthopedic and abdominal region complaints were used as study material. Clinical examination, routine systemic blood and biochemical analyzes were performed after evaluation of the patient history and consultation from the other departments (Internal Medicine, Obstetrics and Gynecology). Diagnostic procedures were performed to diagnose cases. For this purpose, direct and indirect radiographic and ultrasonographic examinations were performed in various positions (cranio-caudal, ventro-dorsal, dorso-ventral, latero-lateral, etc.). In the 2347 cats, 7.03% (n=165) abdominal and 22.62% (n=531) orthopedic problems were observed.

Key words: Abdominal problems, cat, orthopedic problems

Giriş

Günümüzde yoğun kentleşme ve teknolojinin ilerlemesi ile birlikte insan ve hayvanların yaşamını tehdit eden faktörlerde de ciddi bir artış görülmüştür. Evcil hayvanlarda travmaya sebep olan unsurların başında; trafik kazaları, yüksekten düşme, ateşli silah yaralanmaları, ısırık ve kesik yaraları gelmektedir. İnsanlarla etkileşimin çok fazla olması ve gündelik hayatın her alanında yer almalarından dolayı kedi ve köpeklerde bu tür travmalara sıklıkla rastlanılmaktadır. Özellikle kedilerdeki travma sebeplerinin başında yüksekten düşme ve trafik kazaları gelmektedir. Kedi ve köpeklerde travmatik yaralanmaların etiyojisini etkileyecek etmenler, başta trafik kazaları ve yüksekten düşme olmak üzere, hayvan kavgaları, ateşli

silah, kesici cisim yaralanmaları, güneş çarpması, donma ve kimyasal zehirlenmeler olarak sınıflandırılabilir (Parlak ve Arıcan, 2015).

Kediler köpeklerle karşılaştırıldığında strese daha duyarlıdır. Bununla birlikte zapt-ı rapt ve entübasyon zorlukları, aşırı anestezi ve hipotermi riskleri ile karşılaşılabilir. Ayrıca ilaçlara karşı yan etki görülme olasılığı daha sıktır. Anesteziye bağlı ölüm riski (%0.24) köpeklerden daha fazla olmaktadır (Görgül ve Topal, 2007).

Ortopedik problemlere sahip birçok kedide stres, ağrı ve sıvı kaybı bulunmaktadır. Buna bağlı olarak, yumuşak doku hasarı, kan kaybı ve enfeksiyon şekillenbilir. Travma ile beraber solunum, kardiyovasküler ve merkezi sinir sistemi problemleri de görülebilir. Ortopedik hastalıkların dağılımı incelendiğinde, özellikle osteoartritis'in görülme sıklığı %90' dir. Buna

Geliş Tarihi/Submission Date : 18.01.2019

Kabul Tarihi/Accepted Date : 10.09.2019

**Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenen 17202033 kodlu projeden özetlenmiştir.

Tablo 1. Ortopedik ve abdominal patolojisi bulunan kedilerin yaş, ağırlık ortalamaları ve cinsiyet yüzdeleri

Patolojik Olgular	Yaş (ort.)(ay)	Ağırlık (ort.)(kg)	Cinsiyet (%)
Abdominal	17.93	2.83	Dişi (36.36) Erkek (63.63)
Ortopedik	19.97	3.12	Dişi (39.73) Erkek (60.26)

rağmen kedilerdeki bazı ortopedik hastalıkların (osteoarthritis vb.) etiyolojisi, korunma ve tedavisi henüz tam olarak bilinmemektedir. Kedilerdeki ortopedik problemlerin belirlenmesinde hayvan sahiplerinin klinik gözlemleri çok önemlidir. Ayrıca klinisyenlerin ortopedik muayenelerini tam ve dikkatli bir şekilde yapmamaları da birçok ortopedik problemlerin gözden kaçmasına sebep olmaktadır. Bunun da önemli sebeplerinden biri çoğu kedinin muayene sırasında oldukça stresli olması ve buna bağlı olarak osteoarthritis gibi eklem problemlerini gizlemelerinden kaynaklanmaktadır (Gentry ve Mann, 1993; Scott ve McLaughlin, 2006).

Kediler insanlardan daha hızlı yaşlanır ve kendilerini iyi hissetmediklerinde sosyalleşmeleri oldukça zorlaşır. Ayrıca 12 yaşına kadar yılda bir kez veteriner hekim tarafından muayeneye edilirken, 12 yaşından sonra yılda iki kez mutlaka rutin muayeneye götürülmelidir. Yavru iken köpekler gibi eğitime gereksinim duymazlar. Ayrıca, köpeklerden daha iyi bir hafızaya sahiptirler. Herhangi bir konuyu 16 saat üzerinde hatırlarken, köpekler sadece 5 dakikayı hatırlarlar (Drum ve ark., 2015).

Sunulan çalışmadaki sonuçlar kedi sahipleri, öğrenciler ve veteriner hekimlere abdominal ve ortopedik problemlerde odaklanılması gereken önemli bilgiler vermeyi amaçlamaktadır.

Gereç ve Yöntem

2015-2018 yılları arasında, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Cerrahi Kliniği' ne getirilen 2347 kedi-den ortopedik ve abdominal bölge kaynaklı patoloji şikayeti bulunan değişik ırk, yaş, cinsiyet ve ağırlıklara sahip 696 (%29.65) kedi çalışma materyali olarak kullanıldı (Tablo 1). Hayvan sahiplerinden alınan anamnez ve Anabilim Dallarından (İç Hastalıkları,

Doğum ve Jinekoloji) alınan konsültasyon bilgileri değerlendirildikten sonra kedilerin klinik muayene, rutin sistemik kan ve biyokimyasal analizleri yapıldı. Ardından vakaların teşhisi için tanısal işlemlere geçildi.

Radyografik muayenede kliniğimizde bulunan Siemens tek tüplü sabit radyografi (Model: 483388, China) cihazından yararlanıldı. İstenilen bölgeye göre çeşitli pozisyonlarda (cranio-caudal, ventro-dorsal, dorso-ventral, latero-lateral vb.) direkt ve indirekt radyografik muayeneleri yapıldı.

Olguların ultrasonografik muayeneleri (Esaote Pie-medical, Model 410477, Netherlands) 5-7,5 mHz konveks prob ile yapıldı. Uygulama sırasında abdominal bölge tıraş edilerek, deri ile ultrason probu arasına transmisyon ultrason jeli uygulandı. Alınan görüntüler ve ultrason çıktıları kayıt altına alındı.

Bulgular

Abdominal patoloji dağılımı

Toplam 2347 kedi arasında, çalışmada değerlendirilen 165 kediye (%7.03) abdominal bölge patolojisine rastlanılmıştır. Alınan anamnez ve yapılan klinik muayene, radyografi ve ultrasonografi ile birlikte olgular sınıflandırılmıştır. Buna göre; sıklıkla %2.04 kolon ve rektum patolojileri (n=48), %1.70 yumuşak doku neoplazileri (n=40), %1.15 asites (n=27), %0.68 hernia diaframatika (n=16), %0.59 gastrointestinal sistemde yabancı cisim (n=14), %0.55 üriner sistem patolojileri (n=13), %0.21 hernia abdominalis (n=5), %0,08 kriptorşidi (n=2) olguları teşhis edilmiş ve sınıflandırılmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. Abdominal bölge patolojisi bulunan olguların sınıflandırılması

Sınıflandırma	Olgu Sayıları (Kedi/Adet)	Olguların Yüzde Değerlendirilmesi (%)
Kolon ve rektum patolojileri	48	2.04
Üriner Sistem Patolojileri	13	0.55
Sindirim Sisteminde Yabancı Cisim	14	0.59
Hernia Diaframatika	16	0.68
Asites	27	1.15
Hernia Abdominalis	5	0.21
Kriptorşidi	2	0.08
Yumuşak Doku Neoplazileri	40	1.70

Ortopedik patoloji dağılımı

Toplam 2347 kedi arasında, çalışmada değerlendirilen 531 kedide (%22.62) ortopedik patolojilere rastlanılmıştır. Alınan anamnez ve yapılan klinik muayene, radyografi ve ultrasonografi ile birlikte olgular sınıflandırılmıştır. Buna göre; %6.94 Femur (n=163), %4.55 Pelvis (n=107), %3.06 Tibia (n=72), %2.72 Vertebra (n=64), %1.91 Radius-Ulna (n=45), %1.70 Humerus (n=40), %0.72 Metacarpus (n=17), %0.46 Metatarsus (n=11), %0.38 Kranium (n=9), %0.12 Scapula (n=3), patolojileri teşhis edilmiş ve sınıflandırılmıştır (Tablo 3).

bilir (Nikousefat ve ark., 2018). Çalışmada değerlendirilen ve sistotomi yapılan ürolitiazis olgusuna sahip 13 (%0.55) erkek kedide tekrar ürolitiazis oluşumu gözlenmedi.

Hernia diaframatika olgularında, tüm abdominal organların toraks boşluğuna geçebileceği bildirilmektedir. Genellikle dalak, mide, karaciğer, ince bağırsaklar, omentum ve pankreas fıtıklaşan abdominal organlardır (Beşaltı ve ark., 2011). Çok nadir olmakla birlikte böbreklerinde toraks boşluğuna geçtiği belirtilmektedir (Tobias ve Johnston, 2012). Çalışmada 16 (%0.68) kedide hernia diaframatika gözlemlendi. Olguların değerlendirilmesinde özellikle karaciğer, dalak,

Tablo 3. Ortopedik problemi bulunan olguların sınıflandırılması

Sınıflandırma	Olgu Sayıları (Kedi/Adet)	Olguların Yüzdeler (%)
Kranium	9	0.38
Scapula	3	0.12
Humerus	40	1.70
Radius-Ulna	45	1.91
Metacarpus	17	0.72
Vertebra	64	2.72
Pelvis	107	4.55
Femur	163	6.94
Tibia	72	3.06
Metatarsus	11	0.46

Tartışma ve Sonuç

Abdominal bölge kaynaklı patolojilerin radyolojik muayenesinde; abdominal organ yoğunlukları az olduğu için değerlendirilmeleri güç olmuştur. Ayrıca abdominal boşluktaki sıvı da abdominal organların radyografik olarak değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu sıvının miktarına göre radyolojik görüntünün netliği değişmektedir. Genellikle iki görüntü özelliği görülür. Birincisi; radyografinin normale göre daha silik ve bulanık görülmesi, diğeri ise; bütün yapıların donuk ve büyümüş görülmesidir (Alkan, 1999; Arıcan, 2012). Çalışmamızda abdominal efüzyonlu 27 (% 1.14) kedi gözlemlendi. Latero-lateral alınan abdominal bölge radyografisinde efüzyondan dolayı net bir radyografik görüntü alınamadı ve abdominal organların sınırları belirlenemedi. Bundan dolayı ultrasonografiden yararlanıldı. Ultrasonografide özellikle abdominal boşlukta serbest olan sıvı anekoik görüntüldü.

Osborne ve Finco (1995)' te yaptıkları değerlendirmede, tedavi amacıyla kliniğe alt üriner sistem şikayeti ile getirilen kedilerin %5' ini ürolitiazis olgularının oluşturduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca erkek kedilerde üretranın anatomik olarak daha dar ve uzun olmasından dolayı ürolitiazis olgularının daha sık görüldüğü bildirilmiştir (Osborne ve Finco, 1995). Kedilerde sistotomi sonrası sık görülen bakteriyel sistite bağlı epitel döküntülerin, bakterilerin, kalsiyum oksalat taş kalıntılarının birikimi ile tekrar üretral tıkanıklık oluşa-

mide ve omentumun pleural boşluğa geçtiği görüldü. Fıtıklaşan organlar arasında böbreklere ise hiç rastlanılmadı.

Yapılan bir araştırmada 534 kedi incelenmiş ve abdominal patolojilerin değerlendirilmesinde; 513 kedide kilo kaybı (%96), 124 olguda polifaji (%23.2), 45 olguda polidipsi (%6.4), 20 olguda poliüri (%3.4), 4 olguda diare (%0.7), 4 olguda anoreksi ve hiporeksi (%0.7), 8 olguda (%1.5) ise herhangi bir klinik problem görülmemiştir. Genel olarak 315 kedide (%66.5) tek klinik semptom, 158 kedide (%29.6) iki klinik semptom, 13 kedide ise (%2.4) üç ve üzeri klinik semptom görüldüğü bildirilmiştir (Nussbaum ve ark., 2015). Alınan anamnezlere göre çalışmamızda gözlenen abdominal patolojiler ile ilişkili olarak bu gibi iki veya daha fazla klinik semptom birlikte görülmüştür. Bu klinik semptomların düzeltilmesi ve hastanın hayati fonksiyonlarının yerine getirebilmesi için sıklıkla karşılaşılan bu patolojiler sınıflandırılmıştır.

Kedilerde görülen ortopedik yaralanma oranları % 22.62 (n=531) olup bu olguların tedavileri için çeşitli cerrahi müdahaleler gerekmektedir. Cardoso ve ark. (2016) yaptıkları retrospektif bir çalışmada 141 kedide uzun kemik kırıklarını incelemişlerdir. Çalışma sonucuna göre en çok etkilenen kemikler sırasıyla; Femur (%50.84), Tibia-Fibula (%29.05), Radius-Ulna (%10.61) ve Humerus (%9.5) olarak bildirilmiştir (Cardosa ve ark., 2016). Genellikle bu olgulara %56 sıyrık, %26 ezik, %10 amfizem ve %8 büyük deri

yaralanmalarının da eşlik ettiği bildirilmiştir (Simpson ve ark., 2009; Streeter ve ark., 2009). Yapılan çalışmada kedilerde ortopedik problemlerin görülme oranı %22.62 olarak belirlendi. Kemiklerdeki dağılımları ise %6.94 Femur (n=163), %4.55 Pelvis (n=107), %3.06 Tibia (n=72) ve %2.72 Vertebra (n=64). Elde edilen sonuçların sıklıkla karşılaşılan kırık bölgelerinin benzerlik gösterdiğini ayrıca bölgemizde pelvis ve arka ekstremitte kırıkları ile fazlasıyla karşılaşılması da bu patolojilerin oluşumunda (yüksekten düşme, trafik kazaları) dikkatsiz hasta sahipleri ve otomobil kullanıcılarının birer etken olabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak kediler, toplumumuzda rolleri bulunan ve ortak yaşama dahil olan hayvanların başında gelmektedir. Bu sebepten, yaşam alanlarımızda bulunan kedilerin ortopedik ve abdominal hastalıklarına, etiyo-lojik değerlendirmeler sonucunda en fazla trafik kazalarının ve yüksekten düşmelerin sebep olduğu görülmüştür. Ortopedik ve abdominal hastalıklara sahip olan kedilerde, problemlerin teşhisi için özellikle veteriner hekimlerin sabırlı ve detaylı bir şekilde muayene etmeleri ve olası birden fazla problemin gözden kaçırılmaması gerekmektedir. Çalışmamızda sıklıkla rastlanan bu patolojilerin; veteriner hekimler, öğrenciler ve hasta sahiplerine öncelikli odaklanması gereken durumlar hakkında fikir verebileceği düşünülmektedir. Ayrıca tedavi sonucunda hasta takibini yapacak olan hasta sahipleri çok iyi bir şekilde hekim tarafından bilgilendirilmeli ve sürekli iletişim halinde olunmalıdır.

Teşekkür

17202023 kodlu proje ile bu tez çalışmasının yapılmasındaki katkılarından dolayı Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Alkan Z. Veteriner Radyoloji. Birinci Baskı. Ankara: Mina Ajans, 1999.
- Arıcan M. Veteriner Genel Radyoloji ve Kedi, Köpek için Tanısal Radyografi Atlası Cilt II. Birinci Baskı. Konya: 2012; ss. 330-48.
- Beşaltı Ö, Pekcan Z, Aykut G. A retrospective study on traumatic diaphragmatic hernias in cats. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2011; 58(3): 175-9.
- Cardoso CB, Rahal SC, Agostinho FS, Mamprim MJ, Santos RR, Filho ES, Mortari AC, Monteiro OB. Long bone fractures in cats: a retrospective study. Veterinaria Zootecnia 2016; 23(3): 504-9.
- Drum MG, Bockstahler B, Levine D, Marcellin-Little DJ. Feline rehabilitation. Vet Clin Small Anim 2015; 45(1): 185-201.
- Gentry SJ, Mann FA. Postoperative care of canine and feline orthopedic patients. J Am Anim Hosp

Assoc 1993; 29(2): 146-50.

Görgül SO, Topal A. Küçük Hayvan Pratiğinde Cerrahi Acil ve Kritik Olgu Hekimliği. Birinci Baskı. Bursa: UÜ Veteriner Fakültesi Yayınları 2007.

Nikousefat Z, Hashemnia M, Javdani M, Ghashghaii A. Obstructive bacterial cystitis following cystotomy in a Persian cat. Vet Res Forum 2018; 9(2): 199-203.

Nussbaum LK, Scavelli TD, Scavelli DM, Pintar J, Worwag S, Kittner HS. Abdominal ultrasound examination findings in 534 hyperthyroid cats referred for radioiodine treatment between 2007-2010. J Vet Intern Med 2015; 29(4): 1069-73.

Osborne CA, Finco DR. Canine and feline urolithiasis. Ed. In: Canine and Feline Nephrology and Urology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1995; pp. 798-889.

Parlak K, Arıcan M. Kedi ve köpeklerde travma hastalarında acil yaklaşım. Türkiye Klinikleri J Vet Sci Surg-Special Topics 2015; 1(3): 82-7.

Scott HW, McLaughlin R. Feline Orthopedics. First Edition. London: Manson Publishing Ltd 2006.

Simpson SA, Syring RS, Otto CM. Severe blunt trauma in dogs: 235 cases (1997-2003). J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) 2009; 19(6): 588-602.

Streeter EM, Rozanski EA, Laforcade-Buress A. Evaluation of vehicular trauma in dogs: 239 cases (January-December 2001). J Am Vet Med Assoc 2009; 235(4): 405-8.

Tobias KM, Johnston SA. Veterinary Surgery: Small Animal. First Edition. Missouri: Elsevier Saunders, 2012; 85(2): 3578-606.



Survey of *Theileria*, *Babesia* and *Anaplasma* Infections of Cattle and Ticks from Sivas Province of Turkey*

Kursat ALTAY¹, Ahmet Duran ATAS¹, Yusuf Ziya OGRAK², Erkan OZKAN¹

¹ University of Cumhuriyet, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Sivas-TURKEY

² University of Cumhuriyet, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Zootechnia, Sivas-TURKEY

Corresponding author: Kursat ALTAY, E-mail: kaltay@cumhuriyet.edu.tr; ORCID: 0000-0002-5288-1239

How the cite: Altay K, Atas AD, Ograk YZ, Ozkan E. Survey of *Theileria*, *Babesia* and *Anaplasma* infections of cattle and ticks from Sivas region of Turkey. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020;17(1): 32-38.

Summary: This study was carried out to investigate the presence and distribution of *Theileria*, *Babesia* and *Anaplasma* species in cattle and their ticks from Sivas province. A total of 314 EDTA-blood samples and 610 ticks were analysed. A part of 18S and 16SrRNA genes of *Theileria/Babesia* and *Anaplasma* species were amplified from the genomic DNAs extracted of the blood samples and tick pools by with polymerase chain reaction (PCR). A total of 14 probes (two catchall, two genera and ten species-specific) were bound on a membrane and then the PCR products were tested by reverse line blot (RLB) assay. The partial sequences of the 18S and 16S rRNA genes of representative positive samples were determined. According to the results of the blood and tick samples analysed by RLB and sequencing, *T. buffeli* (GenBank accession number: KJ183080), *A. centrale* (KJ183082), *A. marginale* (KJ183083), *A. bovis* (KJ183084), one *Babesia* genotype (*Babesia* sp. Sivas, KJ183081) and one *Anaplasma* genotype (*Anaplasma* sp. Sivas, KJ210855) were detected. *Babesia* sp. Sivas were found to be 99% identical with *B. occultans*, *Babesia* sp. Kashi and *Babesia* sp. Kayseri whereas *Anaplasma* sp. Sivas were found to be 99% and 98% identical with *Anaplasma* sp. Clone 7 and *A. bovis*, respectively. Overall prevalences of *Theileria* and *Anaplasma* infections in cattle were found to be 5.10% and 11.15% by RLB, respectively. This study is the first molecular survey on species of *Theileria*, *Babesia* and *Anaplasma* in cattle and ticks from Sivas.

Key words: *Anaplasma*, *Babesia*, cattle, *Theileria*, tick, Sivas

Sivas Yöresinde Sığır ve Kenelerde *Theileria*, *Babesia* ve *Anaplasma* Enfeksiyonlarının Araştırılması

Özet: Bu çalışmada, Sivas yöresinde sığır ve kenelerde *Theileria*, *Babesia* ve *Anaplasma* türlerinin varlığı ve yaygınlığının araştırılması amaçlandı. Sığırlardan toplanan 314 EDTA'lı kan ve 610 kene örneği analiz edildi. Kan ve kenelerden elde edilen genomik DNA'lardan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile *Theileria*, *Babesia* ve *Anaplasma* türlerinin 18S ve 16S rRNA parsiyal gen bölgeleri amplifiye edildi. Bir membran üzerine toplam 14 prob (iki cathall/genel, iki soy ve on tür) bağlandı ve PZR ürünleri reverse line blotting (RLB) ile analiz edildi. Pozitif örneklerin 18S ve 16S rRNA genlerinin kısmi dizileri belirlendi. RLB ve sekans analizi ile Sivas yöresinde sığır ve kenelerde; *T. buffeli* (KJ183080), *A. centrale* (KJ183082), *A. marginale* (KJ183083), *A. bovis* (KJ183084) ve bir *Babesia* genotipi (*Babesia* sp. Sivas, KJ183081) ile bir *Anaplasma* genotipi (*Anaplasma* sp. Sivas, KJ210855) tespit edildi. *Babesia* sp. Sivas izolatının, *B. occultans*, *Babesia* sp. Kashi ve *Babesia* sp. Kayseri izolatları ile %99, *Anaplasma* sp. Sivas izolatının ise *Anaplasma* sp. Clone 7 ile %99 ve *A. bovis* ile %98 benzerliğe sahip olduğu belirlendi. Sığırlarda *Theileria* ve *Anaplasma* enfeksiyonlarının genel prevalansı, RLB'de sırasıyla %5.10 ve %11.15 olarak bulundu. Bu çalışma Sivas yöresinde sığırlarda ve kenelerde *Theileria*, *Babesia* ve *Anaplasma* türlerinin belirlendiği ilk moleküler çalışma niteliğindedir.

Anahtar kelimeler: *Anaplasma*, *Babesia*, kene, sığır, Sivas, *Theileria*

Introduction

Theileria, *Babesia* and *Anaplasma* species are transmitted by ixodid ticks and infect domestic and wild animals throughout the world. The diseases cause important economic losses in livestock industry. Some of the species of these genera have zoonose potential and known as emerging infectious diseases (Inci et al., 2013; Inci et al., 2016; Uilenberg, 1995; Uilenberg, 2001).

Genetically and pathogenetically different six *Theileria* species have been found in cattle. *Theileria annulata* and *T. parva* are the most common pathogen *Theileria* species of cattle. These two species cause lympho-proliferative disease with high mortality. *T. sergenti/buffeli/orientalis* group, *T. mutans*, *T. velifera* and *T. taurotragi* are known as lower pathogenic or apathogenic species (Uilenberg, 1995). *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens* and *B. major* are caused bovine babesiosis. Bovine babesiosis is an important livestock problem in tropical and subtropical regions (Uilenberg, 1995). Bovine anaplasmosis is caused by *Anaplasma marginale*, *A. centrale*, *A. phagocytophilum* and *A. bovis* (Inokuma, 2007). *A. marginale* is the most important species among these

Geliş Tarihi/Submission Date : 16.07.2019

Kabul Tarihi/Accepted Date : 24.09.2019

*This work is supported by the Scientific Research Project Fund of Sivas Cumhuriyet University under the project number V005.

species and causes clinical infections characterized with anemia and jaundice. *A. centrale* causes mild infections in cattle (Dumler, 2001). *A. phagocytophilum* (compiled from previously known as *Ehrlichia phagocytophila*, *E. equi* and human granulocytic ehrlichiosis agent) is a causative agent of tick-borne fever (TBF) in cattle. TBF characterized by high fever, depression, decreased milk production and reduced fertility (Pusterla et al., 1997; Woldehiwet and Scott, 1993). *A. bovis* (previously *E. bovis*) infections have been reported mainly in Asian and African countries and much is not known about its epidemiology (Dumler et al., 2001). The infection is known asymptomatic but the pathogen can cause fever, anorexia, debility, incoordination, anemia, pale mucous membranes, weight loss, and enlargement of

sequencing.

Materials and Methods

Collection of blood and tick samples

The blood and tick samples were collected from cattle between April–September 2012 in Sivas (Sivas, Kangal, Koyulhisar, Şarkışla, Yıldızeli and Zara, Table 1). A total of 314 blood samples in tubes with EDTA were collected from apparently healthy animals above the age of one year from randomly selected 70 farms. All animals are maintained outside and accommodated in the barns during the night. Blood samples taken from all the animals were examined for the presence of tick infestation. The ticks were removed from the cattle manually and placed in

Table 1. The blood samples and tick species collected from cattle in Sivas

Location	n	<i>Hyalomma marginatum</i>	<i>Hyalomma excavatum</i>	<i>Rhipicephalus bursa</i>	<i>Rhipicephalus turanicus</i>	<i>Haemaphysalis sulcata</i>	<i>Boophilus annulatus</i>	<i>Dermacentor marginatus</i>	Total
Sivas	55	148	13	32	293	3	146	2	637
Kangal	55	5	-	76	-	-	-	8	89
Koyulhisar	52	171	43	1	-	-	-	-	215
Şarkışla	50	108	-	5	73	-	-	-	186
Yıldızeli	51	19	2	-	-	-	-	-	21
Zara	51	10	-	54	-	-	-	-	64
Total (%)	314	461 (38.04)	58 (4.78)	168 (13.86)	366 (30.20)	3 (0.25)	146 (12.05)	10 (0.82)	1212

lymph nodes, rarely abortion and death in cattle (Donatien and Lestoquard, 1936; Kaufmann, 1996).

Molecular diagnostic methods such as polymerase chain reaction (PCR) and PCR-based reverse line blotting (RLB) have become widely used as sensitive and specific tools for detection and discrimination of tick-borne parasites in both their vectors and hosts (Aktas et al., 2006; Aktas and Ozubek, 2015; Altay et al., 2008a, 2008b, 2008c; Altay et al., 2012; Altay et al., 2014; Ica et al., 2007b; Yildirim et al., 2013). The capability of simultaneous detection of multiple pathogens in one sample is the superiority of reverse line blotting (Altay et al., 2008a)

Babesiosis, theileriosis and anaplasmosis are the main tick-borne diseases in Turkey (Inci et al., 2016). These infections are endemic and seen in almost all regions of Turkey (Aktas et al., 2011; Altay et al., 2008a; Altay et al., 2014; Ica et al., 2007a, 2007b; Inci et al., 2013). Although Sivas has a suitable climate for presenting Ixodid ticks, there is not available research based on molecular diagnostic tools about tick-borne diseases in this city. This study was carried out to determine the presence and distribution of *Theileria*, *Babesia* and *Anaplasma* species in cattle and ticks using reverse line blot hybridization and

bottles containing 70% ethanol. The collected ticks were identified according to their morphological features under the stereo-microscope (Estrada-Pena et al., 2004; Merdivenci, 1969). Randomly selected 610 tick specimens were divided into 53 pools and used for total DNA extraction. The blood and tick samples were stored at -20°C until to use in DNA extraction.

Microscopic examination

Thin blood smears of all sampled animals were prepared with EDTA-blood samples during the field study. Having been returned to the laboratory, the blood smears were fixed in methanol for 5 min and stained with 4% Giemsa stain for 30 min. The stained blood smears were examined under microscope at 100x magnification for presence of *Theileria* spp., *Babesia* spp., and *Anaplasma* spp.. Approximately 100 microscopic field were examined per slide. Even when only one pathogen was seen in the microscopic examination the samples were recorded as positive.

Total DNA extraction from blood samples and tick pools

Total DNA extraction from EDTA-blood samples were performed using DNA extraction kit according to the

Table 2. *Theileria*, *Babesia* and *Anaplasma* genera and species specific primers and probes

Primer or probe	Sequences (5'-3')
Primers	
RLB-F2	GACACAGGGAGGTAGTGACAAG
RLB-R2	biotin-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT
16S8FE	GGA ATT CAG AGT TGG ATC ATG GCT CAG
B-GA1B	biotin-CGGGATCCCGAGTTTGCCGGGACTTCTTCT
Probes	
Catchall (<i>Theileria</i> spp.+ <i>Babesia</i> spp.)	Amino-TAATGGTTAATAGGA(AG)C(AG)GTTG
<i>Theileria</i> spp.	Amino-TGATGGGAATTTAAACC(CT)CTTCCA
<i>Theileria annulata</i>	Amino-CCTCTGGGGTCTGTGCA
<i>Theileria buffeli/orientalis</i>	Amino-GGCTTATTTCCGWTGATTTT
<i>Babesia</i> spp.	Amino-CCT(GT)GGTAATGGTTAATAGGAA
<i>Babesia bigemina</i>	Amino-CGTTTTTCCCTTTGTTGG
<i>Babesia bovis</i>	Amino-CAGGTTTCGCCTGTATAATTGAG
<i>Babesia major</i>	Amino-TCCGACTTTGGTTGGTGT
<i>Babesia divergens</i>	Amino-GTTAATATTGACTAATGTGCGAG
Catchall (<i>Anaplasma</i> spp.+ <i>Ehrlichia</i> spp.)	Amino-GGG GGA AAG ATT TAT CGC TA
<i>Anaplasma centrale</i>	Amino-TCG AAC GGA CCA TAC GC
<i>Anaplasma marginale</i>	Amino-GAC CGT ATA CGC AGC TTG
<i>Anaplasma (E.) bovis</i>	Amino-GTA GCT TGC TAT GRG AAC A
<i>Anaplasma (E.) phagocytophylum</i>	Amino-TTG CTA TRR AGA ATA RTT AGT GG

manufacturer's instructions (Gene JET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The frozen tick pools were crushed using sterile disposable pestles (Axygen Biosciences, Tewksbury, MA, USA) in liquid nitrogen in eppendorf tubes for extraction of total genomic DNA. The total DNAs were isolated using commercial kit (DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Germany) with regarding to manufacturer's recommendations. As a modification of this recommendation, the crushed ticks' pool samples were overnight incubated at 56°C in a shaking water bath with Proteinase K. All the extracted DNA samples were stored at -20°C until used in polymerase chain reaction.

Polymerase chain reaction and reverse line blotting

The hypervariable V4 region of 18S rRNA gene of *Theileria* and *Babesia* species and V1 region of 16S rRNA gene of *Anaplasma* species were amplified using two different primer sets (RLB-F2/RLB-R2 and 16S8FE/BGA1-B), the reverse primers of which are biotin-labeled by PCR (Georges et al., 2001; Schouls et al., 1999). The RLB-F2/RLB-R2 and 16S8FE/BGA1-B primer pairs amplify a 390-430 bp fragment of 18S rRNA gene of *Theileria* and *Babesia* species and a 492-498 bp fragment of 16S rRNA gene of *Anaplasma* species. The PCR products were hybridized with genus-and-species-specific probes for detection of *Theileria*, *Babesia* and *Anaplasma* species. Preparation, hybridisation and stripping of the RLB membrane were performed as previously reported in Aktas et al., (2011) and Altay et al., (2008a). The primers and oligonucleotide probes containing a N-(trifluoroacetamido)hexyl-cyanoethyl, N, N-diisopropyl

phosphoramidite [TFA]-C6 aminolinker were synthesized by a commercial company (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The sequences and references of the primers and oligonucleotide probes used in this study are listed in Table 2. All oligonucleotide probes used in this study were previously tested against different *Theileria*, *Babesia* and *Anaplasma* species and gave positive results with their corresponding species (Aktas et al., 2011; Altay et al., 2008a; Georges et al., 2001; Schouls et al., 1999). Bovine total genomic DNA isolated from non-infected calf blood was used as negative control.

DNA sequencing of 18S and 16S rRNA genes

The hypervariable V4 region of 18S rRNA gene of *Theileria-Babesia* species and V1 region of 16S rRNA gene of *Anaplasma* species were sequenced. The PCR products were purified from 1.6% agarose gel after electrophoresis with a commercial kit (Wizard SV gel and PCR clean-up system, Promega, Madison, WI, USA). The purified PCR products were sequenced by a commercial company (Iontek, Istanbul, Turkey)

The partial sequences of 18S rRNA gene for *T. buffeli* and *Babesia* sp. and 16S rRNA gene for *A. centrale*, *A. marginale*, *A. bovis*, and *Anaplasma* sp. were determined. After the sequences were subjected to BLAST similarity searches they were deposited in the EMBL/GenBank databases (GenBank database; National Center for Biotechnology Information, National Institute of Health).

Results

Prevalence of the tick-borne haemoparasites detected with the microscopic examination and RLB results of cattle from Sivas are given in Table 3. of 314 blood samples, 5.10% (16/314) were found as positive by microscopic examination, whereas 16.24% (51/314) were found as positive by reverse line blotting (Table 3).

Th. buffeli and *A. phagocytophilum* were not detected in the cattle. Single infection any of *Anaplasma* species and *T. buffeli* was determined in 45 (14.33%) cattle, whereas mixed infections were observed in 3 cattle (0.96%). Mixed infection of *T. buffeli*-*A. bovis* and *A. marginale*-*A. centrale* were detected in one (0.32%) and in two (0.64%) cattle, respectively.

The partial gene fragments of *Theileria*, *Babesia* and

Table 3. Microscopic examination and reverse line blotting results of cattle investigated for tick-borne haemoparasites (n: 314)

	Microscopic examination (%)	Reverse line blotting			
		Total infection (%)	Single infection (%)	Mixed infection (%)	
				<i>A. bovis</i>	<i>A. centrale</i>
<i>Theileria</i> spp.	5 (1.59)	16 (5.10)	15 (4.78)		
<i>T. buffeli</i>		16 (5.10)	15 (4.78)	1 (0.32)	0
<i>Anaplasma</i> spp.	11 (3.50)	35 (11.15)	30 (9.55)		
<i>A. centrale</i>		21 (6.69)	19 (6.05)	0	2 (0.64)
<i>A. marginale</i>		13 (4.14)	11 (3.50)	0	2 (0.64)
<i>A. bovis</i>		1 (0.32)	0	1 (0.32)	0
Total	16 (5.10)	51 (16.24)	45 (14.33)	1 (0.32)	2 (0.64)

Total prevalence of tick-borne haemoparasites in the cattle was found as 16.24% by RLB. Prevalence of *Anaplasma* spp. was 11.15%, whereas prevalence of *T. buffeli* was 5.10%. The most abundant *Anaplasma* species was identified as *A. centrale* (6.69%) followed by *A. marginale* (4.14%). *A. bovis* was detected in only one sample (0.32%). On the other hand, *T. annulata*, *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens*, *B. ma-*

Anaplasma spp. amplified by PCR were used in RLB and hybridised onto the membrane with specific oligonucleotide probes. All the PCR positive samples gave positive signals with their complementary probes. The reverse line blot assay revealed that *T. buffeli*, *Babesia* sp., *A. centrale*, *A. marginale*, *A. bovis* and *Anaplasma* sp. existed in the cattle and their tick (Table 3 and Table 4). Representative samples

Table 4. Tick pools used in reverse line blotting and results of reverse line blotting

Tick species	ntp	np	RLB results (positive pool numbers)			
			<i>Theileria</i> + <i>Babesia</i> positive	<i>Anaplasma</i> + <i>Ehrlichia</i> positive	<i>A. centrale</i>	<i>A. marginale</i>
<i>Hyalomma marginatum</i>	211	20	5	1	-	-
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	209	14	-	7	1	5
<i>Rhipicephalus bursa</i>	86	8	-	-	-	-
<i>Boophilus annulatus</i>	77	6	-	-	-	-
<i>Hyalomma excavatum</i>	22	3	1	-	-	-
<i>Dermacentor marginatus</i>	3	1	-	-	-	-
<i>Haemaphysalis sulcata</i>	2	1	-	-	-	-
Total	610	53	6	8	1	5

ntp: ticks number used in pools, np: tick pool numbers

were chosen and sequenced. BLAST similarity searches showed that sequence of *T. buffeli* (KJ183080), *A. centrale* (KJ183082), *A. marginale* (KJ183083) and *A. bovis* (KJ183084) shared 100% with sequences previously reported AF236094 (*T. buffeli*), JQ839010 (*A. centrale*), KF696858 (*A. marginale*) and U03775 (*Ehrlichia bovis*) identity, respectively. However, 8 samples from tick pools gave positive signals with catchall (6 with *Theileria+Babesia* and 2 with *Anaplasma+Ehrlichia* catchall) probes (Table 4).

The 6 samples also gave positive signal with *Babesia* genera-specific probe. However, the samples did not show any signal with the other species-specific probes. One for *Babesia* genus-specific probe positive and one for *Anaplasma+Ehrlichia* catchall probe positive representative samples of them were sequenced. *Babesia* genus-specific probe positive sample shared 99% identity to the 18S rRNA genes of *Babesia occultans* (KC157568), *Babesia* sp. Kashi (AY726557) and *Babesia* sp. Kayseri (EF434786). The sequence of *Anaplasma+Ehrlichia* genus probe positive sample was similar 99% to *Anaplasma* sp. Clone A7 (AY851664) and 98% to *A. bovis* (JN558822). The genotypes detected in the study were named *Babesia* sp. Sivas and *Anaplasma* sp. Sivas and deposited in GenBank with the accession numbers; KJ183081 and KJ210855, respectively.

During the survey, 87 (27.70%) of the 314 cattle were found to be infested with Ixodid ticks. A total of 1212 ticks were collected from the cattle. Seven different tick species were identified from the cattle. The most prevalent tick species was *H. marginatum* (38.04%) followed by *R. turanicus* (30.20%), *R. bursa* (13.86%). The other tick species detected from the cattle were *Boophilus annulatus* (12.05%), *Hyalomma excavatum* (4.78%), *Dermacentor marginatus* (0.82%) and *Haemaphysalis sulcata* (0.25%) (Table 1).

Discussion and Conclusion

Theileriosis, babesiosis and anaplasmosis are among the most important tick-borne diseases of domesticated animals. These infections, which are common in tropical and subtropical regions including Turkey, cause significant economic losses in animal husbandry (Dumler et al., 2001; Inci et al., 2013; Kocan et al., 2000; Uilenberg, 2001). *Theileria*, *Babesia* and *Anaplasma* species have morphological and biological differences as well as their pathogenicity. Comparative studies conducted at the molecular level in recent years have shown that there are significant genetic differences between species and there are differences even among the isolates of the same species (Altay et al., 2007; Ciloglu et al., 2018; Dumler et al., 2001; Duzlu et al., 2011).

Reverse line blotting, in addition to allowing the identification of new species or genotypes, has high specificity and sensitivity (Altay et al., 2008a; Gubbels et al., 1999; Nagore et al., 2004; Oura et al., 2004). In this study, using RLB method; the presence of *T. buffeli*, *A. centrale*, *A. marginale* and *A. bovis* was detected in cattle and ticks from Central Anatolian region of Turkey. In addition, two new isolates, one of which was in *Babesia* genus and the other in *Anaplasma* genus, were found in the region. There are molecular-based studies showing the presence of new tick-borne parasite isolates in Turkey (Altay et al., 2008a; Ica et al., 2007b). In this study, two catchall (*Theileria + Babesia* spp. and *Anaplasma + Ehrlichia* spp.), two strains (*Theileria* spp. and *Babesia* spp.) and 10 species specific probes (*T. annulata*, *T. buffeli*, *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens*, *B. major*, *A. centrale*, *A. marginale*, *A. bovis* and *A. phagocytophilum*) were used in RLB (Table 3). Six *Babesia* spp. probe positive and 2 *Anaplasma + Ehrlichia* spp. probe samples did not give signals to the species-specific probes in RLB. The *Babesia* sp. Sivas (KJ183081) was found 99% to be similar to the DNA sequences of *Babesia* sp. Kashi (AY726557) and *Babesia* sp. Kayseri (AY726557) where as *Anaplasma* sp. Sivas (KJ210855) were found to be 99% and 98% identical with *Anaplasma* sp. Clone 7 and *A. bovis*, respectively. The results of the study show the presence of new *Babesia/Anaplasma* species or genotypes in the region. In order to determine the effects of these isolates on animal husbandry, studies on determination of vector, host, prevalence and pathogenesis are needed.

There are many molecular-based studies aimed at detecting the presence and prevalence of theileriosis, babesiosis, anaplasmosis in cattle and ixodid ticks from Turkey (Aktas et al., 2011; Altay et al., 2008a; 2014; Ica et al., 2007a; 2007b; Yildirim et al., 2013). However, there is not any molecular-based research on tick-borne parasites in cattle in Sivas. This study is the first investigation of the parasites in cattle and their ticks from Sivas in the Central Anatolia Region of Turkey using RLB and DNA sequencing. In this study, 314 cattle were examined with RLB, the prevalences of *T. buffeli*, *A. centrale*, *A. marginale* and *A. bovis* were determined as 5.10%, 6.69%, 4.14%, and 0.32%, respectively. The results showed that tick-borne diseases prevalence is lower than in the other parts of Turkey. The main reason for this is that there are climatic and geographical differences in the region located in the continental climate zone.

It is important to diagnose disease in vector ticks, to understand their epidemiology and to develop appropriate control strategies. *T. lestoquardi* in *H. anatolicum* (Kirvar et al., 1998), *T. annulata* in *Hyalomma* sp. (d'Oliveira et al., 1997), *B. bigemina* and *B. bovis* in *B. microphilus* (Oliveira-Sequeira et al., 2005), *T. ovis* and *B. ovis* in *R. bursa* (Aktas et al., 2006; Altay

et al., 2008c) were detected with PCR and DNA sequencing. In the study, *H. marginatum*, *H. excavatum*, *R. bursa*, *R. turanicus*, *Hae. sulcata*, *B. annulatus* and *D. marginatus* were collected from cattle (Table 4). As a result of RLB and sequence analysis of the ticks pools, *A. centrale*, *A. marginale* and *Anaplasma* sp., in *R. turanicus* pools, *Babesia* spp. and *Anaplasma* spp., *H. marginatum*, *Babesia* spp. in *H. excavatum* pools were identified. The detection of pathogens in ticks does not prove that they are natural vectors, but they provide valuable contribution to the understanding of the diseases epidemiology.

As a result, in this study; *T. buffeli*, *A. centrale*, *A. marginale*, *A. bovis* and 2 new species or genotype (*Babesia* sp. Sivas and *Anaplasma* sp. Sivas) were determined by using molecular methods in cattle and ticks. The use of RLB method in such studies was found to be important in terms of revealing new species or genotypes. Further studies are needed on the identification of vector, host and pathogenesis of these genotypes.

Acknowledgements

We would like to thank veterinarians working in the region and the owners and employees of the farms for their cooperation during the field studies.

This work is supported by the Scientific Research Project Fund of Sivas Cumhuriyet University with the project number of V005.

References

- Aktas M, Altay K, Dumanli N. PCR-based detection of *Theileria ovis* in *Rhipicephalus bursa* adult ticks. *Vet Parasitol* 2006; 140(3-4): 259-63.
- Aktas M, Altay K, Dumanli N. Molecular detection and identification of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in cattle from Turkey. *Ticks Tick Borne Dis* 2011; 2(1): 62-6.
- Aktas M, Ozubek S. Molecular and parasitological survey of bovine piroplasms in the Black Sea Region, including the first report of babesiosis associated with *Babesia divergens* in Turkey. *J Med Entomol* 2015; 52(6): 1344-50.
- Altay K, Aktas M, Dumanli N. *Theileria annulata* Tams1 geninin PCR-RFLP analizi. *Turk Parazitol Derg* 2007; 31(3): 173-5.
- Altay K, Aydin MF, Dumanli N, Aktas M. Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. *Vet Parasitol* 2008a; 158(4): 295-301.
- Altay K, Aydin MF, Uluisik U, Aktas M, Dumanli N. *Theileria annulata* ve *Theileria buffeli*'nin teşhisinde multiplex PCR'in kullanılması. *Turk Parazitol Derg* 2008b; 32(1): 1-3.
- Altay K, Aktas M, Dumanli N. Detection of *Babesia ovis* by PCR in *Rhipicephalus bursa* collected from naturally infested sheep and goats. *Res Vet Sci* 2008c; 85(1): 116-9.
- Altay K, Dumanli N, Aktas M. A study on ovine tick-borne hemoprotozoan parasites (*Theileria* and *Babesia*) in the East Black Sea Region of Turkey. *Parasitol Res* 2012; 111(1): 149-53.
- Altay K, Dumanli N, Aktas M, Ozubek S. Survey of *Anaplasma* infections in small ruminants from East part of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2014; 20(1): 1-4.
- Ciloglu A, Inci A, Yildirim A, Onder Z, Duzlu O. *Babesia bigemina* Kayseri/Türkiye suşunun in vivo ve in vitro izolatlarında apikal membran antijen-1 proteininin moleküler karakterizasyonu ve ekspresyonu. *Ankara Univ Vet Fak Derg* 2018; 65(3): 239-46.
- d'Oliveira C, van der Weide M, Jacquet P, Jongejan F. Detection of *Theileria annulata* by PCR in ticks (Acari: Ixodidae) collected from cattle in Mauritania. *Exp Appl Acarol* 1997; 21(5): 279-91.
- Donatien A, Lestoquard F. *Rickettsia bovis*, nouvelle espèce pathogène pour le bœuf. *Bull Soc Pathol Exot* 1936; 29: 1057-61.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa F R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51(6): 2145-65.
- Duzlu O, Inci A, Yildirim A. Karadeniz bölgesi'ndeki sığırlardan elde edilen *Babesia bovis* suşlarının moleküler karakterizasyonu. *ERU Sag Bil Derg* 2011; 20(1): 18-28.
- Estrada-Pena A, Bouattour A, Camicas JL, Walker AR. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region. University of Zaragoza, Spain, 2004.
- Georges K, Loria GR, Riili S, Greco A, Caracappa S, Jongejan F, Sparagano O. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet Parasitol* 2001; 99(4): 273-86.
- Gubbels JM, de Vos AP, van der Weide M, Viseras J, Schouls LM, de Vries E, Jongejan F. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6): 1782-9.

- Ica A, Inci A, Yildirim A. Parasitological and molecular prevalence of bovine *Theileria* and *Babesia* species in the vicinity of Kayseri. Turk J Vet Anim Sci 2007a; 31(1): 33-8.
- Ica A, Vatanserver Z, Yildirim A, Duzlu O, Inci A. Detection of *Theileria* and *Babesia* species in ticks collected from cattle. Vet Parasitol 2007b; 148(2): 156-60.
- Inci A, Yazar S, Tuncbilek AS, Canhilal R, Doganay M, Aydin L, Aktas M, Vatanserver Z, Ozdarendeli A, Ozbel Y, Yildirim A, Duzlu O. Vectors and vector-borne diseases in Turkey (Review). Ankara Univ Vet Fak Derg 2013; 60(4): 281-96.
- Inci A, Yildirim A, Duzlu O, Doganay M, Aksoy S. Tick-borne diseases in Turkey: A review based on one health perspective. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10(12): e0005021.
- Inokuma H. Vectors and reservoir hosts of Anaplasmataceae. Raoult D, Parola P, eds. In: Rickettsial Diseases, Taylor & Grancis Group, LLC, New York. 2007; pp. 199-212.
- Kaufmann J. Parasitic Infections of Domestic Animals. Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin. 1996; p. 75.
- Kirvar E, Ilhan T, Katzer F, Wilkie G, Hooshmand-Rad P, Brown D. Detection of *Theileria lestoquardi* (*hirci*) in ticks, sheep, goats using polymerase chain reaction. Ann NY Acad Sci 1998; 849(1): 52-62.
- Kocan KM, Blouin EF, Barbet AF. Anaplasmosis control. Past, present, and future. Ann NY Acad Sci 2000; 916(1): 501-9.
- Merdivenci A. Türkiye Keneleri Üzerine Araştırmalar. 1. Baskı, Kutulmuş Matbaası, İstanbul, 1969.
- Nagore D, García-Sanmartín J, García-Pérez AL, Juste RA, Hurtado A. Identification, genetic diversity and prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in sheep population from Northern Spain. Int J Parasitol 2004; 34(9): 1059-67.
- Oliveira-Sequeira TCG, Oliveira MCS, Araujo JP, Amarante AFT. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. Int J Parasitol 2005; 35(1): 105-11.
- Oura CA, Bishop RP, Wampande EM, Lubega GW, Tait A. Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda. Int J Parasitol 2004; 34(5): 603-13.
- Pusterla N, Huder J, Wolfensberger C, Braun U, Lutz H. Laboratory findings in cows after experimental infection with *Ehrlichia phagocytophila*. Clin Diagn Lab Immunol 1997; 4(6): 643-7.
- Schouls LM, Van De Pol I, Rijpkema SG, Schot CS. Detection and Identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Bartonella* Species in Dutch *Ixodes ricinus* Ticks. J Clin Microbiol 1999; 37(7): 2215-22.
- Yildirim A, Duzlu O, Inci A, Onder Z, Ciloglu A. Sığırlarda *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina*'nın reverse line blotting, nested PCR ve real time PCR teknikleri ile karşılaştırmalı tanısı. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2013; 19(5): 895-902.
- Uilenberg G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. Vet Parasitol 1995; 57(1-3): 19-41.
- Uilenberg G. Babesiosis. Service MW, ed. In: Encyclopedia of Arthropod-Transmitted Infections of Man and Domesticated Animals, CABI Publishing, Wallingford. 2001; pp. 53-60.
- Woldehiwet Z, Scott GR. Tick-borne (pasture) fever. Woldehiwet Z, Ristic M, eds. In: Rickettsial Chlamydial Diseases of Domestic Animals, Pergamon Press, Oxford, 1993; pp. 233-54.



The Effects of Different Additives on the Fermentation and Physical Characteristics of Lenox Silage

Hıdır GÜMÜŞ, Fatma KARAKAŞ OĞUZ, Mustafa Numan OĞUZ, Kadir Emre BUĞDAYCI, Eren KUTER

Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Veterinary Medicine, Animal Nutrition and Nutritional Disease, Burdur-TURKEY

Corresponding author: Hıdır GÜMÜŞ; E-mail: hgumus@mehmetakif.edu.tr; ORCID: 0000-0001-7077-1036

How to cite: Gümüş H, Karakaş Oğuz F, Oğuz MN, Buğdaycı KE, Kuter E. The effects of different additives on the fermentation and physical characteristics of lenox silage. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020;17(1): 39-44.

Summary: The study was conducted to determine the effects of different additives on the fermentation and physical characteristics in Lenox Silage. For this purpose, Lenox sample was collected and chopped by using scissors. Then, Lenox was treated with 10% barley (B), 0.5% formic acid (FA), 5% sugar (S), and 5% molasses (M), respectively. Treated lenox samples with silage feed additives were ensiled in glass jar with 5 replicates for 90 days and, the silage was analyzed in terms of physical characteristics and fermentation pattern. The results revealed that the smell of Lenox silage in molasses and sugar group was significantly better in all other groups ($P<0.05$). No statistical difference was observed among all the groups in terms of structure and color value ($P>0.05$). Dry matter of the silage was significantly affected by addition of barley and molasses ($P<0.05$). Flieg point significantly increased by addition of molasses, but pH decreased ($P<0.05$). It was also found that ammonia-nitrogen/total nitrogen ($\text{NH}_3\text{-N/TN}$) concentration of the silage ranged from 0.48 to 0.67% but the difference between them was not statistically significant ($P>0.05$). Based on the results, Lenox silage can be used as an alternative in the field of animal nutrition and in the future studies.

Key words: Fermentation, lenox, silage

Farklı Katkı Maddelerinin Lenox Silajının Fermantasyon ve Fiziksel Özellikleri Üzerine Etkileri

Özet: Bu araştırma farklı katkı maddelerinin Lenox silajının fermantasyon ve fiziksel özellikleri üzerine etkilerini belirlemek için yapılmıştır. Bu amaçla, lenox örnekleri toplanmış ve makas kullanılarak parçalanmıştır. Lenox sırasıyla %10 arpa, %0,5 formik asit, %5 şeker ve %5 melas ile muamele edilmiştir. Silaj katkı maddeleri ile muamele edilen lenox cam kavanozlara beş tekerrürlü olarak 90 gün boyunca silolanmış ve silaj fermantasyon özellikleri ve fiziksel nitelikleri bakımından analiz edilmiştir. Melas ve şeker ilavesi yapılan lenox silajındaki koku, diğer gruplara göre önemli derecede iyileşmiştir ($P<0.05$). Gruplar arasında renk ve strüktür bakımından istatistik bir farklılık oluşmamıştır ($P>0.05$). Lenox silajına arpa ve melas ilavesi ile silajın kuru madde içeriği önemli derecede etkilenmiştir ($P<0.05$). Melas ilavesi ile Flieg puanı önemli derecede artmış, pH değeri azalmıştır ($P<0.05$). Silajın amonyak-azotu/toplam azot ($\text{NH}_3\text{-N/TN}$) konsantrasyonu %0.48 ile %0.67 arasında değişmiş ama aradaki fark istatistiki olarak önemli bulunmamıştır ($P>0.05$). Bu sonuçlar göz önüne alındığında, lenox silajının hayvan besleme alanında ve ileriki çalışmalarda alternatif olarak kullanılabilirliği ortaya çıkmıştır.

Anahtar kelimeler: Fermantasyon, lenox, silaj

Introduction

Turkey is situated in large Mediterranean geographical location, covering diverse regions that have different climates because of irregular topography. Although its coastal areas have moderate climatic conditions, inland areas of Anatolia are characterized by harsh hot summers and cold winters (Saadi et al., 2015). This region has some disadvantages in terms of extreme and harsh long winter conditions that limit animal and crop production (Neumann et al., 2016). It may not be possible to for animals to graze on natural rangelands of the region due to the necessity of keeping them inside during winter (Johansen et al., 2017). Thus, forage is required as silage and grass to maintain meat and milk productivity during winter season. Being required for microbial fermentation

(Chaucheyras and Fonty, 2001), roughage is the essential feedstuffs in ruminant ration. This situation is associated with the fact that there is a very serious lack of quality in forage in Turkey (Gemalmaz and Bilal, 2016). It becomes an advantage because silage supplies the need of quality in forage together with water especially when considering green feeds that are not available in winter (Şahin and Zaman, 2010).

Silage making technique has been extensively used in the Mediterranean region since 19th century. Maize was first ensiled in Hungary in 1860s (Neumann et al., 2016), and soon after in Turkey in 1931 (Şahin and Zaman, 2010). Silage is made of forages (e.g. Lucerne, maize, sorghum or other cereals), crop residues, agricultural or industrial by-products (Neumann et al., 2016). Silage is the main feedstuffs source for dairy and beef cattle ration (Cogan et al., 2017) supplied as high- energy forage (Rowghani and Zamiri,

2009). Economy depends naturally on agriculture because of being mainly based on animal production (Kara, 2016). Making good silage depends on adequate level of water soluble carbohydrates, anaerobic condition, exclusion of oxygen, pH level in silage (3.8 -4.2), low buffering capacity of the crop, moisture of green material, optimal temperatures, and nutritive value of the material (Neumann et al., 2016). By means of the silage additives that should be used to improve silage management. Silage additives such as absorbent (wheat, grain, sugar beet pulp), fermentation stimulants (microbial inoculants) and fermentation inhibitors (organic salts) have been used for years to improve the silage quality (Muck et al., 2018).

Mostly, corn silage has been used because of its dry matter yield, high energy level, and good fermentation ability (Ayaşan, 2011). For this reason, it can be asserted that the use of silage is essential to supply the increasing demand of forage in Turkey. Lenox is an annual forage plant grown in the all types of soil. It is planted as alfalfa and wheat at the 1.5-2 cm depth by using a mechanical or pneumatic drill. Lenox is harvested as 10-15 ton/decare per year in the fertilized soil. Being one of the fast-growing species, Lenox has a small leaf, a thick and brittle stem, and a height of 2-3 m within a year.

Lenox feed is added into the ration as green grass or silage. It contains crude protein in leaf and stem, by 22% and 18% respectively. Its silage contains crude protein of 20% and energy of 2400 kcal/kg (Ayaşan, 2011). Lenox (*Brassica Rapa* cultivar Polybra variety) is called "grass type of turnip or forage rape" (Ayaşan, 2011). *Brassica* cultivar, which have been used as forage for centuries. Short-season and full-season ones. While short-season *Brassica* cultivars include forage rape, full-season *Brassica* cultivars are kale (*Brassica oleracea* var. *acephalia*) and collards (Altınok and Karakaya, 2003). Both leaves and root of turnip (*Brassica Rapa* L.) are favorably consumed by dairy and beef cattle (Gemalmaz and Bilal, 2016).

In recent years, Lenox silage has been used in some cities of Turkey such as Kars, Artvin, and Burdur. However, there is not enough number of studies on Lenox silage and its effective usage on animal feeding in the literature. Therefore, the aim of this study was to determine the effects of different silage additives (Barley, molasses, formic acid, and sugar) on fermentation pattern and physical characteristics of Lenox silage.

Materials and Methods

This experimental study was conducted under laboratory conditions at the Animal Nutrition and Nutritional Diseases Department in the Veterinary Faculty of

Mehmet Akif Ersoy University located in Burdur (37° 43' North; 30° 16' East) in Turkey.

Preparation of lenox silage

To clarify the process, Lenox seeds were initially planted using 2-cm deep split row planter on 23 September 2014. Following this procedure, Lenox sample was planted during flowering stage from the farm between 15 March and 1 May 2015. Annual average temperature was about 15.1-16.2 °C in autumn and 11.6-12.6 °C in spring in Burdur.

Lenox was chopped into small pieces (2-2,5 particle length) cm size with a knife and scissors. Then, the silage additives were properly mixed with fresh Lenox in a basin. Mixed materials were ensiled in the 1-L glass jars by tamping in the laboratory. Then, five 1-L glass jars (100 mm in diameter x 170 mm in height) were filled for each treatment and a total of 25 glass jars were used in this experimental study. The treatment groups were 10% barley (B); 0.5% formic acid (FA); 5% (glucose) sugar (S), 5% molasses (M) and control (no additive-C) groups. After silages were kept at room temperature for 90 days, the silages were taken for analysis of dry matter content, silage pH, physical characteristics (PC), and Flieg point.

Experimental procedure, measurement, and analysis

Silage pH levels were determined using pH meter (Ecomet pH/mV/TEMP Meter p25) in silage extracts, prepared by adding 125 g demineralized water into 25 g silage and homogenizing it in a laboratory blender for 5 min (Filya, 2003). The Kjeldahl method and a Vapodest 10 Rapid Kjeldahl Distillation Unit (Gerhardt, Königswinter, Germany) were used to find total value of NH₃-N/TN (Broderick and Kang, 1980). While nutrient composition of Lenox plant was determined according to the AOAC (AOAC, 2003), crude fiber was determined by using the methods of Crampton and Maynard (Crampton and Maynard, 1938). The metabolizable energy levels of Lenox hay (Table 1) were determined by the methods of TSI (TSI, 1991). Its physical characteristics were determined by 3 researchers. Color properties (according to quality scores 0, 1 and 2), structure properties (according to quality scores 0, 1, 2 and 4) and smell properties (according to quality scores 0, 2, 4, 8 and 14) were determined according to the method of Kılıç (Kılıç, 1986). The quality score was divided into four as good total score (14-20), middle total score (10-13), utilizable total score (5-9), and low total score (0-4). Flieg point was calculated by using silage pH and dry matter content according to the following formula: [220 + (2 x Dry matter - 15) - 40 x pH] (Kara et al., 2009).

Statistical analysis

SPSS program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used with inferential statistics to analyze quantitative data. More specifically, the data were analyzed using one-way ANOVA and significant differences were calculated using Duncan's test (Dawson and Trapp, 2001) to determine whether or not any statistically significant result was found in the present study. The value of $P < 0.05$ was accepted as significance level.

Results

The main purpose of the present study was to see the effects of different feed additives on fermentation pattern and physical characteristics of Lenox silage. After the process, the results revealed that the nutrient content of upper part of the plant was higher compared to its lower part, as it can be seen in Table 1 regarding the nutrient content in chemical composition of the Lenox (%).

The results of the present study also showed that physical characteristics of Lenox silage (smell, structure and color) had statistically significant effects on the groups in terms of the quality (Table 2). Moreo-

ver, the smell of silage in formic acid group was less than in the other groups. Total quality score was significantly higher in formic acid group than in all the other groups and ranged from 15.00 to 19.50 points.

Differences in dry matter (%) of Lenox silage were found to be significant ($P < 0.05$) between the groups (Table 3). Barley group had the highest mean DM of 20.04 %, which was significantly higher than control group. The Lenox silage DM percentage was determined as lowest (15.27%) in FA group, which was less than Barley group at the rate of 20.04 %. However, no statistically significant difference was observed between sugar and control groups in terms of dry matter.

Highly significant differences were observed among all the groups in terms of flieg point of the Lenox silage (Table 3). Molasses group (84.08) had a significantly higher flieg point than all the other groups. The control group had the lowest flieg point (51.20). Similar results were obtained from barley, sugar, and formic acid groups.

Analysis of pH values revealed significant differences ($P < 0.05$) among the groups (Table 4). While the high-

Table 1. Chemical composition of Lenox hay (Dry matter, %)

	Upper part of Stem	Lower part of Stem
Dry matter (%)	89.85	89.72
Ash (%)	8.39	11.74
Organic matter (%)	81.46	77.98
Crude fiber (%)	22.29	30.79
Ether extract (%)	6.01	3.62
Crude protein (%)	21.77	17.58
Metabolizable energy (kcal/kg)	2229.45	1801.32

Table 2. Physical characteristics of (smell, structure and color) Lenox silage

Group (n=5)	Smell	Structure	Color	Total	Quality
Control	13.25 ^{ab} ± 0.28	3.67 ± 0.01	2.00 ± 0.01	18.92 ^{ab} ± 0.28	Good
Barley	13.20 ^{ab} ± 0.25	3.53 ± 0.08	2.00 ± 0.01	18.73 ^{ab} ± 0.29	Good
Formic acid	12.66 ^a ± 0.56	3.46 ± 0.13	1.74 ± 0.19	17.86 ^a ± 0.87	Good
Sugar	13.93 ^b ± 0.06	3.67 ± 0.01	2.00 ± 0.01	19.60 ^b ± 0.06	Good
Molasses	13.93 ^b ± 0.06	3.67 ± 0.01	1.94 ± 0.06	19.54 ^b ± 0.08	Good
P	0.03	0.19	0.26	0.07	

^{a,b,c} Means with different superscript in the same column are different ($P < 0.05$).

Table 3. The effects of various silage additives on dry matter and Flieg point in Lenox silage

Group (n=5)	Control	Barley	Formic acid	Sugar	Molasses	P
Dry matter	16.75 ^a ± 0.52	20.04 ^b ± 0.85	15.27 ^a ± 0.63	16.74 ^a ± 0.18	19.14 ^b ± 0.25	0.01
Flieg Point	51.20 ^a ± 5.86	66.11 ^a ± 2.50	56.66 ^a ± 7.20	60.55 ^a ± 8.59	84.08 ^b ± 2.24	0.001

^{a,b} Means with different superscript in the same row are different ($P < 0.05$).

Table 4. The effects of various silage additives on pH value and NH₃-N/TN (DM%) in Lenox silage

Group (n=5)	Control	Barley	Formic acid	Sugar	Molasses	P
pH value	4.68 ^{ab} ±0.16	4.68 ^{ab} ±0.15	4.47 ^{ab} ±0.02	4.44 ^{ab} ±0.08	3.98 ^a ±0.06	0.001
NH ₃ -N/TN	0.67±0.06	0.69±0.01	0.66±0.21	0.65±0.07	0.48±0.06	0.81

^{a,b} Means with different superscript in the same row are different ($P<0.05$).

est pH value was obtained from control group (4.68). Molasses group had significantly the lowest pH value among all the other groups. However, pH value of Lenox silage was similar to the control and barley groups (averagely 4.68%). Addition of sugar decreased pH value, if insignificantly ($P<0.05$).

There was no significant difference among the groups in terms of NH₃-N/TN (Table 5). Molasses group had lower mean NH₃-N/TN (0.48%) than that of the other groups, which was insignificant. NH₃-N/TN was averagely 0.66%, similar to the three silages.

Discussion and Conclusion

Physical characteristics (smell, structure, and color) of Lenox silage were significantly effective among the groups. The highest total score (smell score + structure score + color score) was observed in sugar group (19.60), whereas, the lowest total score was observed in formic acid (17.86). Toruk and Kayışoğlu (2008) reported that physical characteristics (smell, structure, color) of the corn silage was not effective at d 15 but smell and structure scores were higher than those of control group at d 80 (Toruk and Kayışoğlu, 2008). In the present study, the total quality score was higher in molasses group but lower in barley group compared with the control group, which was similar to the result obtained by Çetin, who found that addition of barley decreased total quality score of feed turnip silage (Çetin, 2017).

The flieg point of control group was significantly the lower compared to the other groups. The results of the present study were similar to those reported by Toruk and Kayışoğlu, who stated that flieg point in supplemented silage was higher than in non-supplemented corn silage (Toruk and Kayışoğlu, 2008). Researches (Toruk and Kayışoğlu, 2008) indicated a strong positive correlation between flieg point and silage quality. Flieg point was positively correlated with dry matter; whereas, it was negatively correlated with pH value of silage. Dry matter in Lenox silage with treated molasses was higher than control group but pH level was relatively lower. Thus, it can be suggested that the highest flieg point was observed in Lenox silage with treated molasses. In the present study, addition of formic acid decreased dry matter ratio and silage pH compared to the control group. The dry matter concentration in grass silage with barley was significantly higher and the pH value was significantly lower compared to the control

group and formalin group (Haigh and Davies, 1998). The another study (Silva et al., 2016) stated that the low pH value in silage is desirable to enhance the fermentation quality. It is possible that a quick in drop in pH causes the limitation of proteolysis and inhibits the spoilage microorganism in alfalfa silage. The ammonia-N level significantly decreased with addition of formic acid. In the present study, dry matter level and flieg point were significantly higher in Lenox silage treated with molasses; whereas, pH level and NH₃-N/TN were lower compared to control group. Researcher (Sanchez-Duarte et al., 2014) reported that a lower pH and higher NH₃-N was observed in canola silage (*Brassica napus L.*) compared to alfalfa silage (*Medicago sativa*). The effect of molasses was similar to that which was the results (Baytok et al., 2005) indicating that its usage significantly increased dry matter; however, it had no effect on pH. Nishino et al. reported that addition of molasses into grass silage increased dry matter; whereas, pH level and NH₃-N/TN concentration reduced at the end of 56-d (Nishino et al., 2012). The results of this trial showed that the sugar used in Lenox silage decreased dry matter concentration and pH while enhancing flieg point. The dry matter pattern in the present study was different from the results of Tai et al. indicating that the level of dry matter increased in sugar additive in maize silage compared to control group (Tai et al., 2003). Addition of formic acid decreased dry matter and pH value numerically; while increasing flieg point up to 10% compared to control group. The results showed parallelism with those of Rowghani et al. reporting that dry matter and pH value in silage treated with formic acid were lower than in the control group (Rowghani et al., 2009). This decrease can be attributed to the fermentation limitation by formic acid. Another study conducted with formic acid in grass silage showed (Baytok et al., 2005) an increase in dry matter concentration of grass silage when value of pH was reduced. The enhanced dry matter in grass silage treated with formic acid can probably be attributed to ensilage conditions and ensilage structure. This can be associated with the poorly packed silage material, air trapped in the silage, sludging and spoilage (Liu et al., 2018). When wilting time extended in silage, dry matter concentration increased and total protein content decreased. When dry matter concentration in the crop increased, microbial activity was inhibited and proteolysis was reduced during harvest and wilting. Thus, dry matter was negatively correlated to the amount of soluble NPN. Researchers

(Johansen et al., 2017) reported that while soluble N and NH₃-N of total N decreased, dry matter increased the concentration in silage.

Based on the results, it was concluded that Lenox silage treated with molasses had an enhanced the quality compared to the other groups. Lenox silage treated with molasses was higher than the other groups in terms of dry matter, pH value and flieg point. On the other hand, the good quality point was obtained in molasses group. The DM of silage is the important for silage quality. Therefore, the forage such as hay and straw could be added to increase the DM of silage. It is required to conduct further studies on lenox silage in order to determine the effects of fermentation pattern and physically characteristics.

References

- Altınok S, Karakaya A. Effect of growth season on forage yields of different brassica cultivars under Ankara conditions. *Turk J Agric* 2003; 27: 85-90.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis. USA; 2003 pp. 69-88.*
- Ayaşan T. Soya silajı ve hayvan beslemede kullanımı. *J Fac Vet Med Univ Erciyes* 2011; 8: 193-200.
- Baytok E, Aksu T, Karslı MA, Muruz H. The effects of formic acid, molasses and inoculant as silage additives on corn silage composition and ruminal fermentation characteristics in sheep. *Turk J Vet Anim Sci* 2005; 29: 469-74.
- Broderick GA, Kang JH. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *J Dairy Sci* 1980; 63: 64-75.
- Chaucheyras F, Fonty G. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. *Reprod Nutr Dev* 2001; 41: 57-65.
- Cogan T, Hawkey R, Higgin E, Lee MRF, Mee E, Parfitt D, Raj J, Roderick S, Walker N, Ward P, Wilkinson JM. Silage and total mixed ration hygienic quality on commercial farms: implications for animal production. *J Brit Grassland Soc* 2017; 72: 601-13.
- Crampton EW, Maynard LA. The relation of cellulose and lignin content to nutritive value of animal feeds. *J Nutr* 1938; 15: 383-95.
- Çetin İ. Farklı katkı maddeleri ile silolanan yem şalgamının (*Brassica rapa L.*) bazı kalite özelliklerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Uşak Üniv Fen Bil Enst, Uşak 2017; s. 1-31.
- Dawson B, Trapp RG. *Basic and clinical biostatistics. 3th ed. New York: Lange Medical Books McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2001.*
- Filya I. Nutritive value of whole crop wheat silage harvested at three stages of maturity. *Anim Feed Sci Tech* 2003; 103: 85-95
- Gemalmaz E, Bilal T. Alternatif kaba yem kaynakları. *Lalahan Hay Araş Enst Derg* 2016; 56: 63-9
- Haigh PM, Davies OD. Effect of formic acid with formalin or barley incorporation into grass silage on silage fermentation and the performance of dairy cows. *J Agr Eng Res* 1998; 69: 261-5.
- Johansen M, Hellwing ALF, Lund P, Weisbjerg MR. Metabolisable protein supply to lactating dairy cows increased with increasing dry matter concentration in grass-clover silage. *Anim Feed Sci Tech* 2017; 227: 95-106.
- Kara A. The effect of rangeland attributes on milk yield in rangeland dependent dairy cattle farms in Erzurum province of Turkey. *Univers J Agric Res* 2016; 4: 78-85.
- Kara B, Ayhan V, Akman Z, Adıyaman E. Determination of silage quality herbage and hay yield of different triticale cultivars. *Asian J Anim Vet Adv* 2009; 4: 167-71.
- Kiliç A. *Silage Feed (Teaching, education and practice recommendations), Bilgehan Printinghouse, Bornova. İzmir. 1986; pp. 1-327*
- Liu QH, Dong ZH, Shao T. Effect of additives on fatty acid profile of high moisture alfalfa silage during ensiling and after exposure to air. *Anim Feed Sci Tech* 2018; 236: 29-38.
- Mannetje L. *Silage for Animal Feed. <http://www.eolss.net/sample-chapters/c17/E6-58-07-05.pdf>. Available date: 15.02.2016*
- Muck RE, Nadeau EMG, McAllister TA, Contreras-Govea FE, Santos MC, Kung L. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *J Dairy Sci* 2018; 101: 3980-4000.
- Neumann M, Henrique E, Danubia H, Figueira N, Fernando G, Leão M, Cecchin D. Potential of corn silage production in different sowing times in the Paraná Midwest region. *Appl Res Agrotech* 2016; 9: 37-44.
- Nishino N, Li Y, Wang C, Parvin S. Effects of wilting and molasses addition on fermentation and bacte-

- rial community in guinea grass silage. *J Appl Microbiol* 2012; 54: 175-181
- Rowghani E, Zamiri MJ. The effects of a microbial inoculant and formic acid as silage additives on chemical composition, ruminal degradability and nutrient digestibility of corn silage in sheep. *Iran J Vet Res* 2009; 10: 110-8
- Saadi S, Todorovic M, Tanasijevic L, Pereira LS, Pizzigalli C, Lionello P. Climate change and Mediterranean agriculture. Impacts on winter wheat and tomato crop evapotranspiration, irrigation requirements and yield. *Agr Water Manage* 2015; 147: 103-15.
- Sanchez-Duarte JI, Corona JSS, Ochoa E, Gonzalez AR. Assessment of ensilability and chemical composition of canola and alfalfa forages with or without microbial inoculation. *Indian J Agric Res* 2014, 47: 421-8.
- Silva VP, Pereira OG, Leandro ES, Da Silva TC, Ribeiro KG, Mantovani HC, Santos SA. Effects of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential on the fermentation profile and chemical composition of alfalfa silage in tropical conditions. *J Dairy Sci* 2016; 99: 1895-1902.
- Şahin İF, Zaman M. An important cattle feed: Silage. *Eastern Geographical Review* 2010; 23: 1-17.
- Tai GW, Driehuis F, Wikselaar PV. The influences of addition of sugar with or without *L. buchneri* on fermentation and aerobic stability of whole crop maize silage ensiled in air-stress Silos. *Asian Austral J Anim* 2003; 12: 1738-42.
- Toruk F, Kayışoğlu B. Effect of applied vacuum of silage package machine on silage quality. *J Agric Mach Sci* 2008; 4: 355-60.
- Turkish Standarts Institution (TSI). Animal feeds-determination of metabolizable energy (Chemical method). TS-9610. 1991. Turkey, 2-3.



ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

Araştırma Makalesi / Research Article

17(1), 45-49, 2020

DOI: 10.32707/ercivet.705016

The Effect of Milkman on Productivity and Revenue in Dairy Herds*

Aytaç AKÇAY¹, Savaş SARIÖZKAN², Mehmet KÜÇÜKOFLAZ³, Güven GÜNGÖR³

¹Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biometrics, Kayseri-TURKEY

²Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Health Economics and Management, Kayseri-TURKEY

³Erciyes University, Graduate School of Health Sciences, Department of Zootechnics, Kayseri-TURKEY

Correspondence Author: Savaş SARIÖZKAN, E-mail: ssariozkan@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0003-2491-5152

How to cite: Akçay A, Sarıözkan S, Küçükoflaz M, Güngör G. The effect of milkman on productivity and revenue in dairy herds. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020;17(1): 45-49.

Summary: Nowadays, milking process in a dairy farm is carried out with the "animal, human and machine" trio closely related to each other. Expected success in milking process is ensured by the animal's accustomedness to the milking machine, the skill and experience of the milkman, and the functional conformity of the milking machine. The aim of this study was to determine the effect of milkman on milk productivity and revenue. As study material, average milk yields obtained from 387 milking of 35 Holstein cows raised in the farm was used. The cows were milked by 6 different milkmen. Linear Mixed Models were used to determine the effect of different milkman and milkman experience on the average milk yields. In addition, the difference in milk yields due to milkman was analyzed in terms of economy. In the study, it was determined that the individual milkman and milkman experience were significant for the average milk yields. Thus, a difference of 2.3 kg was determined between 1st milkman (the highest average milk yield; 22.6±0.46 kg), and 5th milkman (the lowest average milk yield; 20.3±0.76 kg), and the difference was statistically significant (P=0.011). This difference in the average milk yield was reflected in 80 liters of additional milk yield per day and 184 ₺ (31.9 \$) additional revenue increase achieved in the farm where 35 cows were milked. This difference in income corresponds to the cost of an insured worker. Milkman experience has been split in three categories, the difference between the average milk yield obtained by the least experienced milkman and the average milk yield of the most experienced milkman was found to be statistically significant (P=0.04). This case shows that the experienced milkman income about 156 ₺ (27.03 \$) more per day. In conclusion, it was determined that the milkman factor was important for the profitability of the farm in dairy cow. The experienced milkman may earn his own salary with the income increase provided for the farm, and, therefore, economically does not cost extra.

Key words: Cow, income, linear mixed models, milkman, productivity

Süt Sığırcılığı İşletmelerinde Sağımıcının Verimlilik ve İşletme Gelirine Etkisi

Özet: Günümüzde süt sığırcılığında sağım süreci birbiriyle yakından ilişkili olan "hayvan, insan ve makine" üçlüsü ile gerçekleştirilmektedir. Sağım sürecinde beklenen başarı, hayvanın sağım makinesine alışkanlığı, sağımıcının deneyimi ve sağım makinesinin fonksiyonel uygunluğu ile sağlanır. Bu çalışmanın amacı sağımıcının süt verimi üzerine ve işletme gelirine katkısını belirlemektir. Çalışma materyali olarak, 35 adet sağmal Holstein inek bulunan işletmeye ait 387 sağımdan elde edilen süt verimi ortalamaları kullanılmıştır. İnekler 6 farklı sağımıcı tarafından sağılmıştır. Araştırmada farklı sağımıcı ve sağımıcıların deneyimlerinin ortalama süt verimine üzerine etkisini belirlemek için Linear Mixed Models kullanıldı. Ayrıca sağımıcıdan kaynaklanan süt verimindeki fark ekonomik olarak analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda, bireysel olarak sağımıcının ve sağımıcı deneyiminin ortalama süt verimi üzerindeki etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir. Buna göre, 1. sağımıcı (en yüksek ortalama süt verimi; 22.6±0.46 kg) ve 5. sağımıcı (en düşük ortalama süt verimi; 20.3±0.76 kg) arasında günlük ortalama 2.3 kg'lık bir fark belirlenmiş ve bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P=0.011). Sağımıcıdan dolayı ortalama süt verimindeki fark; 35 sağmal ineğin bulunduğu işletmede günde yaklaşık 80 lt daha fazla süt verimi ve 184 ₺ (31.9 \$)'lik gelir artışı sağlamıştır. Bu gelir farkı, sigortalı bir işçinin maliyetine karşılık gelmektedir. Sağımıcı deneyimi üç kategoriye ayrılmıştır, en az deneyimli sağımıcıdan elde edilen ortalama süt verimi ile en deneyimli sağımıcıdan elde edilen ortalama süt verimi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P=0.04). Bu durum, deneyimli sağımıcının günde yaklaşık 156 ₺ (27.03 \$) daha fazla gelir getirdiğini göstermektedir. Sonuç olarak, süt sığırcılığı işletmesinin karlılığı için sağımıcı faktörünün önemli olduğu belirlenmiştir. Tecrübeli sağımıcının, kendi giderlerini karşılayacak kadar gelir artışı sağlayabileceği ve işletmeye ilave maliyet oluşturmayacağı ortaya çıkmıştır.

Anahtar kelimeler: Gelir, inek, lineer mixed model, sağımıcı, verimlilik

Introduction

Milk is a valuable animal product, for it contained

Geliş Tarihi/Submission Date : 15.10.2019

Kabul Tarihi/Accepted Date : 17.12.2019

essential amino acids, vitamins and minerals (Koyubenbe and Konca, 2006). About 22 million tons of milk is produced in Turkey and 90.58% of this amount constitutes the cow milk. Therefore, dairy cows has an important place in Turkish livestock production (Çukur and Saner, 2012; Yavuz et al., 2003;

*This paper was presented in the 3rd National Livestock Economics Congress in 2018.

TÜİK, 2018).

Livestock is a production sector where the highest profitability is targeted as in all commercial activities. The highest profitability can be achieved with high sales revenue and low production costs. Hence, human, cow, land, capital and other resources should be used rationally for higher profitability (Öz and Bilgen, 2002; Bakır and Kibar, 2019).

High milk yield (productivity) per animal in dairy cattle farms will increase sales revenue and have a positive impact on profitability. Milk yield may vary depending on some factors like gender, age, the number of lactations, nutrition, diseases, and milkman (Alpan and Arpacık, 1998).

As a result of diseases, unfavorable care and feeding conditions (management), and the resulting negative animal behavior adversely affect animal welfare, and accordingly, cause losses in product quantity and quality (Bozkurt et al., 2013; Knight et al., 1998; Hemsworth et al., 1998). This shows that there is a relationship between the caretakers' and milkman's attitudes and behaviors of caretakers and the behavioral responses of animals to humans (de Ondarza, 2019). It has been reported that human fear and related stress in cow may cause a decrease in milk yield (Rushen et al., 1999; Breuer et al., 2000). According to a previous study, it was observed that cows exposed to less stress during milking gave more milk than those under stress (Sreekumar, 2019). As a result of these, it is seen that human-animal interactions have a share on milk yield, which may have an effect (positive or negative) on profitability (Hemsworth et al., 1998; Lensink et al., 2001).

Nowadays, milking process in dairy cattle farms is carried out with the "animal, human and machine" trio

yield, and to determine the economic reflections of the milkmen on farm income.

Material and Methods

Study material calculated from average milk yields obtained from 387 milking result of an average of 35 milking Holstein cows on a dairy farm. The mean age and parity of cows were 4.2 ± 1.4 and 2.2 ± 1.1 respectively. Milk yield data were obtained from a farm with automatic milking unit (2x5 fishbone) and milking twice a day. Cows were milked by six different milkmen with the same level of education (primary school). The income was calculated from retail price of milk. The experience was divided into 3 categories as beginner (<2 years), intermediate (2-5 years) and advanced (>5 years).

Linear Mixed Models were used to determine the effect of different milkman and milkman experience on the average milk yields. Linear mixed models are extensions of simple linear models to allow both fixed and random effects, and are particularly used when there is no independence in the data, such as those arising from a hierarchical structure. In this study;

Linear mixed model:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + D_j + (S \times D)_{ij} + e_{ijk}$$

Y_{ijk} : Dependent variable (the average milk yields)

μ : Constant

S_i : Random and Repeated effect (Milkman)

D_j : Fixed effect (Experience)

$(S \times D)_{ij}$: Milkman and Experience interaction

e_{ijk} : Random Error term / Residuals

Table 1. Statistical significance of individual milkman effects on average milk yield

Milkman	Mean \pm SEM	Difference from 1 st milkman	Statistically Significance between the 1 st milkman (P value)
1 st	22.59 \pm 0.46	-	-
2 nd	21.03 \pm 0.56	1.56	0.035
3 rd	22.08 \pm 0.50	0.51	0.456
4 th	22.16 \pm 0.49	0.43	0.522
5 th	20.27 \pm 0.76	2.32	0.011
6 th	20.91 \pm 0.71	1.68	0.052

closely related to each other. Expected success in milking process is ensured by the animal's accustomedness to milking machine, the skill and experience of the milkman, and the functional conformity of the milking machine. In the literature, the effect of milkman on milk yield and sales income was not encountered directly.

In this study, it was aimed to investigate the effects of different, individual, and experienced milkmen on milk

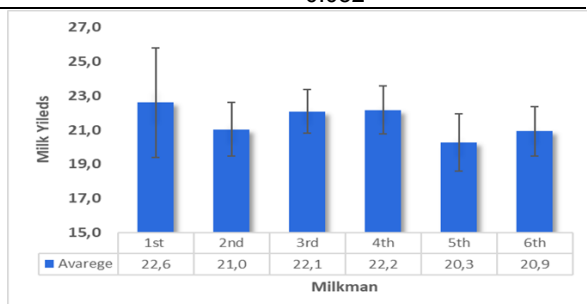


Figure 1. The average milk yields of milkman

Calculations were given both in TL (₺) and USD (\$). Data of milk yield were given as Mean±SEM ($\bar{X}\pm S\bar{x}$) in the tables.

(2.3 ₺-(0.40 \$) X 1.94 kg) and 156 ₺ (27.03 \$) per day for 35 cows. This result shows that the experienced milkman income about 156 ₺ (27.03 \$) more per day in this farm. This price corresponds to the cost of an insured worker (Table 4).

Results

Table 2. Statistical significance of milkman experience on average milk yield

Milkman Experience	Mean ± SEM	Difference from Advanced	Statistically Significance between the 1 st milkman (P value)
Advanced	22.59±0.59	-	-
Intermediate	21.71±0.33	1.06	0.07
Beginner	20.65±0.47	1.94	0.004

Table 3. The effect of milkman on dairy farm income*

Milkman	Income (₺-\$/day)	Total Income (₺-\$/farm)
1 st	36.2 ₺ (6.27 \$)	1.267 ₺ (0.22 \$)
2 nd	33.6 ₺ (5.82 \$)	1.176 ₺ (0.20 \$)
3 rd	35.4 ₺ (6.13 \$)	1.238 ₺ (0.21 \$)
4 th	35.5 ₺ (6.15 \$)	1.243 ₺ (0.22 \$)
5 th	32.5 ₺ (5.63 \$)	1.137 ₺ (0.20 \$)
6 th	33.4 ₺ (5.79 \$)	1.170 ₺ (0.20 \$)

* \$ information was obtained from TCMB on November 12, 2019

Table 4. The effect of milkman experience on dairy farm income*

Milkman Experience	Income (₺-\$/day)	Total Income (₺-\$/farm)
Advanced	36.2 ₺ (6.27 \$)	1.266 ₺ (0.22 \$)
Intermediate	34.7 ₺ (6.01 \$)	1.215 ₺ (0.21 \$)
Beginner	33.0 ₺ (5.72 \$)	1.154 ₺ (0.20 \$)

*\$ information was obtained from TCMB on November 12, 2019

In the study, it was determined that the individual milkman efficiency and milkman experience were significant on the average milk yields. According to this, a difference of 2.3 kg was determined between 1st milkman (the highest average milk yield; 22.6±0.46 kg), and 5th milkman (the lowest average milk yield; 20.3±0.76 kg) and the difference was statistically significant (P=0.011) (Table 1).

Milkman experience has been split in three categories, the difference between the average milk yield obtained by the least experienced (Beginner) milkman (20.6±0.47 kg) and the average milk yield of the most experienced (Advanced) milkman (22.6±0.59 kg) was found to be statistically significant (P=0.04) (Table 2).

In addition, the difference in milk yields resulting from milking was analyzed economically. The average milk yield difference due to milkman, the income is increased by approximately 3.7 ₺ (0.64 \$) per day for a cow (Selling price of 1 kg of milk (2.3 ₺ (0.40 \$)) X 2.32 kg) and 184 ₺ (31,9 \$) per day for 35 cows (Table 3).

The average milk yield difference due to milkman experience, the income is increased by approximately 3 ₺ (0.52 \$) /day/cow (Selling price of 1 kg of milk

Discussion and Conclusion

Human factor is one of the factors affecting animal health and productivity in dairy cows and milkman plays an important role in effective management of animals. In addition, it has been reported that technical training and experience of milkman's on the behavioral characteristics of cow can increase milk yield by applying more effective and stress-free management on animals (de Ondarza, 2019).

In this study, it was determined that the individual and experience characteristics of six different milkmen's had an effect on milk productivity. Similarly, in many studies investigating the effects of herd management and animal welfare on milk yield, it has been stated that milkman experience had a positive effect on milk productivity (Özdemir and Singin 2016; Göncü et al. 2016; Rushen et al. 2001; Akbaş, 2013). However, Munksgaard et al. (2001) reported that milkman experience did not increase the productivity of dairy cow. According to the results of this study, the difference (2.3 kg/day) between 1st milkman (highest mean milk yield; 22.6±0.46 kg) and 5th milkman (mean milk yield; 20.3±0.76 kg) was found statistically significant (P=0.011). Due to this difference in the average milk yield, 80 liters of additional milk yield per day and 184 ₺ (31.89 \$) additional revenue increase were

achieved in the farm where 35 cows were milked. This income difference corresponds to the cost of an insured worker. Six milkmen were divided into three categories according to experience level and difference was found to be statistically significant ($P=0.04$) between the milk yield obtained from the lowest and highest experienced milkman (20.6 ± 0.47 kg - 22.6 ± 0.46 kg). This result showed that the income from experienced milkman is about 156 ₺ (27.03 \$) more per day. This means that experienced milkman caused 4.4 ₺ (0.76 \$) /cow more income per day. As de Ondarza (2019) pointed out, the differences that arise with the experience of the milkman and the milkman can be thought to be due to the fact that the milkman communicates with the animals, acts in a reassuring manner and milking in a stress-free. In addition, experienced milkmen are thought to have more information than lower experienced milkmen about animal behavior, use of milking machines, hygiene and management.

In conclusion, it was determined that the milkman factor was important for the profitability of dairy farming. The experienced milkman may earn its own salary with his provided income increase to the farm and by this way milkman may not cost extra. Therefore, milkmen should be training in terms of animal behavior and hygiene in dairy farms.

References

- Akbaş A. Çiftlik hayvanlarında davranış ve refah ilişkisi. *MAKÜ Sağlık Bil Enst Derg* 2013; 1(1): 42-9.
- Alpan O, Arpacık R. Sığır Yetiştiriciliği. 2. Baskı, Ankara: Şahin Matbaası 1998; ss. 184-97.
- Bakır G, Kibar M. Muş ilinde bulunan süt sığırcılığı işletmelerinin bazı yapısal özelliklerinin CROSTAB analizleriyle belirlenmesi *KSÜ Tar Doğa Derg* 2019; 22(4): 609-19.
- Bozkurt Z, Kılıç İ, Hacıoğlu ÖG, Lenger ÖF. İnsan-hayvan etkileşimlerinin hayvan refahına etkisi. *Kocatepe Vet Derg* 2013; 6(1): 41-50.
- Breuer K, Hemsworth PH, Barnett JL, Matthews LR, Coleman GJ. Behavioural response to humans and the productivity of commercial dairy cows. *Appl Anim Behav Sci* 2000; 66(4): 273-88.
- Çukur F, Saner G. Süt sığırcılığının geliştirilmesinde birliklerin rolü ve önemi: Milas ilçesi süt üreticileri birliği örneği. X. Tarım Ekonomisi Kongresi. September, 5-7, 2012; Konya-Türkiye.
- de Ondarza MB, Behaviour. <http://www.milkproduction.com/Library/Scientific-articles/Animal-welfare/Behavior/>, Accessed Date: 21.08.2019.
- Göncü S, Koluman N, Serbester U, Görgülü M. Süt sığırcılığında refah istekleri ve kritik kontrol noktaları. *Çukurova Tarım ve Gıda Bil Derg* 2016; 31(1): 9-20.
- Hemsworth PH, Coleman GC. Human-livestock interactions-the stockperson and the productivity and welfare of intensively farmed animals. *JSAVA* 1998; 69: 92-2.
- Hemsworth PH. Human-animal interactions in livestock production. *Appl Anim Behav Sci* 2003; 81(3): 185-98.
- Knight CH, Peaker M, Wilde CJ. Local control of mammary development and function. *Rev Rep* 1998; 3(2): 104-12.
- Koyubenbe N, Konca Y. İzmir ili Ödemiş ilçesi süt sanayiindeki gelişmeler üzerine bir araştırma. *Hayvansal Üretim* 2006; 47(1): 47-53.
- Lensink BJ, Fernandez X, Cozzi G, Florand L, Veissier I. The influence of farmers' behavior on calves' reactions to transport and quality of veal meat. *J Anim Sci* 2001; 79(3): 642-52.
- Munksgaard L, DePassillé AMB, Rushen J, Herskin MS, Kristensen AM. Dairy cows' fear of people: social learning, milk yield and behaviour at milking. *Appl Anim Behav Sci* 2001; 73(1): 15-26.
- Öz H, Bilgen H. Bilgisayar destekli sürü yönetimi. Tarım Araştırma Yayın Eğitim Koordinasyonu (TAYEK) hayvancılık grubu bilgi alışveriş toplantısı bildirileri. Nisan, 24-26, 2002; Menemen/İzmir-Türkiye.
- Özdemir G, Singin E. Sığırlarda barınak, nakil ve insan-hayvan etkileşimi gibi bazı faktörlerin hayvan refahı üzerine etkileri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2016; 13(3): 215-22.
- Rushen J, DePassillé AMB, Munksgaard L. Fear of people by cows and effects on milk yield, behavior, and heart rate at milking. *J Dairy Sci* 1999; 82(4): 720-7.
- Rushen J, Munksgaard L, Marnet PG, DePassillé AMB. Human contact and the effects of acute stress on cows at milking. *Appl Anim Behav Sci* 2001; 73(1): 1-14.
- Sreekumar D, Experiment-8 full-hand milking of a dairy cow/buffalo. <http://14.139.40.199/bitstream/123456789/45102/1/Experiment-8.pdf>; Accessed Date: 12.10.2019.
- Türkiye Cumhuriyeti Merkez Bankası (TCMB). <http://www3.tcmb.gov.tr>. Accessed Date:12.11.2019
- Türkiye İstatistik Kurumu (TUIK). Hayvancılık İstatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr/>. Accessed Date:

09.09.2019.

Yavuz F, Akbulut Ö, Keskin A. Türkiye sığırcılık sektöründe ıslah ve destekleme politikalarının etkinliği üzerine bir araştırma. Turk J Vet Anim Sci 2003; 27: 645-50.



Effect of Prostaglandin E2 on Corpus Luteum Function During Early Luteal Phase in Sheep

Aykut GRAM

Erciyes University, Faculty of Veterinary, Department of Histology and Embrology, Kayseri-TÜRKİYE

Corresponding author: Aykut GRAM, E-mail: aykutgram@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0002-7490-5836

How to cite: Gram A. Effect of Prostaglandin E2 on Corpus Luteum Function During Early Luteal Phase in Sheep. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020;17(1): 50-56.

Summary: Prostaglandins (PGs) in particular PGE2 by regulating luteal angiogenesis and steroidogenesis, play an important role in ovarian as well as luteal function in many mammalian species. While the direct luteotropic effect of PGE2 has been studied intensively, there is still not much information available regarding the indirect effects of PGE2 in ovine corpus luteum (CL). Therefore, in the present study, possible effects of PGE2 stimulation on expression of some steroidogenic hormone receptors (ER α /ER1, ER β /ER2 and PGR) and growth factors (IGF1, IGF2 and VEGF) were investigated using the isolated primary luteal and -microvascular endothelial cells. Neither the expression of steroidogenic hormone receptors (ER α /ER1, ER β /ER2 and PGR) nor growth factors (IGF1, IGF2 and VEGF) were affected by PGE2 stimulation in primary luteal cells. However, there was statistically significant difference for the expression of both ER α /ER1 and ER β /ER2 following PGE2 treatment in primary microvascular endothelial cells. Moreover, while the expression of IGF2 was upregulated, there was no statistically significant change for the expression of IGF1 and VEGF following PGE2 treatment in ovine primary microvascular endothelial cells. In conclusion, by regulating expression of estrogen receptors (ER α /ER1 and ER β /ER2) and IGF2 in ovine luteal endothelial cells, PGE2 might involve in luteal angiogenesis and vasculogenesis during early luteal phase in sheep.

Key words: Corpus luteum, prostaglandin E2, sheep

Prostaglandin E2'nin Koyunlarda Erken Luteal Dönemde Korpus Luteum Üzerine Etkisi

Özet: Prostaglandinler (PG'ler) özellikle de PGE2 luteal anjiyogenezis ve steroidogenezis'i düzenleyerek, birçok memeli türünde ovaryumun yanı sıra luteal fonksiyonun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. PGE2'nin direkt luteotropik etkisi yoğun olarak çalışılsa da PGE2'nin koyun korpus luteumundaki (CL) indirekt etkileri hakkında hala çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada, korpus luteumdan izole edilen primer luteal ve mikrovasküler endotel hücreleri kullanılarak, PGE2 stimülasyonunun bazı steroidogenik hormon reseptörlerinin (ER α / ER1, ER β / ER2 ve PGR) ve büyüme faktörlerinin (IGF1, IGF2 ve VEGF) ekspresyonu üzerindeki olası etkileri araştırılmıştır. Primer luteal hücrelerin PGE2 ile stimülasyonunu takiben ne steroidogenik hormon reseptörlerinin (ER α / ER1, ER β / ER2 ve PGR) ne de büyüme faktörlerinin (IGF1, IGF2 ve VEGF) ekspresyonu etkilendi. Ancak, PGE2 ile primer mikrovasküler endotel hücrelerinin stimülasyonunu takiben ER α / ER1 ve ER β / ER2'nin ekspresyonu belirgin olarak arttı. Aynı zamanda, primer mikrovasküler endotel hücrelerinde IGF2'nin ekspresyonu upregüle olurken, IGF1 ve VEGF'in ekspresyonu PGE2 stimülasyonundan etkilenmedi. Sonuç olarak, PGE2 östrojen reseptörlerinin (ER α / ER1 and ER β / ER2) ve IGF2'nin ekspresyonunu düzenleyerek erken luteal dönemde luteal anjiyogenez ve vaskülogeneze katıldığı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Korpus luteum, koyun, prostaglandin E2

Introduction

Following ovulation, the remnants of the granulosa and the theca cell layer of the Graafian follicle turns into a temporary endocrine gland called a corpora lutea (CL) (Channing et al., 1980; Smith et al., 1994; Fraser and Wulff, 2003). Rapid and intense blood vessel formation and supply, which are important for the establishment and maintenance of CL as well as

progesterone (P4) production, are observed during formation of CL (Suzuki et al., 1998; Grazul-Bilska et al., 2007; Martelli et al., 2009). In the CL, vascularization and angiogenesis are regulated by a variety of locally produced growth factors such as, fibroblast growth factors (FGFs), vascular endothelial growth factor (VEGF)-system and angiopoietins (Angpts). Furthermore, locally produced luteotropic factors i.e. prostaglandins (PGs), P4 and estrogens (E2) are involved in the maintenance of this temporary endocrine gland (CL).

Prostaglandins are known as a fatty-acid hormone

Geliş Tarihi/Submission Date : 26.11.2019

Kabul Tarihi/Accepted Date : 28.01.2020

synthesized following the liberation of 20-carbon unsaturated fatty acid derivate arachidonic acid from the cellular plasma membrane by phospholipaseA2 (Smith and Dewitt, 1996). Then, this released arachidonic acid is converted into the prostaglandin H2 (PGH2) the main precursor of the different PGs, by means of cyclooxygenases (COXs) (Smith and Dewitt, 1996). While COX1 is constitutively expressed in most of the mammalian cells, expression of PTGS2/COX2 is induced by an inflammatory and proliferative stimulus (Smith and Dewitt, 1996). Prostaglandin E2, prostacyclin (PGI2), PGD2 and PGF2 α are produced from the PGH2 with the aid of specific enzymes (Tai et al., 2002).

Among PGs, particularly PGE2 plays important roles in angiogenesis, cellular proliferation and blood supply (Namkoong et al., 2005; Trau et al., 2016). PGE2 mediates its signal through four PGE2 receptors, PTGER1, -2, -3 and -4 (also known as EP1, EP2, EP3 and EP4) (Castellone et al., 2005; Cha et al., 2007). Activation of PTGER2 (EP2) and PTGER4 (EP4) increases production of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), an activator of PKA signaling pathway (Narumiya et al., 1999). However, activation of PTGER1 (EP1) and PTGER3 (EP3) induces intracellular Ca²⁺ release that activates of PKC signaling pathway (Narumiya et al., 1999).

While PGF2 α exerts luteolytic effect, PGE2 shows luteoprotective effect in sheep and cows (Weems et al., 1985; Weems et al., 1995; Weems et al., 2006; Wiltbank et al., 2018). Luteotropic effect of PGE2 has been shown in a variety of species such as dog, pig and human as well (Hahlin et al., 1988; Ford and Christenson, 1991; Kowalewski et al., 2013). In accordance with this, high expression of COX2 and PTGES was detected in the dog CL during early luteal phase (Kowalewski et al., 2006). Additionally, PGE2 by inducing expression of ETB and ANGPT2 expression in the dog appears to involve in luteal blood supply and angiogenesis (Gram et al., 2015; Gram et al., 2018). Furthermore, CL, pregnant uterus and conceptus are able to produce PGE2 in sheep. During establishment of pregnancy in ewe, PGE2 seems to be involved in the rescue of the CL (Weems et al., 1995). In sheep, intrauterine infusion of PGE2 mitigates luteolytic action of PGF2 α during spontaneous luteolysis (Weems et al., 1985). Administration of PGE2 as well as PGE1 blocks PGF2 α induced luteolysis and P4 production in this species as well (Reynolds et al., 1981). Moreover, PGE2 induces production of P4 by activating production of cAMP an activator of PKA signaling pathway in human and rabbit (Boiti et al., 2001; Hahlin et al., 1988). Blockage of the PTGS2/COX2 in vivo with its specific blocker reduces expression of steroidogenic acute regulatory protein (STAR) thereby P4 production in the dog (Janowski et al., 2014).

While the effect of PGE2 on luteal steroidogenesis was intensively investigated in a variety of species, there is little information available regarding the indirect effects of PGE2 in the ovine CL. In order to get more information regarding the potential function of PGE2 in ovine CL and thus to better understand the regulation of its function, in the current study ovine primary luteal and -microvascular endothelial cells were isolated. Thereafter, using the isolated luteal and -microvascular endothelial cells, possible effects of PGE2 stimulation on expression of some steroidogenic hormone receptors (ER α /ER1, ER β /ER2 and PGR) and growth factors (IGF1, IGF2 and VEGF) were investigated.

Materials and Methods

Tissue collection and isolation of ovine primary luteal and -microvascular endothelial cells

Luteal cells and luteal microvascular endothelial cells were isolated by using our previously described protocol (Gram et al., 2019). Briefly, primary luteal and -microvascular endothelial cells were isolated from CL of clinically healthy and non-pregnant ewes (n=3). Samples for isolation of primary cells were obtained from the local slaughterhouse. Corpora lutea of each animal were separated from the surrounding tissues and washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS). Afterwards, they were cut into small pieces with a sterile scalpel blade and incubated for 1h in PBS containing 0.15 % collagenase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Following digestion of tissues, they were filtered through a sterile 100 μ m nylon strainer. Then filtrate was centrifuged at 500 g at room temperature. The obtained pellet was subsequently resuspended with PBS containing 1% bovine serum albumin. Then, the endothelial cells were separated from the resulting suspension through affinity purification with magnetic beads. Magnetic tosylactivated beads (Dynabeads M- 450) were coated with (Bandeiraea) Simplicifolia Lectin I (BSL-I) (Vector Laboratories) according to the manufacturer's instruction. Following incubation dispersed cells together with BSL-I labelled magnetic beads, bead adherent cells were separated with the aid of the magnet. Bead-free supernatant that contained the luteal cells were separated and suspended in culture medium ((DMEM/F12, with 10% heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin, and 1% ITS (Insulin-Transferrin-Selenium), seeded immediately into six well plates.

Bead adherent cells, resuspended in endothelial cell culture medium (DMEM/F12, with 10% heat inactivated FBS, containing 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin and 200 μ g/ml Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)) and seeded directly into the six -well plates. Both endothelial and luteal cells were cultured in a humidified incubator at 37°C under 5%

CO₂. To characterize endothelial and luteal cells sterile cover glasses were put into each well and grown on them. When cells reached approximately 90-100% confluency, they were fixed by adding 2% formaldehyde for 10 min at 37°C.

As for stimulation experiments, prior to stimulation, the cells were washed with sterile PBS and replaced by a serum and ECGS-free DMEM/F12 medium containing 1ng/ml PGE2 for 6h. This dosage of the PGE2 is decided based on previously published report.

RNA isolation and semi-quantitative RT-PCR and data evaluation

Total RNA was obtained from primary luteal and -microvascular endothelial cells using TRIzol® reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The concentrations of isolated RNA samples were quantified by spectrophotometrically. DNase treatment was performed using RQ1 RNase-free DNase (Promega). Reverse transcription (RT) of the RNA samples was achieved following the manufacturer's instructions (Applied Biosystems).

Semi-quantitative Real Time (TaqMan) PCR was performed in CFX Connect Real Time system (BioRad). All the reactions were performed in duplicates. Primers and TaqMan® probes labelled with 6-carboxyfluorescein (6-FAM) and 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) and are presented in Table 1.

Normalization of the target genes was achieved using two different reference genes, GAPDH and β-ACTIN. Relative gene expression of each target gene was calculated with comparative CT method ($\Delta\Delta CT$ method).

Statistical analyses

Each experiment was performed independently at least three times. All the statistical analyses were performed using the SPSS 16.0 Software. The Effect of PGE2 treatment on expression of ERα/ER1, ERβ/ER2, PGR, IGF1, IGF2 and VEGF in primary luteal and -microvascular endothelial cells was calculated using an unpaired two-tailed Student's t-test. All numerical data are presented as the mean ± standard deviation. P<0.05 was considered statistically significant.

Results

Effect of PGE2 stimulation on expression of ERα/ER1, ERβ/ER2, PGR and IGF1, -2 and VEGF in ovine primary luteal and -microvascular endothelial cells

Both primary luteal and -microvascular endothelial cells were isolated from CL of sheep by enzymatic digestion. The expression of all target genes were detected by semi-quantitative RT-PCR. They were

Table 1. List of primers used for Real Time (TaqMan) PCR

Gene	Primer sequence	Product length (bp)	Accession number
ERα/ER1	Forward: 5'- CCTGACGGCTGACCAGATGA-3' Reverse: 5'- CCTCACTGAAAGGGTCTGGTAGGT-3' TaqMan probe: 5'-TGGAGGCTGAGCCCCCATAATCTATTCT-3'	92	AY033393.1
ERβ/ER2	Forward: 5'- GTCTCCTATAACTGCGGTCAATCC-3' Reverse: 5'- GAGTATTCATGGCGGCTCTCTAC-3' TaqMan probe: 5'-TGGAGCCAGCCCCATATATTTACCCTCTT-3'	92	NM_001009737.1
IGF1	Forward: 5'- CAGCAGTCTTCCAACCCAAT-3' Reverse: 5'- CAGGGCCAGATAGAAGAGATG-3' TaqMan probe: 5'-AGGTGAAGATGCCAGTCACATCCTCCTC-3'	103	NM_001009774.3
IGF2	Forward: 5'- GGGATGTGTCTGCCTCTACGA-3' Reverse: 5'- GACTGCTTCCAGGTGTCAGATTG-3' TaqMan probe: 5'-TCACAGCATAACCCCGTGGCAAGTT-3'	91	NM_001009311.1
VEGF	Forward: 5'- GGGCTGCTGTAATGACGAAAGT-3' Reverse: 5'- CTGGCTTTGGTGAGGTTTGATC-3' TaqMan probe: 5'-TGTGCCCACTGAGGAGTTCAACATCAC-3'	94	AF071015.1
β-ACTIN	Forward: 5'- AGA GGC ATC CTG ACC CTC AA-3' Reverse: 5'- GTT GTA GAA GGT GTG GTG CCA GAT-3' TaqMan probe: 5'-TAC CCC ATT GAG CAC GGC ATT GTCA -3'	93	U39357.1
GAPDH	Forward: 5'- GGC ACA GTC AAG GCA GAG AAC-3' Reverse: 5'- CAC GTA CTC AGC ACC AGC ATC A-3' TaqMan probe: 5'-AAG GCC ATC ACC ATC TTC CAG GAG C-3'	114	NM_001190390.1

clearly detectable in both stimulated and non-stimulated ovine primary luteal (Fig. 1-2) and microvascular endothelial cells (Fig. 3-4). There were no statistically significant changes in the expression of investigated steroidogenic hormone receptors ($P=0.20$ for $ER\alpha/ER1$, $P=0.93$ for $ER\beta/ER2$ and $P=0.70$ for PGR) in primary luteal cells following treatment with 1ng/ml PGE2 treatment (Fig. 2A-C).

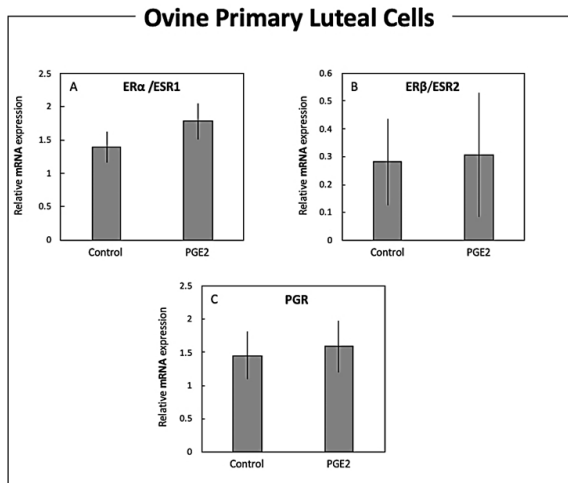


Figure 1. Effect of PGE2 on expression of $ER\alpha/ER1$, $ER\beta/ER2$ and PGR in ovine primary luteal cells collected from clinically healthy and non-pregnant ewes. Luteal cells were cultured in serum-free DMEM/F12 medium with 1ng/ml PGE2. Non-stimulated cells served as a negative control. (A-C) $ER\alpha/ER1$, $ER\beta/ER2$ and PGR mRNA expression as determined by real-time (TaqMan) PCR normalized against GAPDH and β -ACTIN. Numerical data are presented as the mean \pm standard deviation

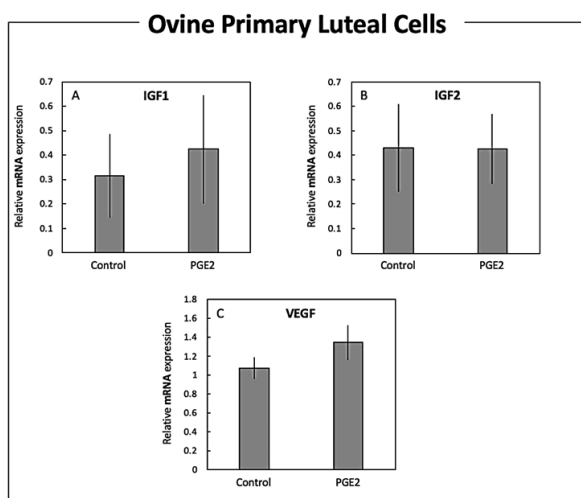


Figure 2. Effect of PGE2 on expression of IGF1, IGF2 and VEGF in ovine primary luteal cells collected from clinically healthy and non-pregnant ewes. Luteal cells were cultured in serum-free DMEM/F12 medium with 1ng/ml PGE2. Non-stimulated cells served as a negative control. (A-C) IGF1, IGF2 and VEGF mRNA expression as determined by real-time (TaqMan) PCR normalized against GAPDH and β -ACTIN. Numerical data are presented as the mean \pm standard deviation

Similarly, there was no statistically significant changes in the expression of IGF1, either, ($P=0.70$) -2 ($P=0.70$) and VEGF ($P=0.10$) in primary luteal cells

Interestingly, the expression of $ER\alpha/ER1$ and $ER\beta/ER2$ were affected in luteal microvascular endothelial cells following stimulation with 1ng/ml PGE2 (Fig. 3A and B). There was a significant change in expression of both $ER\alpha/ER1$ ($P=0.002$) and $ER\beta/ER2$ ($P=0.0001$) in primary microvascular endothelial cells following treatment with PGE2 (Fig. 3A and B).

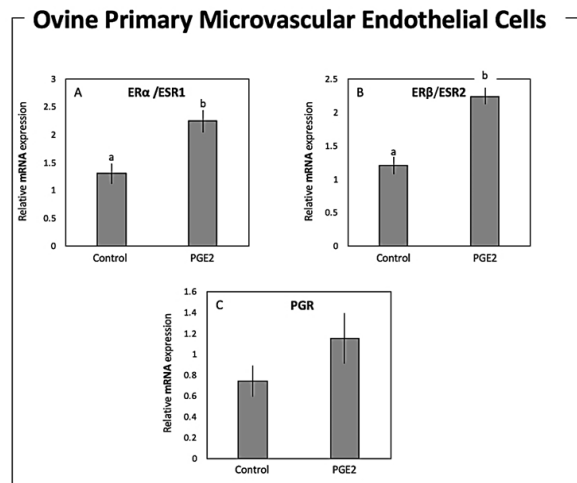


Figure 3. Effect of PGE2 on expression of $ER\alpha/ER1$, $ER\beta/ER2$ and PGR in ovine primary microvascular endothelial cells collected from clinically healthy and non-pregnant ewes. Microvascular endothelial cells were cultured in serum-free DMEM/F12 medium with 1ng/ml PGE2. Non-stimulated cells served as a negative control. (A-C) $ER\alpha/ER1$, $ER\beta/ER2$ and PGR mRNA expression as determined by real-time (TaqMan) PCR normalized against GAPDH and β -ACTIN. Bars with different letters differ at $P=0.002$ ($ER\alpha/ER1$), $P=0.0001$ ($ER\beta/ER2$) and $P=0.1$ (PGR). Numerical data are presented as the mean \pm standard deviation

Moreover, the expression of IGF2 ($P=0.0005$) was also increased significantly (Fig. 4B). On the other hand, the expressions of PGR ($P=0.10$), IGF1 ($P=0.60$), and VEGF ($P=0.60$) did not change signifi-

cantly in primary microvascular endothelial by 1ng/ml PGE2 stimulation (Fig. 3C-4A and C).

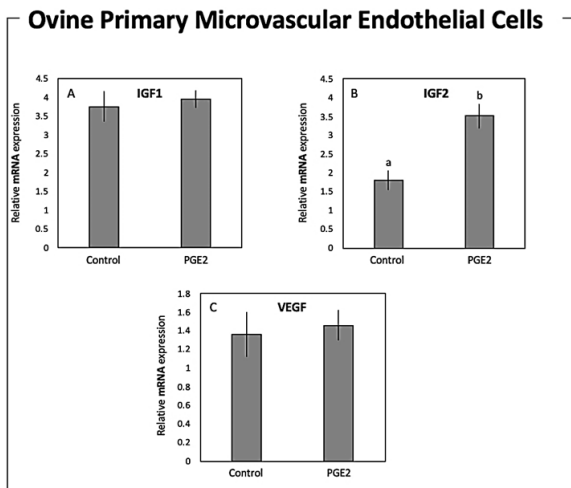


Figure 4. Effect of PGE2 on expression of IGF1, IGF2 and VEGF in ovine primary microvascular endothelial cells collected from clinically healthy and non-pregnant ewes. Microvascular endothelial cells were cultured in serum-free DMEM/F12 medium with 1ng/ml PGE2. Non-stimulated cells served as a negative control. (A-C) IGF1, IGF2 and VEGF mRNA expression as determined by real-time (TaqMan) PCR normalized against GAPDH and β -ACTIN. Bars with different letters differ at ($P=0.0005$). Numerical data are presented as the mean \pm standard deviation

Discussion and Conclusion

Prostaglandin E appears to play an important role in luteal function in domestic animals by regulating angiogenesis, proliferation and steroidogenesis. Lutetrophic effect of PGE2 has been shown in many domestic animal species such as dog, cow, sheep, pig and human (Hahlin et al., 1988; Ford and Christenson, 1991; Kowalewski et al., 2013; Weems et al., 1985; Weems et al., 1995; Weems et al., 2006; Wiltbank et al., 2018). However, indirect effect of PGE2 on luteal function has not yet been investigated in detail. Therefore, aiming to better understand the effect of PGE2 on luteal function, primary luteal and microvascular endothelial cells were isolated from early sheep CL and mRNA expression of ER α /ER1, ER β /ER2 and PGR and IGF1, IGF2 and VEGF, we investigated in primary luteal and microvascular endothelial cells following treatment with PGE2.

Time dependent expression of both ER α /ER1 and ER β /ER2 were shown in ovine CL previously (Cardenas et al., 2001; Tomanek et al., 1997). Localization of both receptors in different cellular compartments of the CL such as luteal cells and endothelial

cells suggest involvement of estrogen in the regulation of an autocrine/paracrine role of CL (Cardenas et al., 2001; Tomanek et al., 1997). Furthermore, the increase in expression of ER α /ER1 at mid luteal phase, and the decrease ER β /ER2 expression during mid-luteal phase indicate that the functions of these two receptors in the sheep CL might differ (Cardenas et al., 2001; Tomanek et al., 1997). Interestingly, in the present study, expression of the investigated steroid hormone receptors (ER α /ER1, ER β /ER2 and PGR) remained unaffected by the PGE2 stimulation. Thus, it seems that there is no functional connection between locally acting PGs, especially PGE2 and ER α /ER1, ER β /ER2 and PGR in ovine luteal cells.

Interestingly, in ovine primary microvascular endothelial cells, expression of both ER α /ER1 and ER β /ER2 were upregulated following treatment with PGE2, suggesting an interplay between estrogen and PGE2 in the regulation of the proliferation of endothelial cells as well as vascularization occurring during early CL formation. Nevertheless, further research is required to better understand the mechanisms of PGE2-mediated effects on endothelial cell proliferation and angiogenesis in ovine CL.

As for PGR, similar to luteal cells, its expression was not affected by PGE2 treatment. On the other hand, the time period that was used to stimulate primary microvascular endothelial cells might be not enough to induce expression of PGR. Moreover, there might be no functional connection between locally produced PGE2 and PGR in ovine luteal endothelial cells. Therefore, further research is required to better understand the effect of PGE2 stimulation on PGR in ovine CL.

Growth hormones (IGF1 and IGF2), like insulin, are also involved in the development, proliferation and regression of the CL in sheep (Juengel et al., 1997; Hastie and Haresign, 2006). By regulating P4 production, IGF1 and IGF2 are involved in steroidogenesis in ovine CL as well (Juengel et al., 1997; Hastie and Haresign, 2006). Furthermore, similar to other domestic animals such as dog and cow, in the sheep early luteal phase is characterized by upregulated expression of VEGF. By regulating angiogenesis this angiogenic growth factor is crucial for the maintenance of the CL. However, in our study neither expression of insulin like growth hormones (IGF1 and IGF2) nor VEGF were affected by PGE2 stimulation in primary luteal cells. Therefore, it appears that there is no functional connection between locally acting PGE2 and IGF1, IGF2 and VEGF in ovine luteal cells. On the other hand, while the expression of IGF2 was upregulated, expression of IGF1 and VEGF were not affected by PGE2 treatment in ovine primary microvascular endothelial cells. This indicates the possible functional interplay among different cellular compartments within the ovine CL. There-

fore, involvement of PGE2 in local autocrine and paracrine regulation of this temporary endocrine gland still needs to be elucidated.

In conclusion, the effects of PGE2 on expression of ER α /ER1, ER β /ER2 and PGR and IGF1, IGF2 and VEGF have been investigated herein by using the ovine primary luteal and -microvascular endothelial cells. The results presented in the current study suggest that by regulating expression of estrogen receptors (ER α /ER1 and ER β /ER2) and IGF2 in ovine luteal endothelial cells, PGE2 might involve in luteal angiogenesis and vasculogenesis during early luteal phase in sheep.

References

- Boiti C, Zampini D, Zerani M, Guelfi G, Gobbetti A. Prostaglandin receptors and role of G protein-activated pathways on corpora lutea of pseudo-pregnant rabbit in vitro. *J Endocrinol* 2001; 168: 141-51.
- Cárdenas H, Burke KA, Bigsby RM, Pope WF, Nephew KP. Estrogen receptor beta in the sheep ovary during the estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 2001; 65(1): 128-34.
- Castellone MD, Teramoto H, Williams BO, Druey KM, Gutkind JS. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axinbeta-catenin signaling axis. *Science* 2005; 310: 1504-10.
- Cha YI, DuBois RN. NSAIDs and cancer prevention: targets downstream of COX-2. *Annu Rev Med* 2007; 58: 239-52.
- Channing CP, Schaerf FW, Anderson LD, Tsafirri A. Ovarian follicular and luteal physiology. *Int Rev Physiol* 1980; 22: 117-201.
- Ford SP, Christenson K. Direct effects of oestradiol-17 β and prostaglandin E-2 in protecting pig corpora lutea from a luteolytic dose of prostaglandin F2 α . *J Reprod Fertil* 1991; 93(1): 203-9.
- Fraser HM, Wulff C. Angiogenesis in the corpus luteum. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 88.
- Gram A, Grazul-Bilska AT, Boos A, Rahman NA, Kowalewski MP. Lipopolysaccharide disrupts gap junctional intercellular communication in an immortalized ovine luteal endothelial cell line. *Toxicol In Vitro* 2019; 60: 437-49.
- Gram A, Latter S, Boos A, Hoffmann B, Kowalewski MP. Expression and functional implications of luteal endothelins in pregnant and non-pregnant dogs. *Reproduction* 2015; 150(5): 405-15.
- Gram A, Tavares Pereira M, Boos A, Grazul-Bilska AT, Kowalewski MP. Luteal ANGPT-TIE system during selected stages of pregnancy, and normal and antigestagen-induced luteolysis in the dog. *Reproduction* 2018; 156(5): 451-61.
- Grazul-Bilska AT, Navanukraw C, Johnson ML, Vonnahme KA, Ford SP, Reynolds LP, Redmer DA. Vascularity and expression of angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave. *J Anim Sci* 2007; 85(8): 1914-22.
- Hahlin M, Dennefors B, Johanson C, Hamberger L. Luteotropic effects of prostaglandin E2 on the human corpus luteum of the menstrual cycle and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66(5): 909-14.
- Hastie PM, Haresign W. A role for LH in the regulation of expression of mRNAs encoding components of the insulin-like growth factor (IGF) system in the ovine corpus luteum. *Anim Reprod Sci* 2006; 96(1-2): 196-209.
- Janowski T, Fingerhut J, Kowalewski MP, Zdunczyk S, Domoslawska A, Jurczak A, Boos A, Schuler G, Hoffmann B. In vivo investigations on luteotropic activity of prostaglandins during early diestrus in nonpregnant bitches. *Theriogenology* 2014; 82(6): 915-20.
- Juengel JL, Nett TM, Anthony RV, Niswender GD. Effects of luteotrophic and luteolytic hormones on expression of mRNA encoding insulin-like growth factor I and growth hormone receptor in the ovine corpus luteum. *J Reprod Fertil* 1997; 110(2): 291-8.
- Kowalewski MP, Fox B, Gram A, Boos A, Reichler I. Prostaglandin E-2 functions as a luteotrophic factor in the dog. *Reproduction* 2013; 145: 213-26.
- Kowalewski MP, Schuler G, Taubert A, Engel E, Hoffmann B. Expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the canine corpus luteum during diestrus. *Theriogenology* 2006; 66: 1423-30.
- Martelli A, Palmerini MG, Russo V, Rinaldi C, Bernabo N, Di Giacinto O, Berardinelli P, Nottola SA, Macchiarelli G, Barboni B. Blood vessel remodeling in pig ovarian follicles during the periovulatory period: an immunohistochemistry and SEM-corrosion casting study. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7: 72.
- Namkoong S, Lee SJ, Kim CK, Kim YM, Chung HT, Lee H, Han JA, Ha KS, Kwon YG, Kim YM. Pros-

- taglandin E2 stimulates angiogenesis by activating the nitric oxide/cGMP pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Exp Mol Med* 2005; 37(6): 588-600.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999; 79: 1193-226.
- Reynolds LP, Stigler J, Hoyer GL, Magness RR, Huie JM, Huecksteadt TP, Whysong GL, Behrman HR, Weems CW. Effect of PGE1 or PGE2 on PGF2 α -induced luteolysis in nonbred ewes. *Prostaglandins* 1981; 21(6): 957-72.
- Smith MF, McIntush EW, Smith GW. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci* 1994; 72(7): 1857-72.
- Smith WL, Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol* 1996; 62: 167-215.
- Suzuki T, Sasano H, Takaya R, Fukaya T, Yajima A, Nagura H. Cyclic changes of vasculature and vascular phenotypes in normal human ovaries. *Hum reprod* 1998; 13(4): 953-59.
- Tai HH, Ensor CM, Tong M, Zhou H, Yan F. Prostaglandin catabolizing enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69: 483-93.
- Tomanek M, Pisselet C, Monget P, Madigou T, Thieulant ML, Monniaux D. Estrogen receptor protein and mRNA expression in the ovary of sheep. *Mol Reprod Dev* 1997; 48(1): 53-62.
- Trau HA, Brännström M, Curry TE Jr, Duffy DM. Prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor A mediate angiogenesis of human ovarian follicular endothelial cells. *Hum Reprod* 2016; 31(2): 436-44.
- Weems CW, Huie M, Hoyer GL, Magness RR, Whysong GL. Maternal recognition of pregnancy in ruminants. Davis WC, Shelton JN, Weems CW, ed. In: *Characterization of the Bovine Immune System and the Genes Regulating Expression of Immunity With Particular Reference to Their Role in Disease Resistance*. Pullman, WA: Washington State University Press 1985; pp. 193-210.
- Weems CW, Weems YS, Randel RD. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Vet J* 2006; 171: 206-28.
- Weems CW, Weems YS, Vincent DL. Maternal recognition of pregnancy and maintenance of gestation in sheep. Enne G, Greppi GF, Lauria A, ed. In: *Reproduction and Animal Breeding: Advances and Strategies*. Proceedings XXX International Simposia Societa Italiana Zootechnica, Milan, Italy. Amsterdam, Holland: Elsevier Press; 1995; pp. 277-93.
- Wiltbank MC, Mezera MA, Toledo MZ, Drum JN, Baez GM, García-Guerra A, Sartori R. Physiological mechanisms involved in maintaining the corpus luteum during the first two months of pregnancy. *Anim Reprod* 2018; 15(1): 805-21.



Investigation of the Effects of Boric Acid on Preventing Lung Damage in the End of the Lower Extremity Ischemia Reperfusion in Rats

Cahit ÖZCAN¹, Aydın Şükrü BENGÜ*², H.Turan AKKOYUN³, Aykut ULUCAN⁴,
Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN⁵

¹Siirt University, Faculty of Veterinary Science, Department of Animal Nutrition and Nutritional disease, Siirt-TURKEY

²Bingöl University, Department of Medical Services and Technics, Vocational School of Health Services, Program of Medical Laboratory Techniques, Bingöl-TURKEY

³Siirt University, Faculty of Veterinary Science, Department of Physiology, Siirt-TURKEY

⁴Bingöl University, Department of Medical Services and Technics, Vocational School of Health Services, Program of Pathology Laboratory Techniques, Bingöl-TURKEY

⁵Siirt University, Faculty of Veterinary Science, Department of Biochemistry, Siirt-TURKEY

Corresponding author: Aydın Şükrü BENGÜ; E-mail: aydinbengu75@gmail.com; ORCID: 0000-0002-7635-4855

How to cite: Ozcan C, Bengü AS, Akkoyun HT, Ulucan A, Bayramoğlu Akkoyun M. Investigation of the Effects of Boric Acid on Preventing Lung Damage in the End of the Lower Extremity Ischemia Reperfusion in Rats. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020;17(1): 57-62.

Summary: In this study, the biochemical and histopathological changes in the lungs due to lower extremity ischemia-reperfusion injury and protective effect of boric acid to prevent them were investigated. The rats were divided into three groups as Group 1 (Sham group, n=9), Group 2 (Ischemia-reperfusion group, I/R, n=9) and Group 3 (Ischemia-reperfusion, (I/R) + boric acid (BA), n=9). Anaesthesia was applied to the first group of rats without any ischemia-reperfusion process. Following a two-hour ischemia, two hours of reperfusion, with the help of left lower extremities tourniquet, were applied to the second group. To the third group, 200 mg/kg (i.p.) boric acid application was performed 10 minutes before the ischemia was initiated and two hours of ischemia and two hours of reperfusion application were carried out. Some antioxidant enzymes in lung tissue (SOD, GSH-Px, CAT) were analyzed. In addition the lung tissue was evaluated histopathologically. Boric acid application was found to significantly enhance the positive effect of antioxidant enzymes. Normal histological structure was better preserved, some of macrophages were non-activated, and a remarkable reduction of neutrophil infiltration was seen after treatment in boric acid given group.

Key words: Antioxidant enzyme, boric acid, histopathology, ischemia/reperfusion, lung damage

Sıçanlarda Alt Ekstremitte İskemi Reperfüzyonu Sonucunda Gelişen Uzak Doku Akciğer Hasarının Önlenmesinde Borik Asidin Etkilerinin İncelenmesi

Özet: Bu çalışmada, alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarı sebebiyle akciğerlerde meydana gelen biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikler ve bunlara karşı borik asidin koruyucu etkisi araştırıldı. Sıçanlar Grup 1 (Kontrol/sham grubu, n=9), Grup 2 (İskemi-reperfüzyon grubu, I/R, n=9) ve Grup 3 (İskemi-reperfüzyon, (I/R) + Borik asit (BA), n=9) olmak üzere üç gruba ayrıldı. İskemi-reperfüzyon prosesi olmayan ilk sıçan grubuna sadece anestezi uygulandı. İkinci gruba iki saatlik bir iskemi sonrası, sol alt ekstremitte turnike yardımıyla iki saatlik reperfüzyon uygulandı. Üçüncü gruba, iskemi başlamadan 10 dakika önce 200 mg / kg (i.p.) borik asit uygulaması yapıldı, iki saatlik iskemi ve iki saatlik reperfüzyon uygulaması yapıldı. Akciğer dokusunda bazı antioksidan enzimlerin (SOD, GSH-Px, CAT) aktiviteleri analiz edildi. Ayrıca akciğer dokusu histopatolojik olarak değerlendirildi. Borik asit uygulamasının antioksidan enzimlerin pozitif etkisini önemli ölçüde güçlendirdiği tespit edildi. Borik asit verilen grupta tedaviden sonra normal histolojik yapının daha iyi korunduğu, bazı makrofajların aktive edilmediği ve nötrofil infiltrasyonun da belirgin bir azalmanın olduğu gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: Akciğer hasarı, antioksidan enzim, borik asit, histopatoloji, iskemi/reperfüzyon

Introduction

Lower extremity ischemia reperfusion has significant out comes commonly observed in clinical case studies. After reperfusion followed by ischemia and the impact of inflammatory mediator and free-oxygen radicals, the development of a local and ischemia damage will start (Grace, 1994; Klausner et al.,

1989a; Klausner et al., 1988). Despite ischemia is saved through re-start of blood flow, it leads to the development of multiple organ dysfunction and it is especially observed in heart, renal and lungs (Blaisdell, 2002). Lung tissue is the target organ being affected by the lower extremity ischemia reperfusion most and its aetiology is not fully known (Tekeli et al., 2001; Uysal, 2006). Boric acid (BA) occurs naturally in both sea and fresh water sat 1-5 ppm. Its concentrations in the soil are more than waters

(Büyükgüzel et al., 2013). Boric acid is abundant in fruits, vegetables and legumes, so it can be obtained in the diet with the consumption of these (Devirian and Volpe, 2003). Found in nature at high concentrations, BA is widely used in the industry, agriculture, cosmetics and other small practices. It is considered that the supplemental use of BA in human and animal food has considerable effects on the physiological and metabolic systems. Acute oral toxicity of inorganic boron-containing compounds is stated as 2660-4000 for rats LD50 (g/kg) (Fail et al., 1998). In some studies it is stated that BA has effects on minerals (Ca and P), vitamin D, hormones (insulin, oestrogen, testosterone, T3,T4), energy substrates (triglyceride, glucose) and reactive oxygen species (Hunt, 1988; Meacham et al., 1994; Hunt, 1996; Armstrong et al., 2001; Eren et al., 2006; Turkez et al., 2007). Nevertheless, the biochemical mechanism of BA is not completely known. In this study, we examined two things biochemically and histopathologically; the lung tissue damage caused by lower extremity ischemia/reperfusion and the role of boric acid in preventing this damage.

Material and Methods

Experimental animals

Our experimental studies were carried out after the experimental animals were approved by the Bingöl University Ethic Committee of Animal Research (decision no:2018/02-02/06). The animals were kept in cages in a controlled room at a fixed 20-22 °C temperature and a 12-hour shift of light and dark cycle (light 07:00-19:00, dark: 19:00-07:00). They were provided with water and standard food. The experiments started after the rats were rested in their cages for a week in order to provide their adaptation to the environment. Rats were fed with pellet feed obtained from the market and analysis contents given in Table 1.

Table 1. Nutrient composition of pellets

Dry matter	87.2%
Crude protein	23.0%
Crude fat	3.7%
Crude fiber	7.7%
Ash	5.8%
Sodium	0.6%
Mn	96 mg/kg
Fe	31 mg/kg
Zn	960 mg/kg
Co	0.60 mg/kg
S	0.30 mg/kg
I	2.28 mg/kg

The rats were fasted for 12 hours before the experiments, with free access to water. A total of 27 male *Wistar albino* rats weighing between 200 and 300 grams each were randomly divided into three groups.

Group 1 (control/sham group, n: 9); these rats were only given anaesthesia. Group 2 (ischemia/reperfusion, I/R, n: 9); Group 3 (ischemia reperfusion (I/R) + BA, n: 9) where 10 minutes before ischemia, a 200 mg/kg dosage of BA was applied intraperitoneally as described Başbuğ et al. (2015). All the rats were exposed to ischemia for two hours through the bilateral lower extremity tourniquet method. The loss of arterial flow was determined through the inability to detect Doppler signals through Doppler USG. Two hours later, the tourniquets was opened, and reperfusion was performed for two hours (Klausner et al., 1989b). The control of arterial flow was again checked by Doppler USG. At the end of the fourth hour, the rats were sacrificed through injection of a high dosage of 60 mg/kg (i.p.) ketamine hydrochloride (Ketalar, Parke-Davis) and 10 mg/kg Xylazine (i.p.). Their lung tissues were taken out through mediastinotomy, and biochemical and histopathological analyses (SOD, GSH-Px, CAT levels) of the tissues were carried out.

Biochemical assays

Superoxide dismutase activity (SOD) was performed according to the method Sun et al. (1988). Tissue glutathione peroxidase's activity (GSH-Px) Paglia et al. (1967) and Catalase activity (CAT) were performed according to the method Aebi (1984).

Anaesthesia, necropsy and histopathologic examination

The main materials of this study were 10-week-old 27 *Wistar albino* rats in 3 groups (n:9). Firstly, all rats were anesthetized with intraperitoneal injection of 10 mg/kg xylazine and 60 mg/kg ketamine, and euthanasia was applied by decapitation under deep anaesthesia (Tranquilli et al., 2013). For light microscopy, the lungs were inflated via the trachea with 10% phosphate-buffered formaldehyde after sacrificing the

animal as described above (Fiette and Slaoui, 2011). The lungs were then removed and placed into 10% phosphate-buffered formaldehyde until ready for sectioning and treated as routine histopathological

protocol of dehydrated samples in ascending grades of ethanol (50%, 70%, 96% and 100%) cleared in xylene and then embedded in paraffin (Bancroft et al., 2008). The paraffin-embedded tissue samples were sectioned at 5 µm thicknesses by a rotary microtome (Leica, RM2125). The slides were stained with haematoxylin & eosin (H&E) for histopathological analyses (Fisher et al., 2008). Finally, the slides were examined and photographed by using a light microscope with an imaging system (Leica, DM2500/DFC295) for detection of degenerative changes in the lung tissues.

Statistical analysis

The results are expressed as mean ± the standard error of the mean ($\bar{X} \pm SEM$). The comparisons between the groups were done with Kruskal Wallis and Benferroni corrected Mann Whitney U test. The statistical analysis was performed utilizing SPSS®, v23 statistical software (SPSS Inc. Chicago Illinois).

Results

When the enzyme activities of SOD, CAT and GSH-Px are compared to the control group, it is clear that, while the values decreased in the ischemia reperfusion group. According to the I/R group, the SOD, CAT, GSH-PX enzyme activities increased in the group which received boric acid treatment compared to the I/R group. Moreover, in comparison to the control group, a significant decrease in the GSH-Px enzyme activity level was observed in the group that received boric acid treatment (Table 2 and Figures 1,2 and 3). In the control (sham) group (Group 1), no significant histopathologic lesions were observed in the investigated lung tissues, and the alveolus, bronchioles and pneumocytes displayed a normal histological structure (Figure 4-A). In the group that received I/R (ischemia/reperfusion) treatment (Group 2) in the lung tissues, interstitial and perivascular oedema, neutrophil leukocyte accumulation, a small amount of fibrin deposits, and erythrocyte permeation in alveolus swelling and desquamation of bronchiolar and alveolar epithelial cells were determined (Figure 4-B). In addition to this, in the compared lung tissues of the boric acid treatment group (Group 3), the histopathological findings were seen to be significantly

Table 2. Distribution of SOD, CAT and GSH-Px values based on the groups

Enzyme (Eu/mg)	Control (sham)	Group 1 (I/R)	Group 2 (I/R+BA)	P values
SOD	2828.68±2.45 ^a	2809.73±1.86 ^b	2815.64±2.83 ^a	***
CAT	34.96±1.87 ^a	17.07±1.50 ^b	32.31±1.79 ^a	***
GSH-Px	1.66±0.057 ^a	0.8513±0.073 ^c	1.301±0.046 ^b	***

***: P<0.001; a,b,c: different letters, significant differences between control (Sham), Group1(I/R), Group 2(I/R+BA) groups

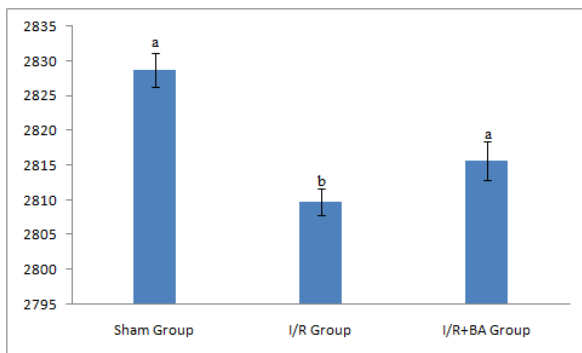


Figure 1. Super oxide dismutase levels in the lung tissues of the control (Sham), Group1(I/R), Group 2(I/R+BA) groups (SOD) (EU/g)

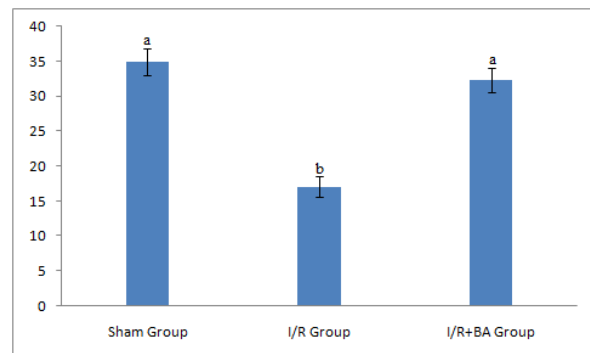


Figure 2. Catalase levels in the lung tissues of the control (Sham), Group1(I/R), Group 2(I/R+BA) groups (EU/g)

In this study, which evaluated the remote tissue damage that occurred in the lungs in connection with rat lower extremity ischemia reperfusion damage, antioxidant defence parameters such as SOD, CAT and GSH-Px enzyme activities were determined. The results of the SOD, CAT and GSH-Px values for each group are shown in Table 2.

decreased. Only limited swelling of bronchiolar and alveolar epithelial cells and remarkable reduction of neutrophil infiltration were observed after treatment in the group that was given boric acid (Figure IV-C).

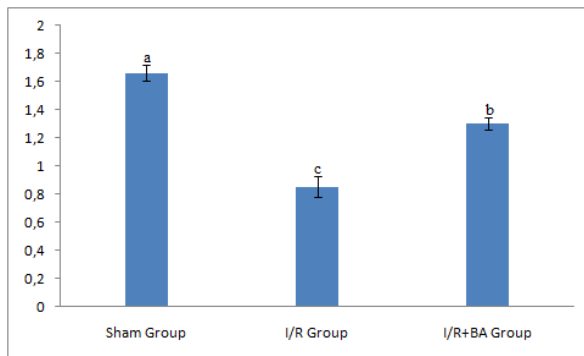


Figure 3. Glutathione peroxidase levels in the lung tissue of the control (Sham), Group 1(I/R), Group 2(I/R+BA) groups (EU/g)

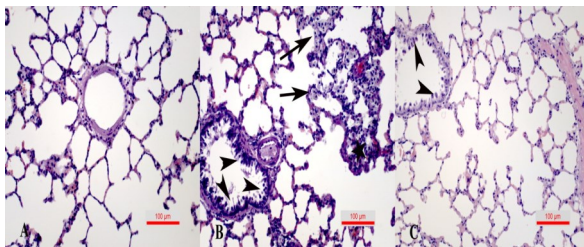


Figure 4. Histopathological Analyses of the lungs with H&E staining. (A): Normal histological structure of the lung tissue in the control group (Group 1). Swelling and desquamation of bronchiolar (arrow heads) and alveolar (arrows) epithelial cells, neutrophil leukocyte accumulation and erythrocyte permeation in alveolus (star) in the I-R group (Group 2). Limited swelling of bronchiolar and alveolar epithelial cells (arrow heads), in the I-R and boric acid treatment group (Group 3). All photographs were taken at 20x magnification by the same lens

Discussion and Conclusion

Türkez et al. (2007) reported that boron compounds (as boric acid) caused significant increases in antioxidant enzyme activities. However, the defence of boric acid against reactive oxygen species (ROS) has not been adequately described yet. The activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GSH-Px) have important roles in cell defence (Tapiero et al., 2004). Superoxide dismutase has a central role against oxidative damage. This enzyme catalyzes the dismutation of superoxide to hydrogenperoxide and oxygen (Kakarla et al., 2005). Catalase activity protects lipids and proteins in erythrocyte membranes against peroxide radicals. Glutathione peroxidase is associated with increases in the quantity of glutathione. Glutathione is a tripeptide that is very important for erythrocytes. It has a key role in antioxidant enzyme activities (Türkez et al. 2007). Hunt et al. (1996) stated that boron compounds have a protective effect on oxidative damage to human health by showing their effects on SOD, CAT and GSH. It is considered that the effects occur because they stimulate the immune sys-

tem and lead to secretion of Vitamin D metabolism or insulin. It is stated that lung damage occurred in the reperfusion period after lower extremity ischemia in connection with free oxygen radicals. In the same study, it was also found that melatonin, an antioxidant compound, played a protective role against I/R damage. In this study, it was also determined that boric acid applications used against radicals which are caused by extremity ischemia led to a significant increase in the protective effect of antioxidant enzymes. In comparison to SOD and GSH-Px, the enzyme CAT, which is the main subject of this study, was also affected more positively. The late phase of reperfusion injury is known to be neutrophil-dependent (Uysal, 2006). Although there are important studies on the effects of remote organ ischemia-reperfusion cases that lead to lung injury (e.g., hind-limb, ischemia reperfusion) (Seekamp et al., 1993), much fewer studies have been conducted to focus on the lungs as the direct aim of ischemia and reperfusion injury. In this study, using an in vivo rat lung ischemia-reperfusion model, we characterized a model of injury in the lung during the early and delayed reperfusion periods by determining the protective effects of boric acid and its relationships in inflammatory injury. In similar studies, oedema was mentioned in the alveolar cells (Den-Hengst et al., 2010; Ferrari et al., 2015). Macrophages and neutrophils are determinants for the improvement of lung ischemia-reperfusion injury (Den-Hengst et al., 2010). Alveolar type II cells appear to be quite sensitive to the effects of ROS and RNS. These cells are responsible for the release of inflammatory mediators and cytokines (Sharma et al., 2007). The light microscopy examinations observed considerable perivascular oedema in the lungs undergoing ischemia and 2 hours of reperfusion in comparison to the lungs of the sham-operated rats. At 2 hours of reperfusion, there were also significant interstitial and perivascular oedema, deposition of fibrin in the alveolar spaces, intra-alveolar haemorrhage and leukocyte accumulation. The normal histological structure was better preserved, some macrophages were non-activated, and a remarkable reduction of neutrophil infiltration was seen after treatment in the group that was given boric acid (Beckers et al., 2017).

Damage to the lung tissue of the rats exposed to ischemia-reperfusion was detected. This damage was observed as a decrease in enzyme activities and histopathological deterioration. After the application of boric acid, the increase in enzyme activity (SOD, CAT, GSH-Px) in lung tissue and histopathology were determined as normalization. According to these results, boric acid has therapeutic effects in lung damage after ischemia reperfusion.

References

- Aebi H. Catalase in vitro assay methods. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-6.
- Armstrong TA, Spears JW, Lloyd KE. Inflammatory response growth and thyroid hormone concentrations are affected by long-term boron supplementation in gilts. *J Anim Sci* 2001; 79: 1549-56.
- Bancroft J, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Sixth Edition. New York: Elsevier Health Sciences, 2008; pp.15-25.
- Başbuğ M, Yıldar M, Yaman İ, Özkan ÖF, Akşit H, Çavdar F, Derici H. Effects of boric acid in an experimental rat model of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Acta Medica Mediterranea* 2015; 31: 1067-73.
- Beckers PA, Gielis JF, Van Schil PE, Adriaensen D. Lung ischemia reperfusion injury: The therapeutic role of dipeptidyl peptidase 4 inhibition. *Ann Transl Med* 2017; 5(6): 129.
- Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and reperfusion syndrome: A review. *Cardiovascular Surgery* 2002; 10(6): 620-30.
- Büyükgüzel E, Büyükgüzel K, Snela M, Erdem M, Radtke K, Ziemnicki K, Adamski Z. Effects of boric acid on antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation and ultrastructure of mitgut and fat body of *Galleria mellonella*. *Cell Biology Toxicology* 2013; 29:117-129.
- Den Hengst WA, Gielis JF, Lin JY, Van Schil PE, De Windt LJ, Moens AL. Lung ischemia-reperfusion injury: A molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299(5): H1283-99.
- Devirian TA, Volpe SL. The physiological effects of dietary boron. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003;43(2): 219-31.
- Eren M, Uyanik F, Karabulut N. The Effects of Dietary Boron Supplementation on performance, carcass composition and serum lipids in Japanese quails. *J Anim Vet Adv* 2006; 5: 1105-8.
- Fail PA, Chapin RE, Price CJ, Heindel JJ. General, reproductive, developmental, and endocrine toxicity of boronated compounds. *Reproductive Toxicology* 1998; 12: 1-18.
- Ferrari RS, Andrade CF. Oxidative stress and lung ischemia-reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 590987.
- Fiette L, Slaoui M. Necropsy and Sampling Procedures in Rodents, in *Drug Safety Evaluation*. Springer, 2011; pp. 39-67.
- Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2008; (5): p. pdb. Prot 4986.
- Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *BJS* 1994; 81: 637-47.
- Hunt CD. Boron homeostasis in the cholecalciferol-deficient Chick. *P Nat Acad Sci USA* 1988; 42: 60.
- Hunt CD. Biochemical effects of physiological amounts of dietary boron. *J Trace Elem Med Biol* 1996; 9:185-213.
- Kakarla P, Vadluri G, Reddy KS. Response of hepatic antioxidant system to exercise training in aging female rat. *J. Exp. Zoolog. A Comp Exp Biol* 2005; 303: 203-8.
- Klausner JM, Paterson IS, Valeri R, Hechtman HB. Limb ischemia induced increase in permeability is mediated by leucocytes and leukotriens. *Ann Surg* 1988; 208:755-60.
- Klausner JM, Paterson IS, Kozbik LESTER, Valeri CR, Shepro DAVID, Hechtman HB. Leukotrienes but not complement mediate limb ischemia-induced lung injury. *Ann Surg* 1989a; 209(4): 462-70.
- Klausner JM, Paterson IS, Kozbik L, Valeri R, Shepro D, Hechtman HB. Oxygen free radicals mediate ischemia induced lung injury. *Surgery* 1989b; 105:192-9.
- Meacham SL, Taper LJ, Volpe SL. Effects of boron supplementation on bone mineral density and dietary, blood, and urinary calcium, phosphorus, magnesium, and boron in female athletes. *Environ Health Perspect* 1994; 102: 79-82.
- Paglia DE, Valentina WN. Studies on the quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; (70): 158-69.
- Seekamp A, Mulligan MS, Till GO, Ward PA. Requirements for neutrophil products and l-arginine in ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 1993; 142 (4): 1217-26.
- Sharma AK, Fernandez LG, Awad AS, Kronl L, Laubach VE. Pro inflammatory response of alveolar epithelial cells is enhanced by alveolar macrophage-produced $\text{tnf-}\alpha$ during pulmonary ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293(1): L105-13.
- Sun Yi, Oberley LW, Ying Li. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 3413:497-500.

Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed. Pharmacother* 2004; 58: 100-10.

Tekeli A, Akgün S, Civelek A, İşbir S, Ak K, Çobanoğlu A. Alt ekstremité iskemi reperfúzyonu sonucunda gelişen akciğer hasarının önlenmesinde farklı bir ajan: FK 506 (takrolimus). *Türk Gogus Kalp Dama* 2001; 9(4): 242-6.

Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA. *Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia*. 4th Edition. New York: John Wiley & Sons, 2013; pp. 765-85.

Turkez H, Geyikoglu F, Tatar A, Keles S, Ozkanc A. Effects of some boron compounds on peripheral human blood. *Zeitschrift für Natur for schung* 2007; 62:889-96.

Uysal A, Protective Effect of melatonin on lung injury caused by ischemia-reperfusion of the lower extremities. *Türk Gogus Kalp Dama* 2006; 14(4): 308-14.



The Investigation of Serum Estrogen, Progesterone, AMH and IGF-1 Profiles in Lactating and Non Lactating Mares after Altrenogest Administrations*

İbrahim Mert POLAT¹, Ömer KORKMAZ², Taha Burak ELİFOĞLU¹, İlknur Pir YAĞCI¹,
Hatice Esra ÇOLAKOĞLU³, Mert PEKCAN⁴

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Kırıkkale University, Kırıkkale-TURKEY

² Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Harran University, Harran, Şanlıurfa-TURKEY

³ Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara- TURKEY

⁴ Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara-TURKEY

Corresponding author: İbrahim Mert POLAT; e-mail: vethekert@gmail.com ORCID: 0000-0003-4029-1247

How to cite: Polat IM, Korkmaz O, Elifoğlu TB, Yağcı IP, Çolakoğlu HE, Pekcan M. The Investigation of Serum Estrogen, Progesterone, AMH and IGF-1 Profiles in Lactating and Non Lactating Mares after Altrenogest Administrations. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020;17(1): 63-67.

Summary: The objective of this study is to follow up the follicular growth in ovaries until mating by ultrasonography to determine of pregnancy rates, serum estrogen, progesterone, AMH and IGF-1 concentrations in mares which synchronized with altrenogest and to compare the obtained data with non-lactating mares. The study was carried out during breeding season while ovaries were active; lactating mares were included in Group 1 (n = 8) and non-lactating mares in Group 2 (n = 8). In both groups, synchronization was performed by administration of altrenogest (Regumate®) and prostaglandin F 2 alpha (PGF2α). Dominant follicle diameters of non-lactating mares were found to be greater than those of lactating ones. During the study, estrogen, progesterone, AMH and IGF-1 levels were significantly lower in the lactating mares. The non- lactating mares were found to have a first pregnancy conception rate (75%), similar to that of lactating mares (62%) ($\chi^2=1.54$, $P=0.62$). It was concluded that in the mares synchronized with altrenogest, the presence of lactation and the foal are significantly influences ovarian activities, ovarian steroid levels, AMH and IGF-1 levels. Therefore, in order to increase pregnancy rates in lactating mare, sexual cycle synchronization with altrenogest are considered to be a suitable method.

Key words: Altrenogest, anti müllerian, estrogen, lactation, mare, progesterone

Laktasyonda Olan ve Laktasyonda Olmayan Kısraklarda Altrenogest Uygulaması Sonrası Serum Östrojen, Progesteron, AMH ve IGF-1 Düzeylerinin Araştırılması

Özet: Sunulan çalışmanın amacı, altrenogest ile senkronize edilen laktasyondaki kısraklarda aşım zamanına kadar geçen süreçte ovaryumlardaki folliküler gelişimlerin ultrasonografi ile takibi, serum östrojen, progesteron, AMH ve IGF-1 konsantrasyonlarının ölçülmesi ve gebelik oranlarının değerlendirilerek bu verilerin laktasyonda olmayan kısraklarla karşılaştırılmasıdır. Çalışma, üreme sezonun başladığı ve ovaryumların aktif olduğu üreme sezonunda gerçekleştirildi; laktasyonda olan kısraklar Grup 1'e (n=8) ve laktasyonda olmayan kısraklar Grup 2'ye (n=8) dahil edildi Her iki gruba altrenogest (Regumate®) ve prostaglandin F2α ile senkronizasyon gerçekleştirildi. Laktasyonda olmayan kısrakların dominant follikül çapları laktasyonda olanlara göre daha büyük bulundu. Çalışma süresince toplanan kan örneklerinde östrojen, progesteron, AMH ve IGF-1 düzeyleri laktasyondaki kısraklarda belirgin olarak düşük bulundu. Laktasyonda olmayan kısrakların ilk aşımında gebe kalma oranı (%75), laktasyonda olan kısraklarla (%62.5) benzer bulundu ($\chi^2=1.54$, $P=0.62$). Altrenogest ile senkronize edilen kısraklarda laktasyonun ve tayın varlığının ovaryum faaliyetlerine, ovaryum steroid düzeylerine, AMH ve IGF-1 düzeylerine önemli oranda etki ettiği kanısına varıldı. Bu nedenle laktasyonda olan kısraklarda gebelik oranlarını arttırmak amacıyla altrenogest ile seksüel siklus senkronizasyonunun uygun bir yöntem olduğu düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Altrenogest, anti-müllerian, kısрак, laktasyon, östrojen, progesteron

Introduction

Estrus cycles of mares are controlled by the hormones which respond to photoperiod of season in mares. The photoreceptors of the retina turns light stimulus into signals and transfers these signals to

superior cervical ganglion which have adrenergic neuronal endings that reach the pineal gland and have action in different pathways of synthesis of melatonin. Thus, the increased exposure to photoperiod results in a decrease of melatonin secretion. As a result of decrease in melatonin secretion, gonadotropin releasing hormone (GnRH) is stimulated. The GnRH has a decent role in hypothalamic-pituitary axis and is transferred to adenohipophysis where it stimulates follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) responsible of follicle growth

Geliş Tarihi/Submission Date : 18.02.2020

Kabul Tarihi/Accepted Date : 17.03.2020

*This study is supported by Kırıkkale University, Scientific Research Projects Coordination Unit grant 2016/012

and ovulation (Satue and Gardon, 2013). Lactating mares have a completely different reproductive metabolism from those of cyclic mares (Heidler et al., 2003). At early lactation, alteration of Growth Hormone (GH), Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) and leptin have some roles in metabolism to regulate various mechanisms. These changes are beneficial to energy metabolism, apart from suppressing reproductive activity (Block et al., 2001). These hormonal alterations are most effective at early lactation right after delivery and their influence go down by time (Heidler et al., 2003). While GH is responsible for growth and development, it also mediates secretion of IGF-1 from liver and stimulates ovarian activity (Izadyar et al., 1998). Thus GH directly or with the help of IGF-1, in gonadotropin dependent or independent ways affects ovarian steroidogenesis (Hull and Harvey, 2000). Heidler et al. (2003) found that GH levels were lower in non-lactating mares than in lactating ones. However, researchers could not find any statistically meaningful difference in GH levels in cows at lactation than those in non-lactation period (Block et al., 2001). Estrogen is one of the determinative factors on IGF-1 levels and it elevates secretion of IGF-1. Also, estrogen augments number of GH receptors, so IGF-1 becomes more bio-effective (Ginther et al., 2002). The granulosa cells of pre-antral and small antral follicles secrete anti-mullerian hormone (AMH) (Ball et al 2008) and plasma concentration of AMH was found to be positively correlated with the number of follicles having a diameter of 6-20 mm in mares (Claes et al., 2014). AMH is secreted in minimal concentrations from follicles with a diameter greater than 30 mm (Ball et al., 2008) and its plasma concentration increases while follicles are developing (Vernunft et al., 2011). Although serum AMH concentrations may show individual variations among mares, these concentrations reportedly do not vary with the different stages of the estrous cycle or pregnancy (Ball et al., 2008; Almeida et al., 2011). Though many studies have shown the relationship between AMH and fertility, further studies are required to reveal the effects of lactation on AMH profile. The aim of this study is to monitor follicular growth in ovaries till mating and to investigate estrogen, progesterone, AMH, IGF-1 levels and pregnancy rates in mares which are synchronized with altrenogest, and to compare them with non-lactating mares which synchronized with altrenogest.

Material and Methods

Animals and study groups

The study was approved by Kırıkkale University Local Ethics Committee for Animal Experiments with the approval number 15/06. Sixteen mares with ages ranging between 4–10 years, a body condition score of at least 7, having given birth at least once, without any genital system infections, and with regular estrus

cycles were used. This study was carried out during breeding season while ovaries were active. The mares that lactate and were housed with their foals were included in group 1 (n=8), non-lactating mares were included in group 2 (n=8). Immediately before the study, USG examinations were performed, the mares with inactive ovaries or uterus pathologies were not included in the study. In this research, no artificial lighting, feed additive, hormone or drugs were used to stimulate ovarian activity

Ultrasonographic examinations

Ovaries and uterine horns were ultrasonographically examined daily with Pie Medical-Falco 100 device. Both uterine horns and ovarian follicle diameters were recorded. Examination of uterine horns with USG was performed using a linear transducer at the site of near corpus uteri via dorsal-ventral. Including both endometrial and stratum vascular layers, the distances between top and bottom serosal layers were measured as uterine horn diameter. Pregnancy examinations were performed with USG after mating at days 15, 35 and 60.

Drug administrations

For synchronization of estrus cycles; 0.044 mg/kg altrenogest (Regumate) administered orally daily for 12 days. At the 12th day of altrenogest administration, single dose of 12.5 mcg PGF2 α was administered intramuscularly.

Collection of blood samples and biochemical analyses

Blood samples were collected to plain vacuumed tubes from jugular vein right before drug administrations. Blood samples centrifuged at 3500 rpm for 15 minutes and stored at -20°C until analyses. Blood sera estrogen (Genway®), progesterone (Cayman®), AMH (Beckman®) and IGF-1 (IDS®) levels were measured with commercial ELISA kits and ELISA MAT-2000 microplate reader.

Statistical analyses

All the statistical analyses were performed using SPSS version 14.1. First, descriptive analyses of the parameters (mean and standard error) according to the experimental conditions were done. Then, the evaluation of normality by the Kolmogorov Smirnov test was performed. As all data were considered as nonparametric, Mann Whitney test was carried out. Statistical significance was considered when $P < 0.05$.

Results

During the study, follicle sizes of both groups have been measured daily. In both study groups, generally dominant follicle used to develop at right ovary. It is

Table 1 Mean values for estradiol, progesterone, IGF-I and AMH serum concentrations of lactating and non-lactating mares

Days of Sampling	Parameter ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)							
	E ₂ (pg/mL)		P ₄ (ng/mL)		IGF-I (ng/mL)		AMH (ng/mL)	
	LM	NLM	LM	NLM	LM	NLM	LM	NLM
0	7.6 ±0.87	8.72±1.4	1.14±0.1	2.80±0.4	27.3±1.9	48.7±4.1	0.32 ^a ±0.1	0.77 ^b ±0.0
3 rd	P=0.08		P=0.06		P=0.15		P=0.05	
	11.84±1.02	10.78±0.72	2.23±0.30	2.98±1.12	28.60 ^a ±2.26	54.86 ^b ±3.59	0.36 ^a ±0.20	0.62 ^b ±0.06
6 th	P=0.07		P=0.09		P=0.03		P=0.02	
	22.32±2.37	26.45±2.65	3.82 ^a ±0.12	7.52 ^b ±1.41	32.80 ^a ±2.70	62.24 ^b ±5.21	0.47 ^a ±0.12	0.84 ^b ±0.12
12 th	P=0.13		P=0.02		P=0.03		P=0.02	
	42.60±2.26	36.71±1.34	11.40 ^a ±1.12	16.40 ^b ±1.52	75.70 ^a ±4.21	88.77 ^b ±6.34	1.30 ^b ±0.45	1.11 ^c ±0.23
OD	P=0.16		P=0.026		P=0.05		P=0.012	
	64.62 ^a ±2.27	84.30 ^b ±1.67	0.32±0.11	0.48±0.03	108.50 ^b ±6.70	148.50 ^c ±7.65	0.56 ^a ±0.28	0.77 ^b ±0.27
	P=0.04		P=0.25		P=0.002		P=0.041	

LM: Lactating mares NLM: nonlactating mares. E₂: Estradiol, P₄: Progesterone, IGF-I: Insuline Like Growth Factor-I, AMH: Anti-mullerian hormone, OD: Day of ovulation

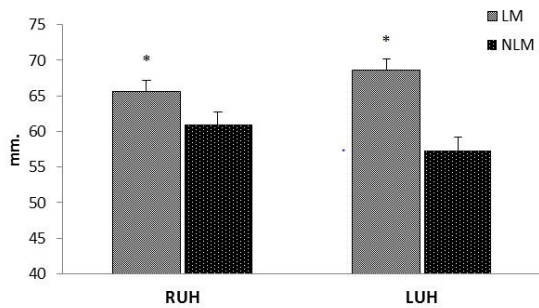


Figure 1. Mean diameters (standard error mean) of uterine horns during study period. **RUH:** Right uterine horn **LUH:** Left uterine horn. **LM:** Lactating mares **NLM:** Nonlactating mares. (* P<0.05)

found that, in lactating mares, dominant follicle sizes that ovulated are bigger than in non-lactating mares. It is observed that dominant follicle development used to take place on average 12-13 days after last drug treatment in both groups. Average dominant follicle diameter which will ovulate in lactating mares is measured as 43.2±0.82 mm and 52.6±0.63 mm in non-lactating mares (P<0,05). Even though ovarian activity was monitored with ultrasonography, the clinical signs of estrus in lactating mares were observed to be weaker than in non-lactating mares. The sizes of uterine horns in both groups have been shown in Figure 1.

In lactating mares, the diameter of right uterine horn

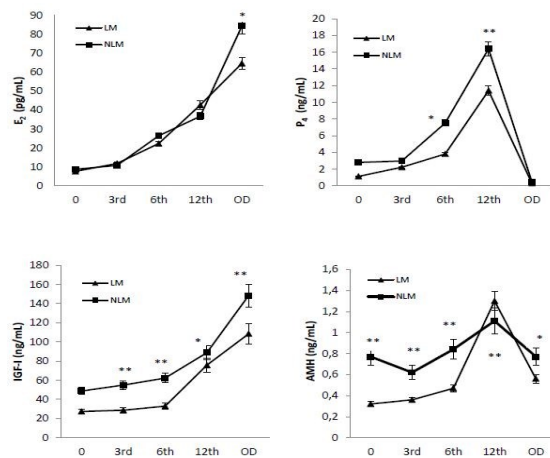


Figure 2. Mean values of estradiol, progesterone, IGF-I and AMH serum concentrations from day 0 to ovulation day of mares (*P<0.05, **P<0.01). **LM:** Lactating mares **NLM:** nonlactating mares. **E₂:** Estradiol, **P₄:** Progesterone, **IGF-I:** Insuline Like Growth Factor-I, **AMH:** Antimüllerian hormone. **OD:** Day of ovulation.

was observed to be bigger than in non-lactating ones. The results of blood serum analyses have presented in Figure 2 and Table 1.

Serum estradiol levels of lactating mares were observed to be lower than in non-lactating group. Moreover, though in both groups serum IGF-1 levels had sharp rises on ovulation day, a decrease was observed in serum AMH levels after selection of dominant follicle.

In the initial pregnancy diagnosis, similar pregnancy rates have been observed in both groups (5 at lactating mares, 6 at non lactating ones). One mare showed estrus signs at day 22 after coitus. USG examination showed that embryonic loss had occurred. Serum estradiol levels were found to be lower in lactating mares than non-lactating mares. The reason for this was thought to be that the dominant follicle diameters were smaller than the ones not in lactation.

Discussion and Conclusion

Maximum follicle sizes of ovaries could be 5 mm smaller in miniature breeds like pony and could be 10 mm bigger in giant breeds like Friesian. Also, in spring season, follicle size could be 5-8 mm bigger than in summer season (Brinsko et al., 2010). Moreover, A study by Koyla et al. (2000) reported that lactation had no effect on maximum follicle diameter in their research on five mares from two different breeds in a breeding season. In contrast to Koyla et al. (2000), the maximum follicle diameters differed between the groups in this study. Perkins and Grimmet (2001) reported that pregnancy rates in lactating and non-lactating mares (67 % vs. 66 %) were similar. In this study, similar pregnancy rates (6 in non-lactating mares and 5 in lactation) were obtained in both groups in the first pregnancy examination (day 15) after mating. One mare in lactation displayed estrus again on the 22nd day after mating. Ultrasonographic examination revealed an embryonic death. This finding was found to be similar to the one from the study by Van Niekerk and van Niekerk (1998a), which revealed a higher incidence of embryonic death in lactating mares. The primary source of progesterone is corpora lutea which is required for embryo-uterine interactions (embryo mobility and implantation) and uterine secretions. The progesterone levels were found lower in lactating mares (van Niekerk and van Niekerk, 1998b). It was thought that it may be a factor that may increase the risk of embryonic death in early pregnancy period. Plasma concentrations of progesterone gradually increased during altrenogest treatment from days 1 to 8 and rapidly decreased after the administration of prostaglandin (Korosua et al., 2012). In our study, similar to the study by Korosua et al. (2012), progesterone profiles rapidly increased on the 3rd days of altrenogest administrations. However, these increase were similar in both groups, the response of nonlactating mares was higher than lactating ones. Collins et al. (2014) compare the time of altrenogest therapy in Przewalski's mares. After altrenogest administrations for 12 days, estrogen and progesterone responses were higher than in a 14-day therapy.

Preantral and small antral follicles secrete AMH and the concentrations are positively correlated with the number of follicles and also 8 mm or larger follicles (Claes et al., 2014). AMH is secreted at low levels by

follicles with a diameter greater than 30 mm and its plasma concentration increases with the number of developing follicles. Although serum AMH concentrations may show individual variations among mares, these concentrations reportedly do not vary with the different stages of the estrous cycle, pregnancy and lactation period. In this study AMH levels were found significantly lower than in non-lactating mares. Whether these findings can be extrapolated to mares still remains to be determined. Further studies are required to determine AMH course during the whole lactation period. In addition, at 6th day of altrenogest treatment, AMH levels were rising in the same way in both groups when ovarian follicles reached 20-30 mm diameter. Even if AMH is low in lactating mares, it can be increased under the effects of progesterone treatment. Dominant follicles have higher IGF-1 levels than the largest subordinated follicles which are positively correlated with estradiol levels in mares. The increase in the IGF-1 concentration in the future dominant follicle reflects the follicle to decrease FSH sensitivity and increase LH availability. The other follicles in the follicular wave possess the same capacity for dominance but never reach similar sizes and the largest follicle alone continues developing, until it becomes dominant and ovulates (Salazar-Ortiz et al., 2014). IGF-1 has been shown to enhance FSH-induced granulosa cell differentiation, particularly LH receptor acquisition which is critical for adequate gonadotropin output because, prolactin can negatively regulate the LH response to GnRH especially in the presence of dopamine (Hodson et al., 2010). In a study in mare ovarian cell culture; prolactin stimulated cells were influenced from the GnRH response. Thus, in our study; the presence of lactation also prolactin and oxytocin can affect the maximum follicle diameter, negatively.

As a result, it is concluded that in mares which were synchronized with altrenogest, lactation and presence of foal have considerably effect on ovarian activity; especially on diameter of dominant follicle, ovarian steroids, levels of AMH and IGF-1. For this reason, it was thought that in order to increase pregnancy rates in lactating mares sexual cycle synchronization with altrenogest could be appropriate method. Furthermore, it was confirmed that altrenogest, in combination with PGF2 α , has tremendous potential for optimizing the fertility in lactating mares.

Acknowledgments

This study is supported by Kirikkale University, Scientific Research Projects Coordination Unit grant 2016/012.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial rela-

tionships that could be construed as a potential conflict of interest.

REFERENCES

- Almeida J, Ball BA, Conley AJ, Place NJ, Liu IKM, Scholtz EL, Mathewson L, Stanley SD, Moeller BC. Biological and clinical significance of anti-Müllerian hormone determination in blood serum of the mare. *Theriogenology* 2011; 76(8): 1393-403.
- Ball BA, Conley AJ, MacLaughlin DT, Grundy SA, Sabuer K, Liu IKM. Expression of anti-Müllerian hormone (AMH) in equine granulosa-cell tumors and in normal equine ovaries. *Theriogenology* 2008; 70: 968-977.
- Block SS, Butler RW, Ehrhardt RA, Bell AW, Van Amburgh ME, Boisclair YR. Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *J Endocrinol* 2001; 171: 339-48.
- Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, Hartman D. *Manual of Equine Reproduction*. Third Edition. Mosby Elsevier, 2010; pp. 124-8.
- Claes A, Ball BA, Scoggin KE, Esteller-Vico A, Kalmár JJ, Conley AJ, Squires EL, Troedsson MH. The interrelationship between anti-Müllerian hormone, ovarian follicular populations and age in mares. *Equine Vet J* 2014; 47: 537-41.
- Collins CW, Monfort SL, Vick MM, Wolfe BA, Weiss RB, Keefer CL, Songsasen N. Oral and injectable synthetic progestagens effectively manipulate the estrous cycle in the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*). *Animal Reproduction Science* 2014; 148(1-2): 42-52.
- Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Kot K. Activin A, estradiol, and free insulin-like growth factor I in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. *Biol Reprod* 2002; 67: 14-9.
- Heidler B, Parvizi N, Sauerwein H, Bruckmaier RM, Heintges U, Aurich JE, Aurich C. Effects of lactation on metabolic and reproductive hormones in Lipizzaner mares. *Domest Anim Endocrinol* 2003; 25: 47-59.
- Hodson DJ, Townsend J, Gregory SJ, Walters C, Tortorese DJ. Role of prolactin in the gonadotroph responsiveness to gonadotrophin releasing hormone during the equine annual reproductive cycle. *J Neuroendocrinol* 2010; 22(6): 509-17.
- Hull KL, Harvey S. Growth hormone: a reproductive endocrine-paracrine regulator? *Rev Reprod* 2000; 5: 175-82.
- Izadyar F, Hage WJ, Colenbrander B, Bevers MM. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. *Mol Reprod Develop* 1998; 49: 444-53.
- Korosue K, Murase H, Sato F, Ishimaru M, Harada T, Watanabe G, Taya K, Nambo Y. Successful induction of lactation in a barren Thoroughbred mare: growth of a foal raised on induced lactation and the corresponding maternal hormone profiles. *J Vet Med Sci* 2012; 74(8): 995-1002.
- Koyla GR, Sheryt SK, Lynn GN. Follicular growth and estradiol concentrations in foaling and nonparturient mares. *J Equine Vet Sci* 2000; 20(4): 266-8.
- Perkins NR, Grimmett JB. Pregnancy and twinning rate in thoroughbred mares following the administration of human chorionic gonadotropine (hCG). *N Z Vet J* 2001; 49: 94-100.
- Salazar-Ortiz J, Monget P, Guillaume D. The influence of nutrition on the insulin-like growth factor system and the concentrations of growth hormone, glucose, insulin, gonadotropins and progesterone in ovarian follicular fluid and plasma from adult female horses (*Equus caballus*). *Reprod Biol Endocrinol* 2014; 12(1): 72.
- Satue K, Gardon KJ. A Review of the estrous cycle and the neuroendocrine mechanisms in the mare. *J Steroids Horm Sci* 2013; 115(4): 1-8.
- Van Niekerk CH, Van Niekerk FE. The effect of dietary protein on reproduction in the mare. VII. Embryonic development, early embryonic death, foetal losses and their relationship with serum progestagen. *J S Afr Vet Med Assoc* 1998a; 69: 150-5.
- Van Niekerk FE, Van Niekerk CH. The effect of dietary protein on reproduction in the mare. VI. Serum progestagen concentrations during pregnancy. *J S Afr Vet Assoc* 1998b; 69: 143-9.
- Vernunft A, Schneider F, Tuchscherer A, Becker F, Kanitz W. AntiMüller-Hormon (AMH) kann zur vorhersage des follikelwachstums bei stuten dienen. *Pferdeheilkunde* 2011; 27(3): 293-6.



Bisfenoller ve Fitalatların Halk Sağlığı Üzerine Etkileri

Yeliz YILDIRIM¹, Nurhan ERTAŞ ONMAZ¹, Zafer GÖNÜLALAN¹, Harun HIZLISOY², Serhat AL¹,
Candan CANDEMİR GÜNGÖR¹, Hüseyin Burak DİŞLİ¹, Adalet DİŞHAN¹, Mukaddes BAREL¹

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Yeliz YILDIRIM; E-posta: yyildirim@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0001-8783-3889

Atıf yapmak için: Yıldırım Y, Ertaş Onmaz N, Gönülalan Z, Hızlısoy H, Al S, Candemir Güngör C. Bisfenoller ve fitalatların halk sağlığı üzerine etkileri. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020;17(1): 68-75.

Özet: 2000'li yıllardan önce gıdalardaki biyolojik tehlikeler endişe yaratırken kimyasal endüstrisindeki atımlar gıdalardaki kimyasal tehlikeleri ön plana taşımıştır. İkinci dünya savaşından sonra kimyasal kullanımı kırılmaz biberondan, ev eşyasına ve yemek servisine kadar hayatın her alanında yaygınlaşmıştır. Günlük hayatımızda kullandığımız eşyaların yapısında 80 binden fazla kimyasal bulunmaktadır. Bu kimyasalların çoğu halk sağlığı açısından henüz test edilmiş değildir. Kimyasallara; "aksi kanıtlanmadığı sürece masumdur" yaklaşımı uygulanmaktadır ki bu yaklaşım halk sağlığı açısından risk teşkil etmektedir. Günümüzde normal bir insanın kanında ve idrarında 200'den fazla kimyasal bulunmaktadır. Bu kimyasallar amniyotik sıvıdan, anne sütünden, bebek kordonundan ve mekonyumdan da analiz edilebilmektedir. Erken dönemde maruz kalınan kimyasallar ileri yaşlardaki kronik hastalıkların temelini oluşturmaktadır. Bu toksikantlardan en çok fitalatlar ve bisfenol-A (BPA) üzerinde durulmaktadır. Fitalatlar, plastikleri yumuşatmak, bisfenol-A ise sertleştirmek için kullanılmakta, fitalatlar aynı zamanda kozmetiklerde de kullanılmaktadır. Bu kimyasallar vücutta hormonları taklit ederek endokrin sistemi ve fizyolojik fonksiyonları bozmaktadır. Gebelik esnasında maruz kalındığında bu kimyasallar; hamileliğin hangi döneminde maruz kalındığına bağlı olarak hem anneyi hem de fetal gelişimi etkilemekte, başta erkek çocuklar olmak üzere beyin ve üreme organlarının gelişimini engellemektedir. Endokrin bozucu bu kimyasalların etkileri, ne miktarda, ne kadar süre alındıklarına ve bireylerin yaşam tarzlarına göre değişmektedir. Bu kimyasallar beyinde üretilen hormonları da etkileyerek çocuklarda disleksi ve hafıza problemlerine neden olabilmektedir. Erken yaşlarda maruziyet ileriki yaşlarda davranış bozuklukları, depresyon, anksiyete, allerji, solunum yolu hastalıklarına sebebiyet vermekte, pubertal gelişimi etkilemekte ileri yaşlarda ise obezite, diyabet ve tümörögenesi tetiklemektedir. Özellikle anne karnında, düşük dozdaki kimyasallar bile bebek beyinde büyük hasarlara neden olabilmekte, ileride hızlı düşünmeyi ve tepki vermeyi engelleyebilmektedir.

Anahtar kelimeler: Bisfenoller, endokrin bozucular, fitalatlar, halk sağlığı

Effects of Bisphenols and Phthalates on Public Health

Summary: Before 2000s; biological hazards in foods were the major public health concerns however, great increase in plastic industry, has carried chemicals to the highest level of concern. After the Second World War, the use of chemicals in all areas of life, from baby bottles, furniture to food service, has become widespread. Currently, over 80,000 chemicals are used in everyday products. Most of them are not yet tested for their public health effects. "Innocent unless proven otherwise" approach is applied to the chemicals, which means a significant risk for public health. More than 200 chemicals are detected in the blood and urine of almost every individual. Chemicals can also be analyzed from amniotic fluid, mother milk, baby cord and meconium. Early exposure to chemicals forms the basis of chronic diseases in later ages. Phthalates and bisphenol-A (BPA) are the most emphasized toxicants. Both are used to soften and harden the plastics and phthalates are also used in cosmetics. They mimic the hormones and disrupt the endocrine system in human. When exposed during pregnancy, they affect the fetus by blocking the development of brain and reproductive organs especially in boys. Their effects vary depending on how much and how long they are being exposed and people's lifestyle. Endocrine-disrupting chemicals can also interfere with brain hormones causing dyslexia and memory problems in children. Exposure in early life causes behavioral disorders, depression, anxiety, allergy, respiratory diseases, early pubertal development, obesity, diabetes and tumorigenesis in later ages. Even low levels of chemicals can prevent rapid thinking and fast reacting.

Key words: Bisphenol, endocrine disruptors, phthalates, public health

Giriş

Fitalatlar renksiz, kokusuz, yüksek kaynama noktasına (280-400°C), düşük uçuculuğa ve düşük suda

çözünbilme kapasitesine sahip yağ benzeri sıvıdır. Yapıştırıcıların, kozmetiklerin, kokuların (fragrance), boyaların, yazıcı mürekkeplerinin ve daha birçok endüstriyel ürünün yapısında bulunmakta ve doğada çok yavaş yok olmaktadır (Montouri ve ark., 2008). Bu kimyasallar kullanıldıkları üründen

koparak ortama geçmeye eğilimli olup, ortama dağılma potansiyelleri, ortamın pH'sına, temas süresine, depolama sıcaklığına, kimyasal yapısına ve lipofilik olup olmamasına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Canlılara ait biyolojik sıvılar da dahil farklı matrislerde varlıkları tespit edilmiştir (Bosnir ve ark., 2007).

Fitalatlar insan popülasyonunun yaygın bir şekilde maruz kaldığı, her yerde bulunabilen çevresel kontaminantlardır. Özellikle kadınların idrarlarındaki çoklu fitalat metabolitlerinden sıklıkla parfüm ve kozmetikler sorumlu tutulmakta, fitalatlar aynı zamanda bazı gıdalarda, ilaçlarda ve diyet takviye ürünlerinde de bulunabilmektedir. Plastiklerdeki yiyecek ve içecekler temel kirlilik kontaminantları olarak bu kimyasalı içerir. Plastik damacana ve pet şişelerde satılan sular da söz konusu kimyasalla kontamine olabilmektedir. Şişelenmiş suların yüksek ısılarla depolanması suya geçen fitalat düzeylerini artırmaktadır. Yapılan bir çalışmada, 50°C'de bekletilen şişe sularındaki fitalat oranları, oda ısısında bekletilenlere oranla oldukça yüksek bulunmuştur (Zaater ve ark., 2014).

Fitalatların birçoğunun endokrin bozucu olduğu ve büyüme ve üremeyi engellediği bilinmektedir. Fitalatların ayrıca girdiği dokuda irritasyon ve kansere neden olabileceği, endokrin ve üreme sistemlerini etkileyerek, kızlarda az gelişmiş göğüs yapılarına erkeklerde ise sperm canlılığı ve sayısı üzerine olumsuz etkilere neden olabileceği belirtilmektedir. Prenatal dönemde maruz kalındığında MEHP (mono-(2- etilhegzil fitalat)'in ilk aylarda düşüklere neden olduğu vurgulanmaktadır (Pant ve ark., 2011).

Büyük popülasyon kitleleri günlük hayatları dahilinde fitalatlara ilaveten bisfenol A (BPA)'ya da maruz kalmaktadır. Maruziyet kaynakları başlıca; diş dolguları, konserve gıdalar ve içecekler, polikarbonat su pompalar, yenidoğan bakım ünitelerindeki medikal cihazlar, duş perdeleri, mutfak ve çamaşır deterjanları, ev temizlik ürünleri, sabunlar, losyonlar, şampuanlar, traş kremleri, ojeler, güneş kremleri, kağıt paralar, ev tozu ve alışveriş fişleri olarak sıralanmaktadır. Kanada'da yapılan bir çalışmada popülasyonun %90'ının idrarında belirlenebilir düzeylerde östrojen aktivitesi gösteren BPA varlığı ortaya konmuştur (Zhou ve ark., 2015).

BPA tüm dünya çapında en yaygın kullanılan sentetik bileşiktir. En endişe verici olan ise başta konserve gıdalar olmak üzere içecek kaplarının yapımında kullanılması ve içeriğe karışmasıdır. Çeşitli yollardan alınan BPA'lar kandın ve idrardan tespit edilebilmektedir. Toplam 2517 katılımcının incelendiği bir çalışmada; kadınların erkeklerden, çocukların ise yetişkinlerden daha yüksek oranda BPA'ya maruz kaldığı belirlenmiştir. Şehir hayatı yaşayanların %41'inin, kırsal hayat yaşayanların ise %14.8'inin saç örneğinden BPA tespit edilmiş ve dolayısıyla yaşam tarzının

BPA maruziyetinde önemli bir indikatör olduğu sonucuna varılmıştır (Schönfelder ve ark., 2012).

BPA diyetle vücuda alındıktan sonra plasenta ve fetusta en yüksek konsantrasyonlara ulaşmaktadır. BPA'nın bu şekildeki akümülyasyonu DNA'da kolay onarılabilen kopmalara eden olabileceği gibi onarılmayan çoklu kırılmalara da sebebiyet verebilmektedir. Her ne kadar karaciğer BPA'yı glukorinidasyon ve sülfasyon yolları ile metabolize edebiliyorsa da ortaya çıkan ara ürünler DNA'ya yapışmaktadır. BPA'nın düşük dozlarının bile hücrelerde çeşitli sinyalizasyon bozukluklarına, vücutta şekilsel bozukluklara ve hatta tümorogenezise yol açtığı belirtilmektedir. Yine düşük düzeylerdeki BPA maruziyeti kalsiyum disregulasyonuna yol açmaktadır (Jalal ve ark., 2018).

Hamile kadınların kanında tespit edilen serbest veya konjüge formadaki BPA'nın plasenta ve gelişmekte olan fetüste yoğunlaştığı ve bu olgunun hayvan deneylerinde doğumsal defektlerle sonuçlandığı (Lee ve ark., 2005), erkek fetuslardaki BPA birikiminin dişi fetuslara oranla daha fazla olduğu (Padmanabhan ve ark., 2008) bildirilmiştir. Kuzey Amerika ve Avrupa, BPA'nın gıda kaplarında kullanımını yasaklama yönünde önemli adımlar atmışken, 2008 yılında BPA kullanımını yasaklayan Kanada olmuştur. Genel olarak Asya ülkeleri BPA'nın biyotoksik etkilerinin henüz yeni farkına varmıştır. EFSA ise 2011 yılında BPA'nın günlük tolere edilebilir alım düzeylerini 50 ug/kg Vücut ağırlığı (va)/gün' den (0.05 mg/kg) 4 ug/kg va/gün'e düşürmüştür. Avrupa, bebek biberonlarında BPA kullanımını sınırlandırmıştır (EFSA, 2015).

Maruziyet yolları ve etkileri

Bisfenoller ve fitalatlar ağız yolu ile alındıklarında glukorinidasyon veya sülfasyonu da içeren bir metabolizmaya uğradıktan sonra kan-plasenta bariyerini geçerek yavruya ulaşmakta, hormonları taklit ederek gelişim ve üremeyi engelleyici etkileri ortaya koymaktadır (Philips ve ark., 2018). İnsanların fitalatlara muhtemel maruz kalma yolları; oral, dermal, inhalasyon ve intravenöz yollarla olmaktadır. Absorbsiyondan sonra bu bileşikler monoesterlere metabolize olup glukoronidler olarak idrarla atılır. İdrarda fitalat bulunması bu etkene maruz kalındığının belirtisi olarak değerlendirilmektedir (Lin ve ark., 2018). Gün içerisinde en çok, alışveriş fişleri temasıyla BPA 'ya maruz kalındığı belirtilmektedir. Yapılan bir araştırmaya göre 5 saniye boyunca alışveriş fişini elinde tutan bir insanın maruz kalacağı BPA düzeylerinin 0.2-6 µg (ortalama 1µg) düzeylerinde olduğu; el terli, kremli veya yağlı ise 10 kat fazla maruziyetin söz konusu olduğu belirtilmektedir. Bu durumda günde 10 saat boyunca alışveriş fişlerine temas eden çalışanların yüksek düzeyde BPA'ya maruz kaldığı ve bu fişlerin herhangi bir el bakım ürünü uygulanmış deri ile teması sonucunda transdermal geçişin 100 katı kadar artabileceği (BPA lipofilik bir bileşendir) belirtilmektedir.

dir (Biedermann ve ark., 2010). Fitalat ve çevresel fenollerin sıklıkla obezite, baş ağrısı, öksürük ve kaşınmaya neden olduğu bilinmektedir. Bunu yanı sıra endometriyozise ve sperm motilitesinde azalmalara neden olduğu belirtilmektedir (Zhang ve ark., 2018). Yüksek düzeydeki BPA maruziyetinin sitotoksik ve DNA'ya hasar verici etkiler ortaya koyarken; düşük dozlardaki maruziyetin ise kemik gelişimi ve göğüs kanseri oluşumu üzerine etkileri vurgulanmaktadır. DNA da meydana gelen hasarların birçoğunun onarılabılır nitelikte olmasına karşın, çift iplikli DNA hasarının onarılamadığı belirtilmektedir. BPA dinamiklerinin bilinenin çok daha ötesinde etkiler ortaya koyabileceği beyinde sinir impulslarının elektrokimyasal geçişleri üzerine de etkili olabileceği belirtilmektedir. BPA'nın özellikle gıda ile temasının yasaklanması önemli bir adım olsa da sadece yüksek dozlarının değil çok düşük dozlarının dahi ciddi sağlık sorunlarına yol açabileceği, sadece kısırlık sorunlarına değil karsinogenik ve mutajenik etkilerinin de olabileceği bildirilmektedir. Düşük düzeylerde maruz kalınan BPA'ların osteoblast olma yönünde farklılaşması gereken kök hücrelerinin, yağ hücresi olarak değişmesine neden olduğu ve kemik oluşumuna zarar verdiği belirtilmektedir (Jalal ve ark., 2018). Ortamda bulunan fitalat ve fitalat metabolitlerinin çocuklukta astım ve hırıltılı solunum gibi alerjik hastalıklarla yakından ilişkili olduğu belirtilmektedir. Özellikle ev tozları ve PVC yüzey kaplamalarının (Jaakkola ve Knight, 2008) astım vakalarıyla ilişkisi vurgulanmaktadır. Yapılan bir çalışmada idrarında fazla miktarda fitalat ve metabolitlerinin saptandığı çocukların akciğer fonksiyonlarının düşük bulunduğu belirtilmektedir (Lin ve ark., 2018). Yapılan bir çalışmada prenatal dönemde idrarında yüksek miktarda BPA ve diklorofenol bulunan annelerin erkek çocuklarında doğumdan sonra solunum ve alerjik sorunlar yaşandığı, kız çocuklarında böyle bir etki gözlenmediği belirtilmiştir. Bir diğer çalışmada ise prenatal dönemde maruz kalınan çeşitli kimyasalların 5 yaşına kadar olan erkek çocuklarda alerji ve solunum yolu hastalıklarına sebebiyet verdiği teyit edilmiştir (Vernet ve ark., 2017). Benzer bir çalışmada özellikle erkek çocuklardaki astım olgularıyla sıklıkla gebeliğin son trimesterinde maruz kalınan BPA konsantrasyonları arasında güçlü bir ilişki olduğu bildirilmektedir. Prenatal dönemde BPA'ya maruz kalan çocuklarda hırıltılı solunum ve astım, gebeliğin 2. trimesterinde BPA'ya maruz kalan çocuklarda ise hırıltılı solunum gözlemlendiği bildirilmiştir (Xie ve ark., 2016). Gebeliğin spesifik dönemlerinde maruz kalınan belli kimyasalların farklı cinsiyetlerdeki çocuklarda farklı sorunlara sebebiyet verebileceği, gebeliğin ilk trimesterinde maruz kalınan kimyasalların hırıltılı solunuma, geç dönemdeki maruziyetin ise astıma neden olabileceği belirtilmektedir. Yine atopik deri lezyonlarına ilişkin; anne karnında ve erken yaşlarda maruz kalınan BPA'ların kızlarda değil ama erkek çocuklarda isilik, egzema ve ürtiker oluşumuna sebep olabileceği bildirilmektedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, BPA'nın üreme sistemini, insülin üretimi-

ni, mental ve motor gelişimi ve immun sistemi etkilediğini ortaya koymaktadır (Rochester, 2013; Vernet ve ark., 2017; Zhou ve ark., 2015). Çin'de üniversite öğrencilerinin %60'ından fazlasının idrar örneklerinde 9 ayrı fitalat metaboliti, 3 paraben türevi ve BPA varlığı tespit edilmiş; kız öğrencilerin fitalat, paraben ve triklosanlara çok daha yüksek düzeyde maruz kaldıkları bunun da muhtemelen bireysel bakım ürünü kullanmalarından kaynaklandığı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2018).

Fitalatlara maruz kalma yollarından genellikle oral ve inhalasyonla alımlar üzerine yoğunlaşmış, deri yolu ile maruziyetler göz ardı edilmiştir. Fitalatların inhalasyona oranla, deri yoluyla 10 ila 20 kat fazla geçiş yaptığı belirtilmektedir (Weschler ve Nazaroff, 2014). Deri ile temas eden kimyasallar direk olarak dermal kapilları geçerek doku ve organlara ulaşmaktadır. Elle yemek yeme alışkanlığı olanlarda, eldeki fitalatların ağız yoluyla alınması da olası görülmektedir. Islak mendillerde bulunan alev söndürücülerle insan serumundaki düzeyler yakın ilişkili bulunmuştur. Islak mendillerdeki kimyasalların havaya karışmasıyla inhalasyon yolu ile alım da söz konusu olmaktadır. Deri yoluyla maruziyet, kıyafetlerin yıkanma sıklığına ve şekline, yüzeylerle temas durumuna ve kıyafetlerin değiştirilme periyoduna bağlı olarak da değişmektedir. Özet olarak insanların günlük aktiviteleri, tercihleri ve alışkanlıklarına göre deri yoluyla maruz kalınan fitalat oranları değişmektedir (Bu ve ark., 2018). Ağız yoluyla alınan BPA gastrointestinal sistemden geçerek biyolojik olarak inaktif moleküllere dönüşebilmekte, dermal yolla alındığında kısmi bir metabolizasyona uğramaktadır (Toner ve ark., 2018). Serumdan ölçülen fitalat konsantrasyonlarının, kısa süreli maruziyetler sonucu ortaya çıkan düşük fitalat konsantrasyonlarını belirleyebilirken, idrar fitalat metabolitlerinin ise uzun süre maruz kalınan yüksek düzeydeki konsantrasyonları belirleyebildiği belirtilmektedir (Calafat ve ark., 2015).

Bebeklerin maruziyeti

Bebek biberonlarında 2003 yılında BPA varlığı bir alarm olarak duyurulmuştur (Brede ve ark., 2003). Bazı ülkelerde bununla ilgili yasal önlemler alınmış olsa da hala ciddi yasal boşluklar bulunmaktadır. Çocuk takıları, oyuncakları, bebek kozmetikleri, bebek bezi, bebek minderi, bebek tekstilleri, bebek besleme ve banyo materyalleri incelenmiş; bebek takımlarının %23'ünün kurşun içerdiği; bebek tekstili, minderi ve bebek bezlerinin %14-45'inin fitalat ve BPA içerdiği belirlenmiştir (Negev ve ark., 2018). Bebek ve çocukların nesnelere, özellikle oyuncakları, ağızına alarak tanınması, bu yaş grubunun oral yolla fitalatlara yoğun bir şekilde maruz kalmalarına neden olmaktadır. Bebeklerin fitalat, BPA ve alev önleyicilere en sık maruz kaldıkları kaynaklar puset, araba koltukları ve bebek yastıkları olarak sıralanmaktadır (Negev ve ark., 2018). 2010 yılında McDonalds'a ait oyuncaklar, oyuncak boyalarındaki içerikten dolayı toplatılmıştır

(CPSC, 2017). İnternet alışverişleri uluslar arası bir regülasyonla düzenlenemediğinden bu şekilde temin edilen ucuz oyuncaklar, yerel sağlık standartlarına uymamakta ve halk sağlığı riski teşkil etmektedir (Negev ve ark., 2018).

Erkek çocuklardaki etkileri

Yeni doğan erkek çocuklarda anogential aralığın kısa olması; üreme sistemi toksisitesinin erken belirtisi olarak kabul edilmekte ve annenin halilelik esnasında fitalat maruziyeti ile ilişkilendirilmektedir. Fitalatların doğum ağırlığı üzerindeki etkileri tam olarak bir netliğe kavuşmasa da yapılan bir çalışmada düşük doğum ağırlıklı bebek doğumları ile fitalat maruziyeti arasında korelasyon gözlemlendiği belirtilmektedir (Zhang ve ark., 2018). Son yıllarda özellikle çocuklarda mental ve davranış bozukluklarına ilişkin önemli artışlar halk sağlığı açısından önemli bir problem haline gelmiştir. Toplumdaki genç bireylerin %17'sinin duygusal, mental ve davranışsal bozukluklar yaşadığı bildirilmektedir. Hamilelik esnasında BPA maruziyetinin erken yaşam dönemlerinde nöro-gelişimsel ve davranış problemlerine yol açtığına dair çalışmalar bulunmaktadır. Fitalatlar özellikle anne karnındaki erkek çocuklarda anti-androjenik etkilerle üreme organlarının gelişimini de engellemektedir (Negev ve ark., 2018). Çocuklarda görülen mental sorunların başında dikkat dağınıklığı ve hiperaktivite gelirken, davranış problemleri, anksiyete ve depresyona da çok sık rastlanmakta ve bu bozukluklar ileride çocukların öğrenme yeteneğini ve genel sağlığını önemli ölçüde etkilemektedir. Sadece Amerika' da 24 yaş altı bireylerde mental ve davranışsal bozukluklar ilişkin sağlık harcamaları kişi başına 2380 dolara ulaşmıştır. Yapılan bir araştırmada toplumun %93'ünün idrarında BPA tespit edilmiş ve en yüksek BPA düzeyleri ise kadınlarda ve düşük gelirli bireylerde gözlemlenmiştir. Anne karnında BPA'ya maruz kalan erkek çocuklarda duygusal duyarlılık, agresyon ve depresyon semptomlarının gözlemlendiği belirtilmektedir (Wolstenholme Negev ve ark., 2011). Anne karnındaki maruziyetlerin erkek çocukları, doğum sonrası erken çocukluk dönemindeki maruziyetlerin ise kız çocukları daha çok etkilediği, anne karnındaki erkek çocuk beyninin, çeşitli tarım ilaçları ve kurşun gibi kimyasallara da çok duyarlı olduğu; davranış problemlerine ve IQ düşüklüğüne neden olduğu belirtilmektedir (Roen ve ark., 2015).

Fitalat ve BPA'ların sırasıyla anti-androjenik ve östrojenik mekanizmalar yoluyla hormon metabolizmalarını bozdukları iyi bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada erkek çocuklarda gebelik sürecinde maruz kalınan kimyasalların pubertal gelişimi geciktirdiği, BPA'ların total ve serbest testosteron düzeylerini düşürdüğü belirtilmektedir. Yine erkek fetuslardaki BPA birikiminin dişi fetuslara oranla daha fazla olduğu bildirilmektedir (Jalal ve ark., 2018). Prenatal ve erken çocukluk dönemlerinde BPA maruziyetinin 9 ila 7 yaş aralığının

daki çocuklardaki etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada, anne karnında BPA'ya maruz kalan erkek çocukların depresyon ve agresif davranış skorlarının artış gösterdiği ve bu durumun kalıcı davranış haline dönüşme meyilinde olduğu; kızlarda ise postnatal BPA maruziyetinin depresyon ve agresif davranış skorlarında artışa neden olduğu bildirilmektedir (Braun ve ark., 2017). Bu durumda anne karnında veya doğumdan sonra maruz kalınan BPA'ların çocukları cinsiyet spesifik olarak etkilediği ortaya çıkmaktadır (Roen ve ark., 2015).

Kız çocuklarındaki etkileri

Annenin fitalat maruziyeti anne karnındaki bebekte mental ve motor gelişimin yavaşlamasına ve ileride içe kapanık davranış durumlarına neden olabilmekte, özellikle kız çocuklarda psikomotor gelişiminde azalmalarla sonuçlanabilmektedir (Téllez-Rojo ve ark., 2013).

Son yıllarda kız çocuklarında erken puberta olguları dünya çapında önemli bir artış göstermiştir. Erken puberta ise erken gençlik döneminde alkol ve diğer bağımlılık yaratan maddelere eğilim, psikolojik ve sosyal durum değişiklikleri ile birlikte, yetişkinlikte metabolik sendrom, Tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve endokrin temelli kanser oluşumlarına sebebiyet vermektedir (Prentice ve Viner, 2013). Aşırı beslenme ve obezite de erken pubertaya sebebiyet veren faktörler arasında sayılmaktadır (Shalitin ve Kiess, 2017). Fitalat ve BPA maruziyetinin kız çocuklarında erken pubertaya neden olduğu; bunun da psikolojik ve fizyolojik durumları etkileyerek ileriki yaşlarda kardiyometabolik hastalıklara yol açtığı, kanser riskini önemli düzeyde arttırdığı bilinmektedir. Bu çerçevede Meksika'da yapılan bir çalışmada anne karnındaki kız çocuklarının kritik dönemlerde fitalat ve BPA maruziyetine, reproduktif gelişim açısından çok duyarlı oldukları belirlenmiştir (Watkins ve ark., 2017). Kız çocuklarında reproduktif gelişime ilişkin bazı anormalliklerin anne karnında belli periyotlarda maruz kalınan fitalat ve BPA düzeyleri ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Gebeliğin ilk trimesterinde maruz kalınan fitalatların kız çocuklarında erken menstural siklus başlangıcına, 2. trimesterde maruz kalınan BPA'ların ise erken göğüs gelişimine sebebiyet verdiği belirtilmektedir (Watkins ve ark., 2017).

Hamilelerde etkileri

Avrupada sadece obezite ve diyetle ilişkin sağlık harcamalarının 17 milyon euroyu geçtiği, bu iki önemli halk sağlığı sorununun ise temelde fetal ve çocukluk döneminde maruz kalınan fitalat ve bisfenollerle ilişkili olduğu belirtilmektedir (Legler ve ark., 2015).

Hamileliğin spesifik dönemlerinde maruz kalınan fitalat düzeylerinin yavrudaki doğum ağırlığını, boy uzunluğunu, kafa çevresini önemli düzeyde etkilediği ve prematüre doğum riskini arttırdığı bildirilmiştir

(Watkins ve ark., 2016). Hamilelikte maruz kalınan BPA'nın kız çocuklarında değil ama erkek çocuklarda vücut kitle indeksi ve adipoziteyi etkilediği belirlenmiştir (Vafeiadi ve ark., 2016). Bununla birlikte doğumdan sonraki ilk çocukluk dönemlerinde maruz kalınan BPA'nın çocuklarda gelişen adipoziteyle yüksek oranda ilişkili olduğu belirlenmiştir. Fazla gıda tüketimi ve yetersiz fiziksel aktivite de obeziteye yol açan risk faktörleri arasında sayılsa da, günümüzdeki obezite epidemisini açıklayabilecek kadar etkili görülmemektedir. Çevreden maruz kalınan obezogen kimyasallar, yağ birikimini teşvik etmekte özellikle erken yaşlarda veya hamilelik döneminde maruz kalındığında daha etkili olmaktadır. Obezogenik kimyasallar başta kalıcı organik kirleticiler (DDT, organoklorürlü bileşikler, dioksinler, dibenzofronlar) olmak üzere fitalatlar ve BPA olarak sıralanmaktadır (Vafeiadi ve ark., 2016).

Son 10-20 yılda fitalat ve BPA maruziyeti, Kuzey Amerika ve Avrupa birliğinde yasal düzenlemelere neden olmuş, bu düzenlemeler sadece oyuncak ve bebek bakım ürünleriyle sınırlı kalmış ve bunların yerine sentetik analoglarının kullanımında artışlar görülmüştür (Zota ve ark., 2015). Hamile kadınlar arasında görülen bisfenol ve fitalat konsantrasyonlarının annenin yaşam tarzı, vücut kitle indeksi ve folik asit yetersizliği ile çok yakından alakalı olduğu belirtilmektedir (Philips ve ark., 2018). 1396 anne adayında endokrin bozucuların araştırıldığı bir çalışmada hamilelerin sırasıyla %79.2 ve %90'ında BPA ve fitalat tespit edilmiştir (Philips ve ark., 2018).

Fitalat ve BPA'ya gıda yolu ile maruziyet; bazı gıda gruplarına yönelik tüketim eğilimleri, yaşam tarzı, tüketim alışkanlıkları ile alakalı olup, diyet yoluyla sıklıkla fitalat maruziyeti söz konusu olmaktadır (Schettler, 2006). Yapılan bir çalışmada sigara içenlerin veya sadece gebelik esnasında bırakanların idrarındaki BPA konsantrasyonlarının yüksek bulunduğu, açken idrar verenlerde, düşük geliri ve düşük eğitimli kişilerde yüksek görüldüğü belirtilmektedir (Arbuckle ve ark., 2014).

BPA güçlü bir ovarian toksikanttır. Anne karnında BPA'ya maruz kalan kız bebeklerde primordial folikül yüzdeleri düşmektedir. Özellikle fetal ovaryumda profaz oluşumları engellemekte, çok düşük dozlardaki maruziyet bile primordial folikül oluşumunu azaltmaktadır. Yine 15 ayrı kimyasala maruziyet sonucu kadınlarda erken menapoz olgularının arttığı, bu kimyasalların ise poliklorlu bifeniller, pestisitler, dioksin / furan ve fitalatlar olduğu bildirilmektedir (Zhou ve ark., 2015). BPA maruziyeti yetişkin kadınlarda endometrit, endometriyal kanser, göğüs kanseri, tekrarlayan düşük olguları, prematür doğum ve polikistik ovaryum olgularına sebebiyet vermektedir (Rochester, 2013).

Tiroid üzerine etkileri

Tiroid hormonlarının büyüme, gelişme, enerji metabolizması ve üreme sistemi üzerine etkileri bilinmektedir. Fetus ve infant gelişimi esnasında tiroid hormonlarında meydana gelen ufak değişiklikler bile bebekte nöro-bilişsel problemlere sebebiyet vermektedir. Fitalat ve BPA maruziyeti TSH reseptörleri ile bağlanarak ve tiroid hücrelerinin iyot alımına müdahale ederek endokrin işleyişi engellemektedir. Toplam 6003 yetişkin koreli bireyin idrar fitalat ve BPA düzeylerinin tiroid hormonları üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, idrarda fitalat metabolitlerinin yüksek bulunduğu özellikle yetişkin erkek bireylerde t3 ve t4 seviyeleri düşerken, TSH düzeyleri artış göstermiştir (Park ve ark., 2017)

Gıdalarla bulaşma

Diyet yoluyla alınan BPA ve fitalatların maruziyet açısından önemli bir kaynak teşkil ettiği bildirilmektedir (Schettler, 2006). BPA'nın sıklıkla gıda ve içecek tenekelerinin iç kısımlarında kullanılan epoksi kaplamaların bileşiminde bulunduğu belirtilmektedir. Fitalatların ise sıklıkla gıda paketlemede kullanılan materyallerden gıdaya geçiş yaptığı ve tüm bunların hamilelik esnasında plasentada en yoğun düzeylere ulaşma özelliklerinin olduğu belirtilmektedir (Minatoya ve ark., 2018). Hamile kadınların BPA'ya en önemli maruz kalma kaynağı olarak konserve sebze ve konserve balık tüketimi gösterilmektedir (Braun ve ark., 2011). Kanatlı eti, kırmızı et ve balık tüketimine bağlı maruziyetin ise paketleme materyalindeki fitalat türevlerinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Serrano ve ark., 2014). Konserve gıdalar başta olmak üzere ambalaj materyali ile temas halinde bulunan tüm gıdalarda yoğun miktarda BPA bulunduğu bildirilmiştir (Larsson ve ark., 2014). Annenin kilolu olması da BPA ve fitalat düzeyleri ile ilişkilendirilmektedir (Philips ve Jaddoe, 2018). Kırsal hayat süren çocuklara göre özellikle şehir hayatı yaşayan ve bazı gıdaları (çikolata ve dondurma) yoğun bir şekilde tüketen çocuklarda fitalat maruziyetinin çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Larsson ve ark., 2014). Toplam 12 farklı gıda grubuna ait örneklerin %76'sında bir veya birden fazla fitalat esteri bulunmuş, fitalatlara maruziyete neden olan gıdaların başında sebzeleri takiben tahıllar ve kahvaltılık gevrekler sayılmıştır (Yang ve ark., 2018). Dünya sağlık örgütü (WHO), toplumların maruz kaldığı kimyasalların ülke bazında, standardize metodlarla, periyodik total diyet çalışmaları yoluyla belirlenmesini önemle tavsiye etmektedir (WHO, 2013).

Sonuç

Bu çalışma kapsamındaki en önemli vurgu; endokrin bozuculara yetişkinlik veya fetal aşama maruziyetleri arasındaki kritik farkın anlaşılmasıdır. Anne karnında organogenesis aşamasındaki maruziyetle hormonal

aktivitenin artması sonucu meydana gelen duyarlılıklar, hayatın diğer süreçlerindeki hiçbir maruziyetle karşılaştırılmayacak kadar etkili sonuçlar, ciddi sağlık sorunları doğurmaktadır. Hamilelerin gebelik sürecindeki kimyasal maruziyetler konusunda bilgilendirilmesi halk sağlığı açısından kritik önem arz etmektedir. Anne karnındaki maruziyetlerin erken gelişme ve sağlıklı yetişkinlik süreci üzerindeki etkilerini belirlemek için gebeliğin farklı dönemlerinde geniş kapsamlı çok detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. BPA'nın halen bilinmeyen birçok etki mekanizması olduğuna inanılmaktadır. BPA'nın gıda paketlenme, bebek biberonu ve diğer bazı kullanımlarının yasaklanmasıyla, her ne kadar yüksek doz maruziyeti bir ölçüde engellemiş olsa da, düşük doz maruziyetlerine ilişkin çalışmaların da planlanması da gerekmektedir. Uluslararası gıda güvenliği ve sağlık organizasyonları BPA'yı sadece "klas 2 reproduktif toksin" olarak nitelendirse de kanserojenik statüsünün yeniden değerlendirilmesine ihtiyaç duyulduğu bir gerçektir. İnsanlar günlük yaşamlarında hiçbir zaman tek bir kimyasala maruz kalmamaktadır. Bu çerçevede birden çok kimyasalın kombine etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar planlanmalıdır. Özellikle bebek bakım ve ürünlerinde yasal boşlukların ele alınarak bir an önce gerekli düzenlemelerin yapılması gerekmektedir. Kimyasallara maruziyete ilişkin en başarılı mücadeleler devlet politikaları yoluyla alınan önlemlerdir. Bu kapsamda toksisite açısından değerlendirilmemiş kimyasalların kullanımına izin verilmemeli, ulusal ve uluslararası düzeyde gerekli yasal düzenlemeler ile halk sağlığı korunmalıdır. Her yıl milyonlarca ton fitalat ve BPA üretilerek çeşitli amaçlarla günlük hayata dahil edilmektedir. Özellikle meslek icabı bu kimyasallara maruz kalan bireylerin korunması ve muhtemel sağlık riskleri konusunda eğitilmeleri gerekmektedir.

Kaynaklar

- Arbuckle TE, Davis K, Marro L, Fisher M, Legrand M, LeBlanc A, Gaudreau E, Foster WG, Choerung V, Fraser WD; MIREC Study Group. Phthalate and bisphenol A exposure among pregnant women in Canada--results from the MIREC study. *Environ Int* 2014; 68: 55-65.
- Biedermann S, Tschudin P, Grob K. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal Bioanal Chem* 2010; 398:571-6.
- Bosnir J, Puntaric D, Galic A, Skes I, Dijanic T, Klaric M, Grgic M, Curkovic M, Smit Z. Migration of phthalates from plastic containers into soft drinks and mineral water. *Food Technol Biotechnol* 2007; 45 (1): 91-5.
- Braun JM, Bellinger DC, Hauser R, Wright RO, Chen A, Calafat AM, Yolton K, Lanphear BP. Prenatal phthalate, triclosan, and bisphenol A exposures and child visual-spatial abilities. *Neurotoxicology* 2017; 58: 75-83.
- Braun JM, Kalkbrenner AE, Calafat AM, Bernert JT, Ye X, Silva MJ, Barr DB, Sathyanarayana S, Lanphear BP. Variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations during pregnancy. *Environ Health Perspect* 2011; 119(1): 131-7.
- Brede C, Fjeldal P, Skjevraak I, Herikstad H. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit Contam* 2003; 20: 684-9.
- Bu Z, Wang J, Yu W, Li B. Dermal exposure to phthalates in home environment: Handwipes, influencing factors and implications. *Building and Environment* 2018; 133: 1-7.
- Calafat AM, Longnecker MP, Koch HM, Swan SH, Hauser R, Goldman LR, Lanphear BP, Rudel RA, Engel SM, Teitelbaum SL, Whyatt RM, Wolff MS. Optimal exposure biomarkers for nonpersistent chemicals in environmental epidemiology. *Environ Health Perspect* 2015; 123(7): A166.
- CPSC (U.S. Consumer Product Safety Commission). McDonald's recalls movie themed drinking glasses due to potential cadmium risk. Release #10e257, June 4 2010a. <https://www.cpsc.gov/Recalls/2010/mcdonalds-recalls-moviethemed-drinking-glasses-due-to-potential-cadmium-risk>, Erişim tarihi: 20.7.2017.
- EFSA CEF Panel (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids), 2015. Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Executive summary. *EFSA Journal* 2015; 13(1): 3978.
- Jaakkola JJ, Knight TL. The role of exposure to phthalates from polyvinyl chloride products in the development of asthma and allergies: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect* 2008; 116(7): 845-53.
- Jalal N, Surendranathb AR, Pathaka JL, Yua S, Chung CY. Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. *Toxicology Reports* 2018; 5: 76-84.
- Larsson K, Ljung Björklund K, Palm B, Wennberg M, Kaj L, Lindh CH, Jönsson BA, Berglund M. Exposure determinants of phthalates, parabens, bisphenol A and triclosan in Swedish mothers and their children. *Environment International* 2014; 73: 323-33.
- Lee CK, Kim SH, Moon DH, Kim JH, Son BC, Kim DH, Lee CH, Kim HD, Kim JW, Kim JE, Lee CU. Effects of bisphenol A on the placental function and reproduction in rats. *J Prev Med Pub Health* 2005;

- 38: 330-6.
- Legler J, Fletcher T, Govarts E, Porta M, Blumberg B, Heindel JJ, Trasande L. Obesity, diabetes, and associated costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European Union. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100(4): 1278-88.
- Lin LY, Tsai MS, Chen MH, Ng S, Hsieh CJ, Lin CC, Lu FL, Hsieh WS, Chen PC. Childhood exposure to phthalates and pulmonary function. *Science of the Total Environment* 2018; 615: 1282-9.
- Minatoya M, Araki A, Miyashita C, Ait Bamai Y, Itoh S, Yamamoto J, Onoda Y, Ogasawara K, Matsu-mura T, Kishi R. Association between prenatal bisphenol A and phthalate exposures and fetal metabolic related biomarkers: The Hokkaido study on environment and children's health. *Environmental Research* 2018; 161: 505-11.
- Montouri P, Jover E, Morgantini M, Nayona J, Triassi M. Assessing human exposure to phthalic acid and phthalate esters from mineral water stored in polyethylene terephthalate and glass bottles. *Food Addit Contam* 2008; 25: 511-8.
- Negev M, Berman T, Reicher S, Sadeh M, Ardi R, Shammai Y. Concentrations of trace metals, phthalates, bisphenol A and flame-retardants in toys and other children's products in Israel. *Chemosphere* 2018; 192: 217-24.
- Padmanabhan V, Siefert K, Ransom S, Johnson T, Pinkerton J, Anderson L, Tao L, Kannan K. Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? *J Perinatol* 2008; 28: 258-63.
- Pant N, Pant A, Shukla M, Mathur N, Gupta Y, Sexana D. Environmental and experimental exposure of phthalate esters: The toxicological consequence on human sperm. *Hum Exp Toxicol* 2011; 30(6): 507-14.
- Park C, Choi W, Hwang M, Lee Y, Kim S, Yu S, Lee I, Paek D, Choi K. Associations between urinary phthalate metabolites and bisphenol A levels, and serum thyroid hormones among the Korean adult population - Korean National Environmental Health Survey (KoNEHS) 2012-2014. *Sci Total Environ* 2017; 584-585: 950-7.
- Philips EM, Jaddoe VWV, Asimakopoulos AG, Kannan K, Steegers EAP, Santos S, Trasande L. Bisphenol and phthalate concentrations and its determinants among pregnant women in a population-based cohort in the Netherlands, 2004-5. *Environ Res* 2018; 161: 562-72.
- Prentice P, Viner RM. Pubertal timing and adult obesity and cardiometabolic risk in women and men: a systematic review and meta-analysis. *Int J Obes* 2013; 37: 1036-43.
- Rochester JR. Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reprod Toxicol* 2013; 42: 132-55.
- Roen EL, Wang Y, Calafat AM, Wang S, Margolis A, Herbstman J, Hoepner LA, Rauh V, Perera FP. Bisphenol A exposure and behavioral problems among inner city children at 7-9 years of age. *Environ Res* 2015; 142: 739-45.
- Schettler T. Human exposure to phthalates via consumer products. *Int J Androl* 2006; 29: 134-9.
- Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 703-7.
- Serrano SE, Braun J, Trasande L, Dills R, Sathyanarayana S. Phthalates and diet: A review of the food monitoring and epidemiology data. *Environ Health* 2014; 13(1): 43.
- Shalitin S, Kiess W. Putative effects of obesity on linear growth and puberty. *Horm Res Paediatr* 2017; 88(1): 101-10.
- Téllez-Rojo MM, Cantoral A, Cantonwine DE, Schnaas L, Peterson K, Hu H, Meeker JD. Prenatal urinary phthalate metabolites levels and neurodevelopment in children at two and three years of age. *Sci Total Environ* 2013; 461-462: 386-90.
- Toner F, Allan G, Dimond SS, Waechter JM Jr, Beyer D. In vitro percutaneous absorption and metabolism of Bisphenol A (BPA) through fresh human skin. *Toxicology in Vitro* 2018; 47: 147-55.
- Vafeiadi M, Roumeliotaki T, Myridakis A, Chalkiadaki G, Fthenou E, Dermizaki E, Karachaliou M, Sarri K, Vassilaki M, Stephanou EG, Kogevinas M, Chatzi L. Association of early life exposure to bisphenol A with obesity and cardiometabolic traits in childhood. *Environ Res* 2016; 146: 379-87.
- Vernet C, Pin I, Giorgis-Allemand L, Philippat C, Benmerad M, Quentin J, Calafat AM, Ye X, Annesi-Maesano I, Siroux V, Slama R; EDEN Mother-Child Cohort Study Group. In utero exposure to select phenols and phthalates and respiratory health in five-year-old boys: A prospective study. *Environ Health Perspect* 2017; 125(9): 097006.
- Watkins DJ, Milewski S, Domino SE, Meeker JD, Padmanabhan V. Maternal phthalate exposure during early pregnancy and at delivery in relation to gestational age and size at birth: A preliminary analysis. *Reproductive Toxicol* 2016; 65: 59-66.

- Watkins DJ, Sánchez BN, Téllez-Rojo MM, Lee JM, Mercado-García A, Blank-Goldenberg C, Peterson KE, Meeker JD. Phthalate and bisphenol A exposure during in utero windows of susceptibility in relation to reproductive hormones and pubertal development in girls. *Environmental Research* 2017; 159: 143-51.
- Weschler CJ, Nazaroff WW. Dermal uptake of organic vapors commonly found in indoor air, *Environ Sci Technol* 2014; 48: 1230-37.
- Wolstenholme JT, Rissman EF, Connelly JJ. The role of bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. *Horm Behav* 2011; 59(3): 296-305.
- World Health Organization (WHO). (2013). World health organization, and united nations environment programme (UNEP). State of the Science: Endocrine disrupting chemicals-2012. <https://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/> Erişim Tarihi: 05.01.2019
- Xie MY, Ni H, Zhao DS, Wen LY, Li KS, Yang HH, Wang SS, Zhang H, Su H. Exposure to bisphenol A and the development of asthma: A systematic review of cohort studies. *Reproductive Toxicol* 2016; 65: 224-9.
- Yang X, Chen D, Lv B, Miao H, Wu Y, Zhao Y. Dietary exposure of the Chinese population to phthalate esters by a total diet study. *Food Control* 2018; 89: 314-21.
- Zaater MF, Tahboub YR, Al Sayyed AN. Determination of phthalates in Jordanian bottled water using GC-MS and HPLC-UV: Environmental study. *J Chromatogr Sci* 2014; 52: 447-52.
- Zhang XM, Lou XY, Wu LH, Huang C, Chen D, Guo Y. Urinary phthalate metabolites and environmental phenols in university students in South China. *Environ Res* 2018; 165: 32-9.
- Zhou C, Wang W, Peretz J, Flaws JA. Bisphenol A exposure inhibits germ cell nest breakdown by reducing apoptosis in cultured neonatal mouse ovaries. *Reproductive Toxicol* 2015; 57: 87-99.
- Zota AR, Calafat AM, Woodruff TJ. Temporal trends in phthalate exposures: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001–2010. *Environ Health Perspect* 2014; 122(3): 235-41.



Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) Çalışmalarında Uygun *Housekeeping* Genlerin (HKGs) Seçimi ve Validasyonu

Özgecan KORKMAZ AĞAOĞLU, Özge SİDEKLI

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Zootekni Anabilim Dalı, Burdur-TÜRKİYE

Sorumlu Yazar: Özgecan KORKMAZ AĞAOĞLU; E-posta: ozgecanagaoglu@mehmetakif.edu.tr; ORCID: 0000-0002-7414-1725

Atif yapmak için: Korkmaz Ağaoglu Ö, Sidekli Ö. Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) çalışmalarında uygun housekeeping genlerin (HKGs) seçimi ve validasyonu. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020;17(1): 76-83.

Özet: Gen ekspresyon çalışmalarında farklı deneysel veya klinik koşullar altında genlerin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması için kullanılan en yaygın teknik Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)'dur. RT-qPCR'da güvenilir sonuçlar elde etmek için verilerin *housekeeping* genler (HKG) ile normalizasyonunun yapılması gerekmektedir. Bununla birlikte; çalışma tasarımına uygun en stabil HKG'nin kullanılması, çalışma sonuçlarının güvenilirliğini artırmaktadır. Güvenilir veri elde etmek için çalışma tasarımına uygun stabil HKG'nin seçimi ve validasyonu önemli bir adımdır ki bu ekspresyon bazlı çalışmalarda bütüncü bir adım olmuştur. HKG seçimi için farklı yazılım programları geliştirilmiştir. Normalizasyon için seçilecek en stabil HKG'nin seçilmeden önce deneysel çalışmalar ile dikkatli bir şekilde değerlendirmesinin yapılması gerekmektedir. Bu derlemede; Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Deneylerinin Yayınlanması için Asgari Bilgi (MIQE), HKG'lerin genel özellikleri, RT-qPCR çalışmalarında kullanımları ile çalışma dizaynına göre en uygun ve stabil olan HKG'lerin seçimi ve validasyonu hakkında bilgiler özetlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Gen ekspresyonu, *housekeeping* gen, kantitatif RT-PCR, referans gen

Selection and Validation of Suitable *Housekeeping* Genes (HKGs) in Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) Studies

Summary: The quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) is the most common technique used to compare the expression levels of genes under different experimental or clinical conditions. Data should be normalized with *housekeeping* genes (HKGs) to obtain reliable results in RT-qPCR. Likewise, the use of the most stable and suitable HKG for the study design improves the reliability of the study results. The selection and validation of a stable HKG according to the study design to obtain reliable data is an essential and integral step in expression-based studies. The several software programs have been developed for HKG selection. The most stable HKG to be selected for normalization needs to be carefully evaluated by experimental studies before selection. In this review, summarized Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE), characteristics of HKGs, selection and validation of most suitable and stable HKGs according to study design and, usage in RT-qPCR.

Key words: Gene expression, *housekeeping* gene, quantitative RT-PCR, reference gene

Giriş

Çok hücreli organizmalara ait doku ve organlar birbirinden farklı fenotipik özelliklere sahip olmalarına rağmen benzer gen kümelerine sahiptirler. Doku ve organlarda ki bu fenotipik farklılıklar ilgili genlerin ekspresyon profillerinin dokuya spesifik olarak düzenlenmesi ile ortaya çıkmaktadır (Goldman, 2001). Doku ve organlardaki gen ekspresyonları Northern Blot, İnsitu Hibridizasyon, Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) ve Mikroarray teknolojisi gibi çeşitli analiz yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir (Goldman, 2001; Segundo-Val ve Snaz-Lozano, 2016). Kantitatif gen ekspresyon analizlerinde kullanılan bu analiz yöntemleri arasında bir gene ait hedeflenen mRNA'nın yüksek duyarlılıkta belirlenebilmesi, hedef bölge çoğaltımı ve kantitatif belirleme aşamasının tek bir cihaz ile yapılabilmesi yönünden en yaygın olarak kullanılan yöntem RT-qPCR'dır

ve gen ekspresyon analizlerinde kullanılan doğru, hızlı ve hassas bir tekniktir (Jarczak ve ark., 2014; Tilli ve ark., 2016). Bunun yanında; gen ekspresyonundaki nispi değişikliklerin eş zamanlı izlenmesini sağlayan ve mRNA ekspresyonu ile ilişkili "altın standart" olarak kabul edilen güçlü bir tekniktir (VanGuilder ve ark., 2008). Geleneksel RNA ölçüm yöntemlerine göre duyarlılığı, geniş dinamik aralığı ve yüksek verim potansiyeli gibi birçok avantajı nedeniyle, biyolojik araştırma alanlarında çeşitli gen ekspresyon profillerinin analizinde önemli yaklaşım biçimidir (Fleige ve Pfaffl, 2006; Livak ve Schmittgen, 2001). Bununla birlikte; oldukça spesifik ve hassas ölçümler yapmasına karşın, hedeflenen genlerin ekspresyon seviyelerinin analizinde başlangıç numune miktarı ile incelenen numune miktarı arasında ki değişkenlikler, RNA'nın yapısal bütünlüğünün zayıf olması ve PCR etkinliği değerlerindeki farklılıklardan kaynaklanan sorunlar ile karşılaşmaktadır. Bu tür sorunlar örneklerin farklı zaman aralıklarında ve farklı bireylerden ve/veya doku örneklerinden elde edilmesi ile artmaktadır.

tedir. Doku ve/veya organda gen ekspresyon analizlerinde karşılaşılan sorunların ortadan kaldırılması ve güvenilirliğinin artırılması için qPCR deneylerinde dikkat edilmesi gereken asgari standartları konu alan bir dizi kurallar (MIQE) ortaya konmuştur. MIQE standartları; DNA mikroarray analizi, proteomik çalışmalar, genom sekanslama, RNA interferans ve metabolik çalışmalar ile birlikte MIBBI (Minimum Information for Biological and Biomedical Investigations; Biyolojik ve Biyomedikal Araştırmalar için Minimum Bilgi) çatısı altında koordine edilen bir modeldir (Bustin ve ark., 2009). MIQE standartları gereği elde edilen gen ekspresyon ürünlerinin analizinde meydana gelebilecek sorunların en aza indirgenebilmesi için genlerin uygun referans genler ile normalizasyonunun yapılması gerektiği bildirilmiştir (De Spiengelaere ve ark., 2015). Normalizasyon; güvenilir bir qPCR analizinin temel bileşenidir ki bu işlem izolasyon, ters transkripsiyon ve amplifikasyonun verimliliğindeki değişiklikleri ortaya koymaktadır ve böylece farklı örnekler arasında mRNA konsantrasyonlarının karşılaştırılmasını sağlamaktadır. Referans genler veya bir diğer adı ile *Housekeeping* genler (HKGs); hücrelerin fonksiyonel rollerinden bağımsız olarak, bir hücrenin varlığı için gerekli olan genlerdir (Eisenberg ve Levanon, 2003). Bu nedenle; bir organizmanın tüm hücrelerinde doku tipine, gelişim evresine, hücre döngüsüne veya dış sinyallerine bakılmaksızın normal koşullar altında da eksprese olmaktadır (Sikand ve ark., 2012). HKG'ler bu avantajlı özelliklerinden dolayı çeşitli deneysel ve sayısal veri araştırmalarında yaygın olarak kullanım alanı bulmuştur (Sikand ve ark., 2012; Tilli ve ark., 2016). Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile birlikte housekeeping genlerin ekspresyon seviyelerinin; gene, hücre tipine ve deneysel koşullarına bağlı olarak değişebildiği ortaya konmuştur. Örneğin; en sık kullanılan housekeeping genlerden biri olan GAPDH'nin doku tipine (Sullivan-Gunn ve ark., 2011), metabolik sürece (Gong ve ark., 2016) veya belirli çalışma koşullarına (Mahoney ve ark., 2004) bağlı olarak stabil olmadığı ortaya konmuştur. Bu nedenle; çalışma tasarımında ilgili hücrelerde normalizasyon için kullanılacak genin stabilitesinin belirlenmesi herhangi bir hedef genin ekspresyonunun doğru analizi için bir ön koşuldur (Panina ve ark., 2018). Normalizasyon; hedeflenen genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinin referans genlere oranlanması ile ortaya konan verileri içermektedir. Referans genlerin mRNA'ları stabil bir şekilde eksprese olmalı ve oranları, numunelerde bulunan toplam mRNA miktarlarıyla pozitif bir korelasyon göstermelidir. Çalışma tasarımına veya fizyolojik duruma yanıt olarak numuneler arasında ekspresyon seviyeleri sabit olan iç kontrol genlerin (ICG'ler) veya referans genlerin (RG'ler) kullanılması, transkripsiyon verilerinin varyasyonun kontrol altına alınabilmesi için kullanılan en etkili yöntem olarak kabul edilmektedir (Kaur ve ark., 2018). Uygun HKG'lerin araştırılmakta olan her doku tipi ve qPCR veri analizinden önce

doğrulanması gerekir (Klatte ve Bauer, 2009). Gen ekspresyon verilerinin hatalı yorumlanmasının önlenmesi için, birden fazla HKG'nin kullanılması gerektiği önerilmektedir (Chervoneva ve ark., 2010; Vandesompele ve ark., 2002).

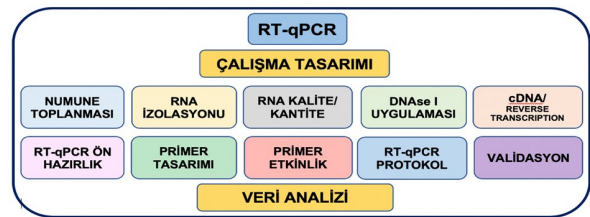
Bu derlemede; Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Deneylerinin Yayınlanması için Asgari Bilgi (MIQE), HKG'lerin genel özellikleri, RT-qPCR çalışmalarında kullanımları ile çalışma dizaynına göre en uygun ve stabil olan HKG'lerin seçimi ve validasyonu hakkında bilgiler özetlenmiştir.

Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Deneylerinin Yayınlanması için Asgari Bilgi (MIQE)

MIQE; qPCR yönteminin yeniden yapılandırılması ve deneysel ayrıntıların, veri analizlerinin ayrıntılı denetimini sağlamaktadır. qPCR analizleri ile doğru ve güvenilir sonuçların alınabilmesi için bu kuralların dikkate alınmasının gerekli olduğu bildirilmektedir (Bustin ve ark., 2010). qPCR yöntemini tanımlayan dört ana standardizasyon adımı bulunmaktadır ki bunlar; çalışmanın tasarımı, teknik detaylar, analiz yöntemleri ve istatistik analizlerden oluşmaktadır (Şekil 1).

Çalışmanın Tasarımı

qPCR çalışmalarında genellikle oldukça düşük verimli ve farklı örneklem tipinde çok çeşitli hedeflerin analizi gerçekleştirilmektedir. Ele alınması gereken ana parametreler testin analitik duyarlılığı ve özgüllüğü ile ilgilidir. Bu bağlamda testin kaç tane hedef bölgeyi algılayabileceği ve kontrollerin çalışma ile ilişkili sonuçlarda doğruluğu önceden belirlenmeli ve öngörülmelidir (Bustin ve ark., 2010).



Şekil 1. MIQE'de tanımlanan dört ana standardizasyona göre RT-qPCR yönteminin iş akışı

Teknik Detaylar

Tasarlanan çalışmada; numunelerin toplanması ve saklanması oldukça kritik bir aşamadır (Bustin ve ark., 2009). Bu aşama boyunca oldukça dikkatli davranılmalı ve numuneler soğuk zincirde taşınmalıdır.

Nükleik asit analizleri için toplanan örnekler için en sık kullanılan saklama yöntemleri arasında "dondurma" yöntemi bulunmaktadır. Ayrıca numunelerden kaliteli RNA elde etmek için RNase aktivitesi

mümkün olduğunca çabuk ölenmelidir. Bunun için sıvı azotta ani dondurma, fenol veya kontrol edilen pH ve çevre sıcaklığındaki dokuların sulu sülfat tuzu çözeltilerinde (amonyum sülfat gibi) saklanması veya taşınması önerilebilir. Sulu sülfat tuzu çözeltileri RNA-se'ların ve diğer çözülmüş proteinlerin çökmesine neden olmaktadır. Bu saklama tekniği; ticari olarak temin edilebilen RNA laters çözeltilisinin temelini oluşturmaktadır. Alınan numuneler TRIZOL içerisine konularak -80 °C'de RNA saflaştırma işlemine kadar bekletilebilir (Nolan ve Bustin., 2008). Saflaştırma işleminden sonra; RNA bir diğer işlem aşamasına kadar -80 °C'de saklanabilir (Hashemipetroudi ve ark., 2018). İkinci en kritik aşama; RNA izolasyon aşamasıdır. RNA izolasyonunun etkinliği; numunenin homojen yapıda olup olmadığı, numune tipi, yoğunluğu ve fizyolojik durumuna (örneğin, sağlıklı, kanserli veya nekrotik) bağlı olarak değişebilmektedir. İzole edilen numunelerdeki RNA miktarı önemlidir. Bu nedenle; elde edilen RNA'nın kalite ve kantite kontrolleri yapılmalıdır. RNA kalite kontrolü; RNA saflığı ve RNA bütünlüğünün analizini kapsamaktadır. RNA saflığının belirlenmesi; NanoDrop veya diğer hassas spektrofotometreler kullanılarak fotometrik olarak ölçülebilmektedir. Bu değerlendirmeye yönteminde; optik yoğunluk (OD) farklı dalga boyları ile saptanmaktadır. Bu dalga boylarından 230 nm; farklı kontaminant maddelerin maksimum absorbans değerini, 260 nm; nükleik asit kontaminasyonunun maksimum absorbans değerini, 280 nm; protein-fenol kontaminasyonunun maksimum absorbans değerini ve 320 nm ise; farklı kontaminant maddelerin maksimum absorbans değerini işaret etmektedir. OD260/280 oranı RNA saflığının belirlenmesi için tercih edilmektedir (Becker ve ark., 2010). OD260/280 oranı, RNA saflığı için gösterge olarak kullanılır. Gen ekspresyon ölçümleri için 1.8'den yüksek bir oranın uygun olduğu varsayılmaktadır (Nolan ve Bustin, 2008; Becker ve ark., 2010). Nükleik asitlerin kalite kontrolü; ribozomal RNA (rRNA) alt birimlerinin farklı fraksiyonlarını (5S, 18S, 28S) ayırmak için agaroz jel elektroforezi kullanılarak yapılmaktadır. İyi kalitedeki RNA için 28S/18S oranı 2.0 olarak kabul edilmektedir (Becker ve ark., 2010). Total RNA bütünlüğünün (RNA integrity) kontrolü için; farklı otomatize sistemler kullanılmaktadır. Bu sistemler ile RNA bütünlük değeri (RNA Integrity Number; RIN) ve RNA kalite indeksi (RNA Quality Index; RQI) değerleri belirlenmektedir (Nolan ve Bustin, 2008; Becker ve ark., 2010). Bu değerler; 1 ile 10 arasında değişmektedir. Kaliteli bir RNA eldesi için bu değerlerin en az 8 olması istenmektedir (Nolan ve Bustin, 2008). Bununla birlikte; farklı numuneleri karşılaştırırken yaklaşık olarak aynı miktarda RNA kullanılması önerilmektedir (Bustin ve ark., 2010; Huggett ve ark., 2005). Uygun sulandırma işlemlerinden sonra; olası DNA kontaminasyonu için cDNA analizinden önce DNase I ile DNA digestion işlemi uygulanmalıdır (Bustin ve ark., 2009). DNase I ile muameleden sonra, saflaştırılmış RNA numunesinin kalite kantite kontrolleri yanında, spesifik ribozomal DNA (rDNA) pri-

merleri ile test edilmeleri sonuçların güvenilirliği açısından gereklidir. Analiz sırasında DNA içermeyen RNA numunelerinde amplifikasyon sinyali tespit edilmemelidir. Buna dayanarak, qPCR'de bir amplifikasyon sinyali tespit edilirse veya agaroz jelde bir bant tespit edilirse bunun DNA kontaminasyonundan kaynaklandığı sonucuna varılabilir (Hashemipetroudi ve ark., 2018). Bu işlemlerden sonra; cDNA sentezi yapılmalı ve uygulanan protokoller ayrıntılı bir şekilde açıklanmalıdır. Ayrıca elde edilen RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesi yani ters transkripsiyon aşamasının iki veya üç kez tekrarlanması önerilmektedir (Ståhlberg ve ark., 2004). RT-qPCR için hedeflenen primer dizileri, amplikon için veritabanı erişim numaraları, herhangi bir boya ve/veya modifiye edilmiş bazların bilgileri ve konumlarının kontrol edilmesi önemlidir (Bustin ve ark., 2010). Çalışmada kullanılacak olan primer dizilerinin özgüllüğü; jel elektroforez ve erime profilleri kullanılarak doğrulanmalı, erime sıcaklıkları ve döngü sayısı (Cycle threshold; Ct) belirlenmelidir. Ayrıca çalışmada kullanılacak her bir primerin etkinlik (primer efficiency) değerleri, özgüllüğü ve duyarlılığı belirlenmelidir (Bustin ve ark., 2010b). RT-qPCR'in optimizasyonunun yanı sıra istenmeyen amplifikasyon ürünlerinin oluşumunun önlenmesi için bazı kontrol ürünleri veya kalibratörler kullanılabilir (Bustin ve ark., 2010). Kontrol ürünleri PCR'da oluşan ikincil yapıları tespit ederek, kullanılan reaksiyonda az miktardaki PCR ürünlerini saptamaktadır. Kalibratörler; sentetik RNA veya DNA oligonükleotitleri, plazmid DNA yapıları, plazmidlere klonlanmış cDNA, in vitro kopyalanan RNA, referans RNA havuzları, spesifik biyolojik numunelerden RNA veya DNA gibi saflaştırılmış hedef moleküllerden tercih edilebilir (Bustin ve ark., 2009).

qPCR analizlerinin doğruluğu ve güvenilirliği qPCR'nin etkinliği ile ilişkilidir. qPCR etkinliği; özellikle hedef genin mRNA ekspresyon seviyesinin referans gen ile karşılaştırıldığı zaman anlaşılmalıdır. Bu doğrultuda; örnekler arasındaki konsantrasyon farkının ortaya konmasında, dolayısı ile qPCR verilerinin analizinde yaygın olarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılmaktadır (Bustin ve ark., 2009; Livak ve Schmittgen, 2001). $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu; bir kalibratör yardımı ile hedef genin ve HKG'nin karşılaştırılması yapılarak oransal gen anlamı düzeylerinin aritmetik formülle hesaplanması temeline dayanmaktadır (Livak ve Schmittgen, 2001). Hedeflenen genin HKG ile normalizasyonu için reaksiyonun etkinliği (E) belirlenmeli ve genler arasındaki Ct değerlerine dayalı farklılıklar göz önünde bulundurulmalıdır. Etkinlik değerleri arasındaki fark $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile saptanmaktadır (Livak ve Schmittgen, 2001). Bununla birlikte, referans gen ile çalışılan genler arasında benzer PCR etkinliğine $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile nadiren ulaşılmaktadır, bu nedenle genler arasındaki etkinlik farkını azaltan başka bir matematiksel model geliştirilmiştir. Referans gen ile normalizasyonu sağlayan matematiksel model; $R = \frac{E_{\text{çalışılan gen}}^{\Delta Ct}}{(E_{\text{kontrol gen}})^{\Delta Ct} / (E_{\text{kontrol örnek}})^{\Delta Ct}}$ olarak bildir-

rilmiştir (Pfaffl, 2001). PCR amplifikasyon ürünlerinin etkinliği, kalibrasyon eğrisi ile göreceli olarak ortaya konmaktadır. Kalibrasyon eğrisinin $<10^1$ ile $10^{10}>$ dinamik sulandırma aralığında olması istenmektedir. Bu doğrultuda; kalibrasyon eğrisi ile ilişkili regresyon katsayısı hesaplanmaktadır (Pfaffl, 2001). Bu regresyon katsayısı; PCR'nin logaritmik artış bölümünün eğimine eşit olmakla birlikte amplifikasyon ürünlerinin etkinliği ile de ilişkilidir (Burns ve ark., 2005). Kalibrasyon eğrisinin eğimi $E=10^{(-1/\text{eğim})}$ ile hesaplanmakta ve optimal qPCR etkinliğinin $E=1.60$ ile 2.10 olması istenmektedir (Pfaffl ve ark., 2002). Ayrıca mutlak gen ekspresyon analizinde kullanılan referans gen ve primerlerin etkinliğinin belirlenmesinde bir dizi dilüsyon serilerinin oluşturulması ve değerlendirilmesi çalışma sonucunun doğruluğunu ve güvenilirliğini arttırılması yönünden önerilmektedir (Bustin ve ark., 2009).

qPCR analizinin temel bir bileşeni olan normalizasyon ile izolasyon, ters transkripsiyon ve amplifikasyon ürünlerinin etkinlik değerleri arasında değişikliklerin kontrol edilebilmesinin yanısıra farklı örnekler arasındaki mRNA konsantrasyonları da karşılaştırılabilmektedir. Bu doğrultuda normalizasyon için referans genler yani HKG'ler tercih edilmektedir (Bustin ve ark., 2009; Ståhlberg ve ark., 2004). Normalizasyon için kullanılacak olan referans genler çeşitli deneysel çalışmalar ile ilgili doku ve/veya organ için uygunluğu belirlenmelidir. Ayrıca kullanılması planlanan HKG'lerin üçten daha az olması önerilmemektedir (Huggett ve ark., 2005).

HKG'ler ve HKG'lerin Genomik Yapısı

Bütün doku ve/veya organlarda eksprese olan HKG'ler; hedeflenen gen diziliminden farklı bir genomik organizasyona sahiptir (Goldman, 2001). Ayrıca bu genler; DNA sentezi, protein sentezi ve transkripsiyon gibi hücre metabolik olaylarda da rol oynamaktadır (Farre ve ark., 2007). HKG'lerin dokuya spesifik eksprese olan genlerden farklı bir promotör bölgelerine sahip oldukları ve CpG adaları ile ilişkili oldukları bildirilmiştir (Farre ve ark., 2007; Goldman, 2001). Diğer genlerin aksine HKG'lerin promotör bölgelerinde TATA ve CAAT kutusu bulunmamaktadır, bunun yerine promotör bölgelerinde GC'ce zengin diziler içermektedirler. Promotör bölgelerinde bulunan GC dizileri, TATA kutusu gibi transkripsiyonun başlatılmasından sorumlu olmakla birlikte, Sp1 gibi GC dizilerini tanıyan transkripsiyon faktörlerin promotör bölgelerine bağlanmasını sağlamaktadır (Goldman, 2001). Ayrıca farklı genomik organizasyona sahip organizmalarda yapılan çalışmalarda referans genlerin kısa ve uzun intron ve ekzon bölgelerine, tüm genom dağılmış tekrar dizilerine, düşük korunumlu promotör bölgelerine sahip oldukları, ayrıca histon proteinlerine karşı daha az ilgi gösterdikleri saptanmıştır (Farre ve ark., 2007).

HKG'ler kantitatif analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Tilli ve ark., 2016). Yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan HKG'lerin; glisaldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), Beta aktin (β -Aktin), TATA bağlanma proteinleri (TBP), hipoksantinguanidin fosforibozil transferaz (HPRT), tubulinler, siklofilin (CyP), albümin, 18S rRNA ve 28S rRNA olduğu bildirilmektedir.

HKG'lerin ekspresyon seviyelerinin türe, doku tipine, organizmanın gelişim dönemine, hastalık ve enfeksiyon durumuna göre değiştiği ortaya konmuştur. Örneğin; GAPDH yapılan bazı çalışmalarda en stabil gen olarak bildirilmesine rağmen; bu HKG'nin eksternal ve internal faktörlerden önemli ölçüde etkilendiği gösterilmiştir. Öyle ki; Barber ve ark. (2005) insanlarda 72 farklı doku örneğinde GAPDH mRNA ekspresyon seviyesinin önemli ölçüde değiştiğini bildirmişlerdir. İncelenen doku örneklerinde; GAPDH'nin iskelet kaslarında en yüksek, meme dokusunda ise en düşük ekspresyon profiline sahip olduğu ortaya konmuştur. Morfolojik değişikliklere uğrayan doku ve farklı gelişim evrelerini içeren çalışmalarda β -aktin'lerin, HKG olarak kullanımları önerilmemektedir (Zhong ve Simons, 1999). RT-qPCR analizlerinde yaygın olarak kullanılan HKG'lerden biri olan ribozomal RNA'ların da çoğu hücre tipinde ekspresyon seviyelerinin yüksek olmasından dolayı, bazı gen ekspresyon analizlerinde HKG olarak kullanılmaları önerilmemektedir (Kozera ve Rapacz, 2013). Örneğin; hücre oksidatif stres altındayken 18S rRNA ekspresyonlarının azaldığı (Hayashi, 2014); 28S rRNA'nın ise hipoksik koşullar altında ekspresyonunun; GAPDH, β -aktin ve CyP'ye göre daha stabil olduğu ortaya konmuştur (Zhong ve Simons, 1999). Elde edilen bu verilerin normalizasyon için tek bir referans genin kullanılmasının çalışma sonuçlarının hatalı yorumlanmasına neden olacağını göstermektedir (Vandesompele ve ark., 2002). Bu nedenle; yapılacak olan çalışmada iki veya daha fazla referans genin tanımlanması ve kullanılması önerilmektedir (Bustin ve ark., 2009). Bu anlamda; evcil memeli hayvanlarda ve insan gibi çeşitli türlerin farklı dokularında en stabil HKG'lerin belirlenmesi üzerine çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Udin ve ark. (2011) yenidoğan, genç ve yetişkin domuzlardan toplanan farklı doku (servikal ve mezenterik lenf bezleri, duodenumdan bağırsak mukozası, jejunum ve ileum, mide, karaciğer, dalak, timus, akciğer, böbrek, kalp ve kulaktan alınan dokular) örneklerinde yaygın olarak kullanılan dokuz tane referans genin (B2M, BLM, GAPDH, HPRT1, PPIA, RPL4, SDHA, TBP ve YWHAZ) mRNA ekspresyon stabilitesini araştırmışlardır. Bu amaçla; geNorm, NormFinder ve BestKeeper yazılımlarını kullanmışlardır. geNorm yazılımı ile yapılan analizlerde; yenidoğan ve yetişkin domuzlarda RPL4, PPIA ve YWHAZ'ın yüksek stabilite gösterdiği, genç domuzlarda ise B2M, YWHAZ ve SDHA'nın yüksek stabilite gösterdiği belirlenmiştir. Tüm durumlarda; GAPDH'nin en az stabilite gösterdi-

ği bildirilmiştir. Cinar ve ark. (2012) lipopolisakkarit ve lipoteikoik asite karşı oluşan immün yanıtta görev alan domuz alveolar makrofajlarında gen ekspresyon çalışmaları için uygun referans genlerin değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılan B2M, BLM, GAPDH, HPRT1, PPIA, RPL4, SDHA, TBP and YWHAZ HKG'lerin stabilitesini değerlendirmek için üç farklı algoritma (geNorm, Normfinder ve BestKeeper) uygulamıştır. Tüm genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinin, stimülasyon tipinden ve stimülasyon süresinden etkilendiği belirtilmiştir. geNorm yazılımı, SDHA, B2M ve RPL4'ün, stimülasyon grubundan bağımsız olarak yüksek ekspresyon stabilitesi gösterdiğini, SDHA, YWHAZ ve RPL4'ün, stimüle edilmemiş kontrol grubunda yüksek stabilite gösterdiği belirlenmiştir. Tüm durumlarda; GAPDH'nin en az stabilite gösterdiği belirlenmiştir. NormFinder ile yapılan analizlerde SDHA'nın tüm gruplarda en stabil gen olduğunu ortaya konulmuştur. Ayrıca, geNorm yazılımı sonucu elde edilen verilerden; en kararlı üç genin (SDHA, YWHAZ ve RPL4) geometrik ortalamasının, gen ekspresyonu çalışmasının doğru normalize edilmesi için uygun kombinasyon olacağını önermişlerdir. Du ve ark. (2016) piyometralı ve sağlıklı köpek uterus doku örneklerinde GeNorm, Normfinder, BestKeeper ve RefFinder yazılım programlarını kullanarak en stabil referans geni belirlemek için yedi farklı HKG (18SrRNA, ACTB, B2M, GAPDH, HPRT, RPL13A ve YWHAZ)'nin stabilitesini değerlendirmişlerdir. Sonuçlar incelendiğinde; YWHAZ dışında diğer HKG'lerin piyometra ve sağlıklı dokulardaki ekspresyon stabilitelelerinin farklı olduğunu saptamışlardır. Agaoglu ve ark. (2017) tedavi amacıyla presynch-10+ovsynch uygulanan repeat breeder ineklerin endometriyumlarında Toll (TLR-2, TLR-4) ve Nod (NOD-1, NOD2, IPAF ve NALP3) benzeri reseptörlerin ekspresyon seviyelerinin araştırdıkları çalışmalarında; referans genin belirlenmesi amacıyla (B2-GAPDH, Beta-Aktin, HPRT1, YWHAZ, SDHA, SUZ12, TUBA1, 18S) geNorm, NormFinder ve BestKeeper algoritmalarından yararlanarak en uygun ve stabil referans geni YWHAZ olarak belirlemişlerdir. Korkmaz Agaoglu ve ark. (2017) kedilerde gebeliğin farklı dönemlerinde IGF ailesinin (IGF-1, IGF-2, IGF1R, IGF2R, IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5 ve IGFBP6) uterusdaki ekspresyon seviyelerinin nasıl bir değişim gösterdiğini araştırdıkları çalışmalarında; 8 farklı HKG (GAPDH, 18S, TUBA1, UBB, HPRT1, Beta Aktin, SDHA, YWHAZ)'i geNORM, NormFinder ve BestKeeper algoritmaları ile değerlendirmişlerdir. Çalışma tasarımına göre en uygun ve stabil referans genin GAPDH olduğunu bildirmişlerdir. Kaur ve ark. (2018) mandalarda on adet aday referans gen (GAPDH, ACTB, UXT, RPS15, RPL4, RPS9, RPS9, RPS23, HMBS, β 2M ve EEF1A1)'in böbrek, dalak, karaciğer, kalp, bağırsak, ovaryum, akciğer, kas, beyin, deri altı yağı ve testislerde stabilitesini analiz etmişlerdir. GeNorm ($UXT/RPS9 > RPL4 > RPS23 > EEF1A1 > ACTB > HMBS > GAPDH > B2M > RPS15$), Normfin-

der ($UXT > RPS23 > RPL4 > RPS9 > EEF1A1 > HMBS > ACTB > \beta 2M > GAPDH > RPS15$) ve BestKeeper ($RPS9 > RPS23/UXT > RPL4 > GAPDH > EEF1A1 > ACTB > HMBS > \beta 2M > RPS15$) programları temel alınarak yapılan çalışmada RPS23, RPS9, RPL4 ve UXT genlerinin mandalarda çeşitli doku örneklerinde transkripsiyonel verilerin normalizasyonunda kullanılabilir en stabil HKG'ler olarak tanımlanmışlardır.

HKG'lerin Seçimi

Kantitatif gen ekspresyon çalışmalarında; dokuya spesifik, ekspresyon profili değişmeyen tek bir referans genin tanımlanmasında ki zorluklardan dolayı, birden fazla referans gen kullanılarak en stabil genin belirlenmesi önerilmektedir (Bustin ve ark., 2009). Bu doğrultuda; kantitatif analizlerde kullanılacak olan bir genin güvenilir HKG olarak kabul edilebilmesi için; eksternal ve internal faktörlerden minimum düzeyde etkilenmesi, organizmanın fizyolojik durumuna ve farklı doku tipleri arasındaki ekspresyon seviyelerindeki değişkenliğin minimal seviyede olması istenmektedir. Bu nedenle; dokularda ve hücrelerde aynı biyokimyasal sinyal yollarına sahip olmayan ve farklı fenotipik fonksiyonlarda görev alan genler tercih edilmelidir. Ayrıca seçilecek HKG'lerin, hedeflenen gen ile benzer/yakın döngü sayısında (Ct) eksprese olması önerilmektedir (Chervoneva ve ark., 2010). HKG'lerin seçiminde hedeflenen genin ekspresyonunun, referans gene göre daha düşük veya daha yüksek Ct değerinde olduğunun saptanması, kantitatif analiz sonuçlarının hatalı yorumlanmasına neden olabilmektedir (Cross ve ark., 1994). Örneğin; Hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HPRT) geninin çeşitli hücre ve dokularda ekspresyon seviyesinin düşük olduğu belirlenmiştir. Bundan dolayı ekspresyon seviyesi düşük olan hedef genlerin, normalizasyonu için tercih edilmesi gerektiği önerilmiştir (Bär ve ark., 2009). Ayrıca, HKG'lerin promotör bölgelerinin düşük korunumlu olmasından dolayı çeşitli eksternal (radyasyon, çeşitli kimyasal maddeler ve mutasyon gibi) ve internal (farklı hücre ve/veya doku tipi gibi) faktörlere bağlı olarak ekspresyon seviyelerinin değiştiği ortaya konmuştur (Cross ve ark., 1994; Goldman, 2001; Zhong ve Simons, 1999). Örneğin; Blomberg ve ark. (1987) insanlarda referans gen olarak kullanmış oldukları β -aktin geninin farklı tümöral hücrelerde ekspresyonlarının değiştiğini bildirmişlerdir. Zhong ve Simons, (1999) GAPDH geninin ekspresyon seviyesinin hücrelerde hipoksi, insülin, deksame-tazon, mitojenler ve EGF dahil olmak üzere çeşitli uyarıcılara yanıt olarak değiştiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde; HKG genlerden biri olan melalotiyoninin ağır metallerin bulunduğu durumlarda ekspresyon seviyesinin arttığı saptanmıştır (Goldman, 2001). Bu nedenle; kantitatif analiz çalışmalarında kullanılması planlanan referans genlerin çalışmaya uygun seçilmesi ve değerlendirilmesi gerekmektedir. Çalışma tasarımına göre; en uygun ve stabil housekeeping

genin seçimi için çeşitli istatistiksel yaklaşım metodları bulunmaktadır. Bu yaklaşım metodları ile bir veya birden fazla referans genin optimal seçiminde; GeNorm (Vandesompele ve ark., 2002), KH Sadek (Sadek ve ark., 2012), Normfinder (Andersen ve ark., 2004), BestKeeper (Pfaffl ve ark., 2004) ve RefFinder (Xie ve ark., 2011) gibi çeşitli algoritmalar kullanılmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. Referans gen seçiminde kullanılan yazılımlar [GeNorm (Vandesompele ve ark., 2002), BestKeeper (Pfaffl ve ark., 2004), Normfinder (Andersen ve ark., 2004)] ve örnekler (Agaoglu ve ark., 2017; Korkmaz Agaoglu ve ark., 2017)

Bunlardan en yaygın olarak kullanılan metod; GeNorm isimli bilgisayar algoritmasıdır. Bu yazılım programı; HKG'yi belirli bir dokuda stabilitesine (M) göre sıralamaktadır. Yazılım programında belirlenen M değeri düşük olan genlerin daha stabil olduğu varsayılarak; seçim sırasında ekspresyon stabilitesi daha zayıf olan HKG'ler ardışık olarak ortadan kaldırılmaktadır. Geriye kalan aday HKG'lerin geometrik ortalamaları alınmakta ve hedef genin normalizasyonu için kullanılmaktadır (Vandesompele ve ark., 2002). Bir diğer metod olan KH Sadek analizi; farklı gruplar içerisinde bütün referans genlerin eşik döngü sayıları (Ct) arasındaki değişikliklerin karşılaştırılmasına dayanan bir yaklaşım metodudur (Sadek ve ark., 2012). Normfinder yazılımı ise; aday referans genleri verilen örnek numunedeki ve çalışma tasarımındaki ekspresyon stabilitesine göre sıralamaktadır (Andersen ve ark., 2004). Ayrıca; bu yazılım algoritması hem aday HKG'lerin genel ekspresyon varyasyonlarını hem de örnek setteki alt gruplardaki varyasyon için de stabili-

te analizi yapmaktadır. BestKeeper yazılım programı; temel olarak tüm referans genleri çift yönlü bir korelasyon analizine tabi tutarak, aday genlerin stabilitesini ölçmektedir. Bu ölçüm sürecünde en stabil olan HKG'lerin geometrik ortalamaları alınmakta ve sıralama işlemi yapılmaktadır (Pfaffl, 2001). Son olarak RefFinder; stabil olan genlerin ortalama geometrik oranlarını alarak HKG'leri sıralamaktadır (Xie ve ark., 2011). Referans gen seçiminde kullanılan bu programlar arasından biri veya birkaçı kullanılarak uygun ve stabil HKG'ler seçilmektedir.

Sonuç

Gen ekspresyonu analiz yöntemleri çeşitli moleküler araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Hedef genin mRNA ekspresyon analizlerinde güvenilir sonuçlar elde etmek için; RNA miktarı ve cDNA miktarının getirdiği örnekler arası başlangıç farklılıkları, deneysel hatalar gibi değişkenler karşısında ekspresyonları stabil olan HKG'ler ile normalizasyonun yapılması gerekmektedir. Bu nedenle; farklı doku ve hücre tiplerinde, hedef genlerin ekspresyon düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, önce referans olarak kullanılacak en uygun stabil HKG'nin doğru seçilmesi gereklidir. Ayrıca seçilecek HKG için daha önce yapılan pilot çalışmalardan referans alınması gen ekspresyon analizlerinde nispi doğruluğunu artıracaktır. Daha önce belirlenen ve yaygın olarak kullanılan çok sayıda HKG olmasına karşın; yapılan çalışmalar ile birlikte HKG'lerin ekspresyon seviyelerinin türe, doku tipine, organizmanın gelişim dönemine, hastalık ve enfeksiyon durumuna göre değiştiği de ortaya konmuştur. Bu nedenle; HKG'lerin çalışma tasarımına uygun olarak seçilmesi ve değerlendirilmesi gerekmektedir. Çalışmaya uygun bir veya birden fazla referans gen çeşitli istatistiksel yaklaşım metodları kullanılarak seçilmektedir. Bu yaklaşım metodları ile belirlenen HKG'ler, hedeflenen genin ekspresyon seviyesine oranlanarak normalizasyon yapılmaktadır. Bu da çalışmadan elde edilen verilerin güvenilirliğini artıracaktır. Sonuç olarak; çalışmalarda kullanılacak HKG'lerin ekspresyon seviyesi ne kadar stabil olursa, hedef genin ekspresyon seviyesinin kantitatif analizi de o kadar güvenilir olacaktır.

Kaynaklar

Agaoglu AR, Agaoglu OK, Aslan S, Kocamuftuoğlu M, Koker A, Cetin Y, Gungor O, Ozturk D, Saatçı M. The effects of presynch-ovsynch applications on endometrial Toll and Nod like receptor gene expressions in cows with repeat breeder syndrome (RBS). Turkish Society of Veterinary Gynaecology VII. National-I. International Congress, October, 15-18, 2017; Marmaris-Türkiye.

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach

- to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004; 64(15): 5245-50.
- Bär M, Bär D, Lehmann B. Selection and validation of candidate *housekeeping* genes for studies of human keratinocytes-review and recommendations. *Jidonline* 2009; 129(3): 535-7.
- Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a *housekeeping* gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissue. *Physiol Genomics* 2005; 21(3): 389-95.
- Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl MW. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods* 2010; 50(4):237-43.
- Blomberg J, Andersson M, Faldt R. Differential pattern of oncogene and beta-actin expression in leukaemic cells from AML patients. *J Haematol* 1987; 65(1): 83-6.
- Bogaert L, Van Poucke M, De Baere C, Peelman L, Gasthuys F, Martens A. Selection of a set of reliable reference genes for quantitative real-time PCR in normal equine skin and in equine sarcoids. *BMC Biotechnol* 2006; 6(24): 1-7.
- Burns MJ, Nixon GJ, Foy CA, Harris N. Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods – evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol* 2005; 5(31): 1-13.
- Bustin SA, Beaulieu JF, Huggett J, Jaggi R, Kibenge FSB, Olsvik PA, Penning LC, Toegel S. MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol Biol* 2010; 11(74): 1-5.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R,T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55(4): 611-22.
- Bustin SA. Why the need for qPCR publication guidelines?-The case for MIQE. *Methods* 2010; 50(4): 217-26.
- Chervoneva I, Li Y, Schulz S, Croker S, Wilson C, Waldman SA, Hyslop T. Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. *BMC Bioinforma* 2010; 11(253): 1-15.
- Cinar MU, Islam MA, Uddin MJ, Tholen E, Tesfaye D, Looft C, Schellander K. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in porcine alveolar macrophages in response to LPS and LTA. *BMC Res Notes* 2012; 5(107): 1-14.
- Cross NC, Lin F, Goldman JM. Appropriate controls for reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). *Br J Haematol* 1994; 87(1): 218.
- De Spiengelaere W, Dern-Wieloch J, Weigel R, Schumacher V, Schorle H, Nettersheim D, Bergmann M, Brehm R, Kliesch S, Vandekerckhove L, Fink C. Reference gene validation for RT-PCR, a note on different available software packages. *PLoS One* 2015; 10(3): e122515.
- Du M, Wang YW, Yue PY, Zhou PY, Yao W, Li X, Ding XB, Liu XF, Guo H, Ma WZ. Selection of reference genes in canine uterine tissues. *Genet Mol Res* 2016; 15(2): 1-14.
- Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet* 2003; 19(7): 362-5.
- Farre D, Bellora N, Mularoni L, Messeguer X, Alba MM. Housekeeping genes tend to Show reduced upstream sequence conservation. *Genome Bio* 2007; 8(7): R140.
- Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 2006; 27(2-3): 126-39.
- Goldman M. Housekeeping Gene. Brenner S. Miller JH. eds. In: *Encyclopedia of Genetics*. Academic Press. 2001; pp. 978.
- Gong S, Schmotzer CL, Zhou L. Evaluation of quantitative real-time PCR as a hepatitis C virus supplementary test after RIBA discontinuation. *J Clin Lab Anal* 2016; 30(5): 418-23.
- Hashemipetroudi SH, Nematzadeh G, Ahmadian G, Yamchi A, Kuhlmann M. Assesment of DNA contamination in RNA samples based on ribosomal DNA. *J Vis Exp* 2018; 131(22): e55451.
- Hayashi R. Gene expression and the impact of antioxidant supplements in the cataractous lens. Preedy VR. ed. *Handbook of Nutrition, Diet and the Eye*. London: Academic press 2014; pp. 517-24.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-Time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005; 6(4): 279-84.
- Jarczak J, Kaba J, Bagnicka E. The validation of housekeeping genes as a reference in quantitative Real Time PCR analysis: application in the milk somatic cells and frozen whole blood of goats infected with caprine arthritis encephalitis virus. *Gene* 2014; 549(2): 280-5.
- Kaur R, Sodhi M, Sharma A, Sharmi VL, Verma P,

- Swami SK, Kumari P, Mukesh M. Selection of suitable reference genes for normalization of quantitative RT-PCR expression data across twelve tissues of riverine buffaloes. *PLoS One* 2018; 13(3): E01191668.
- Klatte M, Bauer P. Accurate Real-time reverse transcription quantitative PCR. *Methods Mol Biol* 2009; 479(4): 61-77.
- Korkmaz Agaoglu O, Agaoglu AR, Ozmen O, Saatci M, Schäfer-Somi S, Aslan S. Investigation of Insulin-like Growth Factor Gene Family in Cat Uterus During Pregnancy at mRNA and Protein Level. XXth International Congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR). June 29-July 1, 2017; Vienna-Austria.
- Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genetics* 2013; 54(4): 391-406.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
- Mahoney DJ, Carey K, Fu MH, Snow R, Cameron-Smith D, Parise G, Tarnopolsky MA. Real-time RT-PCR analysis of *housekeeping* genes in human skeletal muscle following acute exercise. 2004; 18(2): 226-31.
- Nolan T, Bustin S. Procedures for Quality Control of RNA Samples for Use in Quantitative Reverse Transcription PCR. Keen JT Birch L. eds. In: Essentials of nucleic acid analysis: a robust approach. London: The royal society of Chemistry, 2008; pp. 189-207.
- Panina Y, Germond A, Masui S, Watanabe TM. Validation of common *housekeeping* genes as reference for qPCR gene expression analysis during IPS reprogramming process. *Sci Rep* 2018; 8(1): 8716.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(9): e36.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable *housekeeping* genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotech Lett* 2004; 26(6): 509-15.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): e45.
- Sadek KH, Cagampang FR, Bruce KD, Shreeve N, Macklon N, Cheong Y. Variation in stability of *housekeeping* genes in endometrium of healthy and polycystic ovarian syndrome women. *Hum Reprod* 2012; 27(1): 251-6.
- Segundo-Val IS, Sanz-Lozano CS. Introduction to the gene expression analysis. *Methods Mol Biol* 2016; 1434(3): 29-43.
- Sikand K, Singh J, Ebron JS, Shukla GC. *Housekeeping* gene selection advisory: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) and β -Actin are targets of miR-644a. *PLoS One* 2012; 7(10): e47510.
- Ståhlberg A, Hakansson J, Xian X, Semb H, Kubista M. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin Chem* 2004; 50(3): 509-15.
- Sullivan-Gunn M, Hinch E, Vaughan V, Lewandowski P. Choosing a stable *housekeeping* gene and protein is essential in generating valid gene and protein expression results. *Br J Cancer* 2011; 104(6): 1055.
- Tilli TM, Castro CS, Tuszynski JA, Carels N. A strategy to identify *housekeeping* genes suitable for analysis in breast cancer diseases. *BMC Genomics* 2016; 17(1): 639.
- Uddin M, Cinar M, Tesfaye D, Looft C, Tholen E, Schellander K. Age-related changes in relative expression stability of commonly used housekeeping genes in selected porcine tissues. *BMC Res Notes*. 2011; 4(441): 1-13.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3(7): 1-12.
- VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 2008; 44(5): 619-26.
- Xie F, Sun G, Stiller JW and Zhang B. Genome-wide functional analysis of the cotton transcriptome by creating an integrated EST database. *PLoS One* 2011; 6(11): e26980.
- Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259(3): 523-6.



**Squamous Cell Carcinoma of the Third Eyelid Membrane in an African Grey Parrot
(*Psittacus erithacus*)**

Aynur DEMİR¹, Kübra GERBAGA ÖZSEMİR¹, Özge ERDOĞAN BAMAÇ²

¹Istanbul Cerrahpaşa University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, İstanbul-TURKEY
²Istanbul Cerrahpaşa University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, İstanbul-TURKEY

Corresponding author: Aynur DEMİR; E-mail: aynurdemir_1903@hotmail.com; ORCID: 0000-0001-2345-6789

How to cite: Demir A, Gerbaga Özsemir K, Erdoğan Bamaç Ö. Squamous cell carcinoma of the third eyelid membrane in an African grey parrot (*Psittacus erithacus*). Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2020;17(1): 84-87.

Summary: Squamous cell carcinoma (SCC) of the third eyelid membrane (also known as the nictitating membrane) was diagnosed in a 34-year-old African grey parrot (*Psittacus erithacus*) that was presented to the clinics of our faculty for unilateral periorbital swelling, blepharospasm, severely bleeding of 2 months duration. A large, hard, yellow mass on the bulbar surface of the third eyelid membrane that was attached to the ventro-medial quadrant of the bulbar conjunctiva was identified under general anesthesia. Surgical removal of the mass was performed but the bird died just after the operation. The left globe with adnexal tissues and the body of bird were submitted for histopathological examination. The dimensions of the solitary mass were 0.8x1 cm and the histopathological examination revealed SCC. There was no evidence of metastasis in the globe and other organs.

Key words: African grey parrot, nictitating membrane, *Psittacus erithacus*, squamous cell carcinoma, third eyelid membrane

Bir Afrika Gri Papağanında Üçüncü Göz Kapağının Skuamöz Hücreli Karsinomu

Özet: İki aydır süren tek taraflı periorbital şişlik, blefarospazm ve şiddetli kanama şikayetiyle fakülte kliniklerine getirilen 34 yaşlı bir Afrika gri papağanında (*Psittacus erithacus*), üçüncü göz kapağının (niktitan membran olarak da bilinen) skuamöz hücreli karsinomu (SCC) teşhis edildi. Genel anestezi altında, üçüncü göz kapağı membranının bulbar yüzeyinde, göz küresinin bulbar konjunktivasının ventromedial kadranına bağlı büyük, sert, sarı bir kitle tespit edildi. Kitle cerrahi olarak eksize edildi, ancak operasyondan hemen sonra kuş öldü. Kuş ve sol göz küresi adneksal yapılarıyla birlikte histopatolojik incelemeye gönderildi. Kitle 0.8x1 cm boyutlarındaydı ve histopatolojik incelemede SCC olduğu belirlendi. Göz küresi ve vücudun diğer organlarında metastaz görülmüdü.

Anahtar kelimeler: Afrika gri papağanı, niktitan membran, *Psittacus erithacus*, skuamöz hücre karsinomu, üçüncü göz kapağı

Introduction

The nictitating membrane has a transparent structure which is presented in some animals that allows the eye to be moisturized and protection from any dust and debris (Stibbe, 1928; Maggs et al., 2013; Jochems and Phillips, 2015; Klečkowska-Nawrot et al., 2016). Unlike the upper and lower eyelids, the nictitating membrane moves across the eyeball horizontally and covers almost the entire eyeball and does not obstruct vision (Sivak et al., 1978; Jochems and Phillips, 2015; Klečkowska-Nawrot et al., 2016). Birds can actively control their nictitating membrane owing to muscle control. It begins at the inside corner of the eye closest to the beak and moves across to the outside corner (Kern et al., 1996; Bayon et al. 2007; Maggs et al., 2013). This structure also has many disorders like other organs that affect the appearance and functions. These diseases which impair the structure and functions of the eyelids are; infection, trauma, neoplasia and degeneration. Although other

diseases are common, neoplasms are very rare among these diseases. Chondrosarcoma, myoid cystoma, Marek's disease, lymphoma, hibernoma, xanthoma, squamous cell carcinoma are reported tumors of the third eyelid (Sivak et al., 1978). SCC has been reported rarely in parrots although it is common in budgerigars. Anatomic locations of SCC are tongue, pharynx, gastrointestinal system, uropygial gland, upper weak, head, eyelid, neck, wings and leg's skin. As in other species, SCC has a very invasive effect in birds but it is slow to metastasize (Diaz-Figueroa et al., 2006).

In our country, no studies have been reported indicating the occurrence of this cancer in the third eyelid of the birds. In this case report, the clinical and histopathological findings of SCC that was detected in the third eyelid of an African grey parrot is evaluated.

Case

A 34-year-old African grey parrot (*Psittacus erithacus*) of unknown sex was presented to the Surgical Department of the Veterinary Hospital of Istanbul University-Cerrahpaşa with a complaint of unilateral

periorbital swelling, and blepharospasm. The owner declared that the bird had been constantly scratching the eye and causing bleeding for 2 weeks. No diagnostic tests had been performed by the referring veterinarian. The bird had been previously treated with enrofloxacin for a week. According to the owner, initial treatment with enrofloxacin had not been effective, hemorrhage of the left eye had not resolved and periorbital swelling was observed. The bird's diet consisted of vegetables, fruits and commercial pelleted diet.

On physical examination, the weight of the bird was 410 g. There were no clinical findings of respiratory and urinary diseases. Ophthalmic examination revealed unilateral slight periorbital swelling and the third eyelid was partially prolapsed and its surface was covered by the hematoma and exudates. The anterior segment of the same eye was not seen because of the exudates that had stuck to the ocular surface. The right eye and the other physical examination findings were normal.

A blood sample was collected and submitted for a complete blood cell (CBC) count and plasma biochemical analysis. Results were unremarkable with the exception of increased activities of creatine kinase (904 U/L; reference range, 123-875 U/L) and bile acids (524 $\mu\text{mol/L}$; reference range, 6-35 $\mu\text{mol/L}$).

Initial empirical treatment consisted of topical 0.3% ofloxacin (Exocin[®], Abdi İbrahim, Turkey) three times daily, artificial tears (Tears Natural free[®], Alcon, Turkey) three times daily and 1% fusidic acid hemihidrat (Fucithalmic[®] gel, Abdi İbrahim, Turkey) two times daily. The patient received oral meloxicam 0.5 mg/ml (Metacam[®], Boehringer, 0.2 mg/kg/24h) and amoxicillin sodium-clavulanic acid (125 mg/kg/PO q12h; Amoklavin suspansiyon[®], Turkey). Following several days of treatment, no clinical improvement of ocular signs was observed. The hemorrhagic exudates were removed but the third eyelid was hiperemic and totally prolapsed, its motility was relatively impeded (Figure 1). The left eye was exophthalmic. Almost every day extensive bleeding was occurred by bird's self-trauma. It was difficult to make an inspection of ocular and internal surface of the third eyelid because of the bird's reactivity.

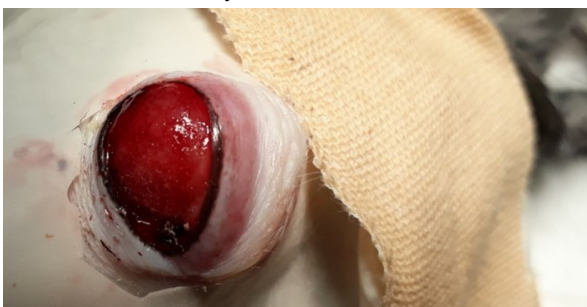


Figure 1. Hyperemic third eyelid membrane

Detailed eye examination under general anesthesia was performed for abnormal tissue biopsy and appropriate palliative treatment.

The bird was induced with 2% isoflurane administered via modified glove mask (Figure 2). On detailed eye examination under anesthesia, yellow-pink, multilobular, hard mass on the bulbar surface of the left third eyelid membrane was detected which was attached to the ventral portion of the bulbar conjunctiva of the globe. Hence, it was decided to remove the globe with the adnexa.



Figure 2. Isoflurane administered via modified glove mask

For treatment 5% dextrose lactate ringer was administered intravenously and preoperative butorphanol (Butamidol[®], Richter Pharma AG, Austria) was used subcutaneously.

The bird was placed in dorsal recumbency, the head was turned laterally to expose the left eye. Ocular surface was cleaned with a dilute solution of 0.05% betadine. Periocular surface was painted with povidone iodine solution. Except the operation area, the bird was covered with a sterile cover. To facilitate dissection, eyelids were closed with two simple separate suture before the incision. A circular skin incision was made parallel to the edge of the eyelids. Then, blunt dissection was performed between the skin and conjunctiva and the eyeball was removed by exenteration bulbi technique (Figure 3).

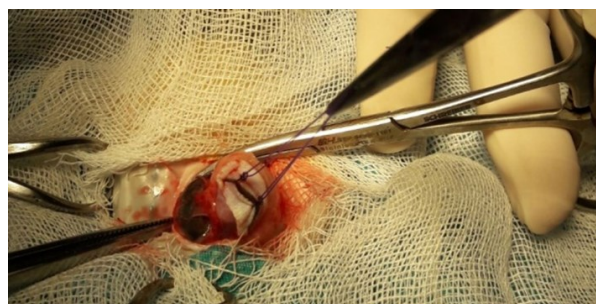


Figure 3. Removal of the eyeball with exenteration bulbi technique

In order to prevent bleeding, absorbable bleeding stopper sponge was placed into the orbita. After the bleeding control, the skin was closed with a simple

separate suture with a 3/0 monofilament polypropylene (Figure 4). After operation, the bird died. The mass with the left globe was removed by the exenteration bulbi method and submitted to Pathology Department (Figure 5).



Figure 4. After removal of the mass, eyelids were closed with simple separated suture



Figure 5. The mass adjacent to the globe

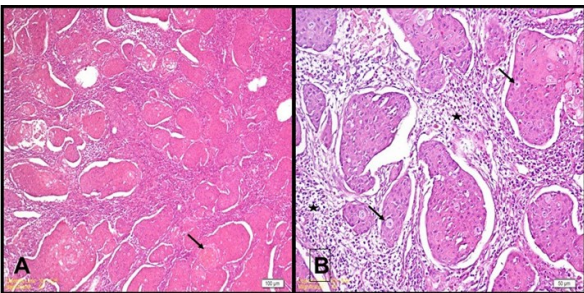


Figure 6. Various nests of malignant squamous cells. Keratin pearl in a nest (arrow) H&E (A)

Bizarre squamous cells and mitotic figures (arrows), inflammatory cells mainly composed of heterophils, lymphocytes and plasma cells (star) (B)

Tissue samples were fixed in 10% buffered formalin, routinely processed, embedded in paraffin. From paraffin block 5- μ m sections were cut and stained with haematoxylin and eosin (H&E) and examined under light microscope. Histopathological diagnosis was squamous cell carcinoma of the third eyelid membrane. The tumor was composed of various nests of malignant squamous cells (Figure 6A, B). The keratin

pearls were prominent. Bizarre squamous cells and mitotic figures were present. Inflammatory cells mainly composed of heterophil leukocytes, lymphocytes and plasma cells were observed.

Discussion and Conclusion

In all birds, the third eyelid membrane is a structure of the dorsal nasal portion of the conjunctival sac that is also composed of epithelial, muscle, connective and vascular tissue (Maggs et al., 2013; Jochems and Phillips, 2015; Klećkowska-Nawrot et al., 2016). Due to the muscular structure, it has the ability to move independently (Stibbe, 1928; Sivak et al., 1978). The internal surface of the eyelid is covered by columnar stratified epithelium while the external surface is composed of stratified squamous epithelium (Stibbe, 1928; Kern et al., 1996). The epithelium and vascular structure of the nictitating membrane engenders a predisposing cause for to the formation of malignant tumors like SCC. Malignant tumors of the third eyelid have been reported to be extremely rare in birds (Sivak et al., 1978). To the best of author's knowledge, this is the first case report of a SCC on the nictitating membrane in an African grey parrot in our country.

In human and most domestic species such as cats and dogs, SCC has been reported to be an extremely invasive but slow, metastatic, malignant, epithelial tumor of the squamous epithelium. The same is true for avian species (Diaz-Figueroa et al., 2006). Although this tumor is observed commonly in budgerigars, it has been reported rarely in Psittaciformes (Diaz-Figueroa et al., 2006; Pye et al., 2009). In birds, anatomic locations of this tumor is the globe, orbit, infra-orbital sinus, tongue, pharynx, gastrointestinal system, uropygial gland, beak skin of the head, neck, eyelids, chest, wings and legs (Diaz-Figueroa et al., 2006; Pye et al., 2009).

SCC has been reported to occur widely in the non-pigmented eyelid epithelium, bulbar conjunctiva and third eyelid in animals which was exposed to the outdoors and sunlight (Rodriguez-Ramos Fernandez and Dubielzig, 2014). However, the exact etiology of this tumor is still not fully known. In this case, histopathological examination revealed that tumor cells were originated from conjunctival epithelial cells of the third eyelid membrane. In birds, the third eyelid does not have a nictitating gland unlike cats and dogs so it can be removed when necessary but it has to be considered that it is very important for birds that look for food underwater and flying at high speed (Sivak et al. 1978; Klećkowska-Nawrot et al., 2016).

Due to its invasiveness, early diagnosis and surgery of the squamous cell carcinoma is necessary and important for prognosis. Therapeutic options that have been included cryotherapy, chemotherapy with carboplatin, radiation therapy with strontium-90 (Sr-90), radioactive implants and photodynamic therapy (Diaz-Figueroa et al., 2006; Ledwon et al. 2013).

We believe that the surgical removal of the tumor was the only option in our case although the parrot could not survive after the operation and reporting this case will contribute valuable information to the veterinary literature since SCC of the third eyelid membrane is African Grey Parrots.

References

- Bayon A, Almela RM, Talavera J. Avian ophthalmology. EJCAP 2007; 17 (3): 1-13.
- Diaz-Figueroa O, Tully Jr TN, Williams J, Evans D. Squamous cell carcinoma of the infraorbital sinus with fungal tracheitis and ingluvitis in an adult Solomon ecleetus parrot (*Ecleetus roratus solomonensis*). J Avian Med Surg 2006; 20 (2): 113-9
- Jochems B, Phillips T E. Histological and ultrastructural studies on the conjunctiva of the barred owl (*Strix varia*). PloS one 2015; 10 (11): 1-19.
- Kern TJ, Paul-Murphy J, Murphy CJ, Buyukmihci NC, Burling K, Miller PE, et al. Disorders of the third eyelid in birds: 17 cases. J Avian Med Surg 1996; 10 (1): 12-8.
- Klećkowska-Nawrot J, Nowaczyk R, Goździewska-Harłajczuk K, Barzsscs K, Kowalczyk A, Lukaszewics ET. Light and electron microscopic study of the eyelids, conjunctiva-associated lymphoid tissue and lacrimal gland in Bilgorajska Goose (*Anser anser*). Anat Sci Int 2016; 91(1) : 74-88
- Ledwon A, Dolka B, Dolka I, Szeleszczuk P. Successive therapy of squamous cell carcinoma in African grey parrot. Med Weter 2013; 69 (05) :304-7.
- Maggs DJ, Miller PE, Ofri PE. Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology. Maggs DJ. ed. In: Third Eyelid. Fifth edition. St. Louis, MO: Saunders Elsevier 2013; pp. 151-6.
- Pye GW, Carpenter JW, Goggin JM, Bacmeister C. Metastatic squamous cell carcinoma in a salmon-crested cockatoo (*Cacatua moluccensis*). J Avian Med Surg 2009; 13(3): 192-200.
- Rodriguez-Ramos Fernandez J, Dubielzig RR. Ocular and eyelid neoplasia in birds: 15 cases (1982-2011). Vet Ophthalmol 2014; 18(1): 1-6
- Sivak JG, Bobier WR, Levy B. The refractive significance of the nictitating membrane of the bird eye. J Comp Physiol 1978; 125(4): 335-9.
- Stibbe EP. A comparative study of the nictitating membrane of birds and mammals. J Anat 1928; 62 (2):159-76.

Yazım Kuralları

1. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'nde veteriner bilimlerini ilgilendiren alanlarda orijinal araştırmalar, olgu sunumları, araştırma notları, kısa bildiri, derleme ve editöre mektup yayımlanır.
2. Dergide yayımlanacak yayınlar için resmi dil Türkçe'dir. İngilizce yazılmış eserler de yayımlanabilir. **İngilizce hazırlanmış makalelerin yayımlanmasına öncelik verilir.**
3. Yayınlar A4 tipi formatta, çift aralık, Arial, 10 punto ve iki yana yaslı olarak yazılmalıdır. Her kenardan 2.5 cm boşluk bırakılarak, sayfaların sağ altına numara verilmelidir. Resimler, şekiller ve kaynaklar dâhil orijinal makaleler ve derlemeler 14, olgu sunumları, araştırma notu ve kısa bildiriler 7 sayfayı geçmemelidir.
4. Yazılar, ercvet@gmail.com adresine gönderilmelidir. Yazışmalar için, makale kapak sayfasında, sorumlu yazarın yazar adı, unvanı, ORCID numarası ve E-posta adresi yazılmalıdır.
5. Daha önce kongrelerde tebliğ edilmiş ve özeti yayımlanmış çalışmalar, bu durum kapak sayfasında belirtilmek üzere kabul edilir.
6. Araştırma herhangi bir kuruluş tarafından desteklenmiş ise kapak sayfasında dipnot olarak belirtilir.
7. Kapak sayfasında Türkçe makale başlığı (koyu ve ilk harfleri büyük), İngilizce başlık (ilk harfler büyük), kısa başlık (40 karakteri geçmemeli ve ilk kelimenin ilk harfi büyük, diğerleri küçük olarak yazılmalıdır), yazar adları (unvansız), çalıştıkları kuruma ait bilgiler (soyadı üstüne numara konulup dipnot olarak) verilmelidir.
8. Türkçe ve İngilizce özetlerin bir sonraki sayfaya yazılması gerekir. Bu sayfa, paragrafsız olarak Türkçe ve İngilizce özetleri (en fazla 250 kelime) içermelidir. Anahtar kelimeler özetlerin altına alfabetik olarak (virgülle ayrılmış şekilde) yazılmalıdır. Yalnızca ilk anahtar kelime büyük harfle başlamalıdır. **Türkçe Bilmeyen yazarlar için Türkçe özet ve anahtar kelimeler yazma zorunluluğu bulunmamaktadır.**
9. Araştırma makalesi; Kapak Sayfası - Özet (Türkçe ve İngilizce) - Anahtar kelimeler (Türkçe ve İngilizce), Giriş, Gereç ve Yöntem, Bulgular, Tartışma ve Sonuç, Teşekkür, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller, Sorumlu yazar (Correspondence Author) bölümlerini içerecek şekilde düzenlenmelidir. Metin içindeki tüm başlıklar koyu yazılmalıdır. Metin içinde paragraf girintisi yapılmamalı, devamlı satır numarası verilmelidir.
10. Derlemeler, orijinal olması, en son yenilikleri içermesi, yazarların konu ile doğrudan ilişkili **en az 3 adet** çalışmalarının olması ve bunların derleme içinde kullanılması durumunda yayımlanmak üzere kabul edilebilecektir. Derlemeler kapak sayfası, Özet (Türkçe ve İngilizce), Anahtar kelimeler (Türkçe ve İngilizce), Giriş, konunun kendine ait alt başlıkları, Sonuç, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller ve Sorumlu yazar (Correspondence) bölümlerini içerecek şekilde düzenlenmelidir.
11. Olgu Sunumları, Özet (Türkçe ve İngilizce), Anahtar kelimeler (Türkçe ve İngilizce), Giriş, Olgu(lar), Tartışma ve Sonuç, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller ve Sorumlu yazar bölümlerini içermelidir.
12. Etik kurul onayı gerektiren çalışmalarda Etik Kurul onayı alınan kurumun adı ve onay numarası, çalışmanın Gereç ve Yöntem kısmında belirtilmelidir.
13. Tablo ve şekillerin metinde geçeceği yer, altı ve üstü çizgili olarak belirtilmelidir.
14. Ondalık ifadelerde nokta kullanılmalıdır.
15. Tür isimleri ve anatomik terimler gibi Latince ifadeler *italik* karakterle yazılmalıdır. Tüm ölçü birimleri SI (*Système Internationale*)'e göre verilmelidir.
16. Tablolar kaynaklar kısmından sonra, her bir tablo ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tablo başlıklarının yalnızca ilk harfleri büyük olmalıdır. Tablo başlıkları tablonun üzerinde bulunmalı ve **Tablo 1.** şeklinde numaralandırılmalıdır. Tablolarda iç ve yan kılavuz çizgiler kullanılmamalıdır. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar tabloların altına yerleştirilmelidir.
17. Her resim, grafik ve çizim; şekil olarak kabul edilip **Şekil 1.** gibi yazılmalı, her biri ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar şekil ismi ile birlikte şeklin altına yerleştirilmelidir. Resimler 300dpi çözünürlükte olmalıdır.
18. Kaynaklar metin içinde cümle sonunda belirtilmelidir. Yazar soy isimleri ve tarihi yazı içinde her kaynağa ait yayın yılı yazar isminden hemen sonra parantez içinde belirtilmelidir. Kaynak iki isimli ise isimler belirtilmeli (örn; Kaldhone ve Nayak, 2008). Kaynakta yazar sayısı ikiden fazla ise sorumlu yazar "ve ark." şeklinde belirtilmelidir (örn, Kaldhone ve ark., 2008). Eğer kaynak cümlenin başında kullanılıyorsa yazar isimlerinden sonra parantez içinde yayın yılı belirtilmelidir.
19. Kaynaklar yazılırken alfabetik sıraya konulmalı, kaynaklar bölümünde 0.5 cm içeri doğru asılı halde yazılmalıdır. Noktalama işaretlerine örneklerde gösterildiği şekilde dikkat edilmelidir. Dergi kısaltmaları *Index Medicus* ile uyum içerisinde olmalıdır. **Orijinal araştırma makaleleri, derlemeler ve olgu sunumları sırasıyla 30, 45 ve 15'ten fazla kaynak içermemelidir.**
Kaynaklar;
19.1. Kaynak süreli yayın ise;
Örnek: Kaldhone P, Nayak R, Lynne AM, Dvaid DE, McDermott PF. Characterisation of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from Turkey-associated sources. Appl Environ Microbiol 2008; 74(16): 5038-46.
19.2. Kaynak editörlü kitaptan bir bölüm ise;
Örnek: Hornbeck P. Assay for antibody production. Colign JE, Krusibeek AM, Marguiles DH. eds. In: Current Protocols in Immunology. New York: Greene Publishing Associates, 1991; pp. 105-32.
19.3. Kaynak kitap ise;
Örnek: Fleiss JL. Statistical Methods for Rates and Proportions. Second Edition. New York: John Wiley and Sons, 1981; p.103.
19.4. Kaynak editörlü kitap ise;
Örnek: Balows A, Mousier WJ, Herramafkl KL, eds. Manual of Clinical Microbiology. Fifth Edition. Washington DC: IRL Press, 1990; p. 37.
19.5. Kaynak kongre bildirisi ise;
Örnek: Entrala E, Mascarp C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, 1994; İzmir-Türkiye.
19.6. Kaynak tez ise;
Örnek: Erdem V. Köpek göz hastalıklarında klinik oftalmoskopik ve ultrasonografik bulguların değerlendirilmesi, Doktora tezi, Ankara Üniv Sağ Bil Ens, Ankara 2003; s. 1-2.
19.7. Kaynak internette bulunan bir web sitesi ise;
Örnek: TÜİK. Hayvancılık İstatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr/hayvancilik.app/hayvancilik.zul>; Accessed Date: 14.03.2010.
20. Eserler dergide yayımlandıktan sonra, bütün sorumluluk sahiplerine aittir.
21. Yazılar gönderilirken son kontrol listesi izlenecek ve "Telif Hakkı Devir Formu" tüm yazarlarca isim sırasına göre imzalanacaktır. **Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmayan yayınlar işleme alınmayacaktır.**

Instructions to Authors

1. The Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University publishes original research articles, short communications, case reports, letter to editor and original review articles related to the field of Veterinary Medicine.
2. Formal language of manuscripts is Turkish. Manuscripts in English are also accepted. **The publication of English-language manuscripts is given priority.**
3. Publications should be in A4 format, double spacing and Arial 10 font size. With a margin of 2.5 cm from each edge, the page number should be placed at the bottom right of the pages. Original articles and reviews should not exceed 14 pages and case reports, research notes and short papers should not exceed 7 pages including illustrations, figures and references.
4. Manuscripts should be sent to ercvet@gmail.com. For correspondence, author's name, title, ORCID number, and E-mail address should be written on cover page of the manuscripts.
5. Studies were presented in a meeting and published as an abstract can be published with indication of this status at the bottom of the cover page.
6. Information should be included on any institutions financially contributed to the study as a footnote on the cover page.
7. The cover page should be supplied as a separate page and include: Turkish running title (bold and first letters capital), English title (first letters capital), short title (max 40 characters and first letters of first word is capital, others should be written as small), author(s) names (without titles), author(s) affiliations (Superscript numbers should be given to the surnames of authors as affiliation information).
8. The summaries in Turkish and English should be written on the next page. The title page must contain the Turkish and English summaries (up to 250 words) with no paragraph and not more than five Key words in Turkish and English. Key words must be placed below summary with an alphabetical order (comma delimited). Only the first Key word must start with a capital letter. **For non-Turkish authors, there is no obligation to write summary and keywords in Turkish.**
9. Original research paper must be organized as follows: Cover page, Summary (Turkish and English), Key words (Turkish and English), Introduction, Material and Methods, Results, Discussion and Conclusion, Acknowledgements, References, Tables and Figures and Correspondence. All titles in the text should be written in bold. There should be no paragraph indent in the text and continuous line number should be given.
10. Review articles are considered for publications if they are original and contain recent developments and accepted for publication if the authors have **at least 3 papers** directly related to the subject. Reviews must be organized as follows: Summary (Turkish and English), Key Words (Turkish and English), Introduction, Sub-headings of the subject, Conclusion, Acknowledgements, References, Tables and Figures and Correspondence.
11. Case reports must be organized as follows: Summary (Turkish and English), Key Words (Turkish and English), Introduction, Case(s), Discussion and Conclusion, Acknowledgements, References, Tables and Figures and Correspondence.
12. In the studies requiring the ethics approval, the name and approval number of the institution of the Ethics Committee must be specified in the Materials and Methods section of manuscript.
13. The place where the tables and figures belong in the text should be indicated as underlined and upperlined.
14. Decimal expressions should be used in the dot.
15. Species names and anatomical terms in Latin should be italicized. All measurement specifications must follow the SI (Système Internationale) units.
16. Tables must be given in a separate page after the text. First letters of first word should be capital, others should be written as small in the headings of the tables. Title of tables and figures should be numbered in order as **Table 1**. Internal and lateral lines should not be used in the tables. Descriptive information and explanations should be placed below the tables.
17. Each picture, graphic and drawing; should be given as figure and should be written as **Figure 1**. Each one should be on a separate page. Descriptive information and explanations should be placed below the figures. Pictures should be the least 300dpi resolution.
18. References should be specified in the text at the end of the sentence. Author surnames and the date of publication should be specified in parentheses. If the reference has two names, the names should be given after the publication year (eg, Kaldhone and Nayak, 2008). If the reference has more than two names should be given as "et al.," (eg, Kaldhone et al., 2008). If the source is used at the beginning of the sentence, the year of publication should be specified in parentheses after the names of the authors.
19. References should be placed in alphabetical order and hanging 0.5 cm inwards in the references section. Punctuation should be taken into consideration as shown in the examples, Journal abbreviations must be in line with *Index Medicus*. **The reference list must not contain more than 30, 45, and 15 references for original research articles, reviews and case reports, respectively.** References;
 - 19.1. If the reference is a periodical, citation must be done as shown below;
Example: Kaldhone P, Nayak R, Lynne AM, Dvaide DE, McDermott PF, Logue CM, Foley SL. Characterisation of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from turkey-associated sources. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(16): 5038-46.
 - 19.2. If the reference is from chapter of a book with an editor, citation must be done as shown below;
Example: Hornbeck P. Assay for antibody production. Colign JE, Kruisbeek AM, Margulies DH. eds. In: *Current Protocols in Immunology*. New York: Greene Publishing Associates, 1991; pp. 105-32.
 - 19.3. If the reference is a book, citation must be done as shown below;
Example: Fleiss JL. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. Second Edition. New York: John Wiley and Sons, 1981; p.103.
 - 19.4. If the reference is whole book with an editor, citation must be as below;
Example: Balows A, Mousier WJ, Herramafl KL, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth Edition. Washington DC: IRL Press, 1990; p. 37.
 - 19.5. If the reference is from meeting, citation must be done as shown below;
Example: Entrala E, Mascarp C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, 1994; Izmir-Türkiye.
 - 19.6. If the reference is from a thesis, citation must be done as shown below;
Example: Erakinci G. Investigation of Antibodies Against Parasites in Blood Donors. PhD Thesis. Ege Univ. Institute of Health Sciences. Parasitology Program, Izmir-Turkey, 1993.
 - 19.7. The reference is a website on the internet, citation must be done as shown below;
Example: TUIK. Hayvancılık İstatistikleri. <http://www.tujk.gov.tr/hayvancilik.app/hayvancilik.zul>; Accessed Date: 14.03.2010.
20. Once the studies one published in the journal, all the responsibility belongs to the authors.
21. The final checklist should be followed when submitting manuscripts and the "Copyright Release Form" must be signed by all authors in order. **Manuscripts which are not prepared in accordance with the "Instructions for authors" will not be processed.**

TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ / JOURNAL OF FACULTY OF
VETERINARY MEDICINE, ERCIYES UNIVERSITY

Makale Türü/ Article Type:

.../.../20..

(...) Araştırma / Research (...) Derleme / Review (...) Kısa Bilimsel Çalışma / Short Communication

(...) Olgu Sunumu / Case Report (...) Editöre Mektup / Letter to Editor

Makale Başlığı/Article

Entitled:.....
.....
.....

Sayın Editör,

- Yayınlanması dileğiyle Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne gönderdiğimiz makalenin yazarları olarak;
- 1- Derginizde yayımlanmak üzere yollamış olduğumuz makalenin orijinal olduğunu; bilimsel ve etik sorumluluğunun bize ait olduğunu,
 - 2- Makalenin; daha önce yayımlanmadığını, derginizdeki değerlendirme sürecinde başka bir yayın organına yayımlanmak üzere gönderilmediğini ve gönderilmeyeceğini,
 - 3- Makalenin; kişilik ve telif haklarına aykırı kanun dışı maddeler içermediğini,
 - 4- Gerekli görülen düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkını, yazının yayımlandığı günden itibaren Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne ait olduğunu kabul ve beyan ederiz.

Dear Editor,

Here we affirm and warranty as the Author(s) of this manuscript submitted to Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University that;

- 1- The manuscript /We submitted to the Bulletin is original and responsibilities belong to us ethically and scientifically,
- 2- The manuscript has not been previously published, being considered for publication by any other journal and will not be submitted to any other journal for such review while under evaluation by this bulletin,
- 3- The manuscript contains no unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal or proprietary rights.
- 4- The Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University reserves all rights with due corrections from the date it has been published onwards.

Yazar/ Yazarların Adı

Author's/Authors' Printed Name

1).....İmza/Signature:.....

2).....İmza/Signature:.....

3).....İmza/Signature:.....

4).....İmza/Signature:.....

5).....İmza/Signature:.....

Not/Note: Formu aşağıdaki adrese,e-mail ya da posta yolu ile gönderiniz veya elden teslim ediniz./ Please send this form to the address below by e-mail, post or deliver personally.

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi / Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi Editörlüğü, 38039, Melikgazi-KAYSERİ / TÜRKİYE
Tel/Phone: 0352 339 94 84 Faks/Fax: 0352 337 27 40 e-posta/e-mail: ercvet@gmail.com

SON KONTROL LİSTESİ

Makalenizi göndermeden önce lütfen bu bölümdeki maddelerle karşılaştırma yapınız ve eksiklikleri gideriniz.

- Eksiksiz doldurulmuş ve bütün yazarlarca imzalanmış **“Telif Hakkı Devri Formu”** (<http://ercvet.gmail.com> adresinden ulaşabilirsiniz) makale ile birlikte gönderildi.
- Metnin tamamı çift aralıklı (5 mm) yazıldı (özetler, tablolar, şekil alt yazıları, kaynaklar v.d. dahil).
- Her bir kenarda 2,5 cm boşluk bırakıldı.
- Yazılar 10 punto (Arial) ile yazıldı.
- Satır numaraları verildi.
- Kapak sayfasında, makalenin başlığı (sadece yazım dilindeki) koyu (bold) yazıldı, kısa başlık eklendi.
- Kapak sayfasında, yazar isimleri açık olarak yazıldı (kısaltma yok).
- Kapak sayfasına dipnot (varsa) eklendi.
- Türkçe başlık yazıldı.
- Türkçe özet yazıldı.
- Türkçe anahtar kelimeler (alfabetik sıralı ve ilk kelimenin ilk harfi büyük diğerleri küçük harfle yazıldı) verildi.
- İngilizce başlık yazıldı.
- İngilizce özet yazıldı.
- İngilizce anahtar kelimeler verildi.
- Şekillerin orijinal halleri eklendi.
- Metin içinde şekiller ardışık numaralandı.
- Şekil boyutları min.=8x20; max.=16x20 cm.
- Metin içinde tablolar ardışık numaralandı.
- Tablo boyutları min.=8x20 cm; max.=16x20 cm.
- Şekil ve tabloların metin içinde gelmesi istenilen yer belirtildi.
- Şekiller listesi ayrı bir sayfa olarak hazırlandı.
- Her şekil ayrı sayfaya yerleştirildi.
- Tablolar listesi ayrı bir sayfa olarak hazırlandı.
- Her tablo ayrı sayfaya yerleştirildi.
- Kaynaklar yazım kurallarına uygun yazıldı.
- Yazışma adresi verildi.

FINAL CHECKLIST

Before you submit your work, please take the time to be certain that your paper (and other writings as applicable) is in the correct format and that you have included everything necessary by checking it against this checklist.

- Copyright Release Form has been enclosed, completed and signed by all authors (<http://ercvet.gmail.com>).
- Entire paper has been 5 mm double-spaced (abstract, tables, captions/legends, references).
- Margins have been 2,5 cm each side.
- Font size has been 10 pt (Arial).
- Lines have been numbered.
- Title of the manuscript has been written bold and short title added on the cover page.
- Author(s) names have been fully written (not abbreviated) on the cover page.
- Footnote has been given on the cover page (if necessary)
- English title has been given.
- English summary has been given.
- English keywords have been given alphabetically.
- Turkish title has been given.
- Turkish summary has been given.
- Turkish keywords have been given alphabetically.
- Original figures have been enclosed.
- Original figures have been prepared correctly according to instructions.
- Figures have been referred to consecutively in the paper.
- Dimensions of figures have been min =8x20 cm; max.=16x20 cm.
- Tables have been referred to consecutively in the paper.
- Dimensions of tables have been min =8x20 cm; max.=16x20 cm.
- Figures and tables have been stated requiring put on the manuscript.
- Names of figures have been given on a separate page as figure list.
- Each figure has been given on a separate page.
- Names of tables have been given in a separate page as table list.
- Each table has been given on a separate page.
- References has been typed according to instructions.
- Corresponding address has been given.