

ISSN 1016-3573



**VETERİNER KONTROL MERKEZ
ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ**
Etlik - ANKARA



ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ

JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY
ANKARA – TURKEY

Cilt/Volume 24 ♦ Sayı/Number 2 ♦ 2013

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi

Cilt/Volume 24 ♦ Sayı/Number 2 ♦ 2013

Journal of Etlik Veterinary Microbiology

Yılda iki kez yayımlanır / Published two times per year

ISSN 1016-3573

Sahibi

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Adına

Dr. Özhan Türkyılmaz

Enstitü Müdürü

Editörler Kurulu / Editorial Board

Baş Editör / *Editor-in Chief*

Dr. Özhan Türkyılmaz

Editör Yardımcıları / *Co-Editors*

Doç.Dr. Armağan Erdem Ütük

Dr. Erhan Akçay

Dr. Asiye Dakman

Dr. Elçin Günaydın

Dr. A. Burak Güngör

Dr. F. İpek Keskin

Tahsin Onur Kevenk

Adres / Address

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü

06020 Etlik – Ankara / TÜRKİYE

Tel : +90 312 326 00 90 (10 hat)

Faks : +90 312 321 17 55

URL : <http://www.etlikvet.gov.tr/tr/page.asp?id=54>

E-posta : ehh.o@merkezzvet.gov.tr

Hakem Listesi / Referees List*

Doç.Dr. Kürşat Altay	Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı
Doç.Dr. Gülcan Erbil Avcı	Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı
Doç.Dr. İbrahim Balkaya	Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı
Doç.Dr. Alper Çiftci	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doç.Dr. Özlem Derinbay Ekici	Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı
Prof.Dr. Bahri Patır	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı
Prof.Dr. Belgin Sarımehtemtoğlu	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı
Prof.Dr. Bayram Şenlik	Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı
Doç.Dr. Osman Yaşar Tel	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doç.Dr. Leyla Vatanserver	Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı
Doç.Dr. Yeliz Yıldırım	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı
Yrd.Doç.Dr. Oktay Yılmaz	Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı

** İsimler soyada göre alfabetik dizilmiştir ve bu sayıda görev alanlar yazılmıştır.*

ULAKBİM Yaşam Bilimleri ve Türkiye Atıf Dizini veritabanları kapsamında bulunan “çift hakemli” bir dergidir.

Copyright © Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2013, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

Basım Tarihi / Publishing Date: Aralık / December 2013, Baskı adedi / Circulation: 500

Tasarım ve Baskı / Printing



Medisan Yayınevi Ltd.Şti.

Çankırı Cad. 45 / 347 Ulus - Ankara, Türkiye

Tel : +90 312 311 24 26 – 311 00 57 medisan yayinevi@gmail.com

İçindekiler / Contents

Araştırma Makalesi / Research Article

Sayfa

Laboratuvar fare, sıçan ve kobaylarında dışkı bakışı ile helmintlerin araştırılması Investigation of helminths in laboratory mice, rat and guinea pigs by stool examination Yunus Emre Beyhan, Ayşegül Taylan Özkan, Tayfun İde	33
Investigation of blood and milk lactoferrin concentrations in lactating ewes with subclinical mastitis Laktasyon periyodundaki subklinik mastitisli koyunlarda kan ve süt laktoferrin konsantrasyonlarının araştırılması Cevat Nisbet, Gül Fatma Yarım, Gülay Çiftci, Nilgün Gültiken, Sena Çenesiz.....	37
Real-Time PCR tekniği ile çeşitli et ürünlerinde tavuk ve sığır eti oranlarının kantitatif tayini* Quantitative detection of chicken and beef meat from meat products by Real-Time PCR Yıldız Ayaz, Naim Deniz Ayaz, Mihriban Aksoy, Yusuf Ziya Kaplan	41
Konya yöresindeki sığırlarda <i>Neospora caninum</i>'un yaygınlığının serolojik olarak araştırılması* Seroprevalance of <i>Neospora caninum</i> in cattle investigation in Konya Hasan Aytekin, Kadir Kamburgil, Erol Handemir, Funda Altınöz	49
Samsun ve çevresinde atık su ve kanalizasyon çıkışlarında yetişen midyelerde Hepatitis A virüsü prevalansı The prevalence of Hepatitis A virus in mussels rearing live in outfalls of wastewater and sewers in Samsun province Gökhan İnat, Ahmet Koluman	54
Wistar ırkı ratlardan izole edilen <i>Escherichia coli</i>'lerin filogenetik analizi Phylogeny of <i>Escherichia coli</i> isolated from Wistar rats H. Kaan Müştak, Ebru Torun, İnci Başak Kaya, Elif Ergüven Kaya, Şeyda Diker, Elvan Anadol, Elçin Günaydın.....	60

Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayım Koşulları

1. Dergi, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Etlık Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün hakemli, bilimsel yayın organı olup, yılda iki defa yayımlanır. Derginin kısaltılmış adı "Etlık Vet Mikrobiyol Derg" dir.

2. Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'nde veteriner hekimlik alanında yapılan, başka bir yerde yayımlanmamış olan orijinal bilimsel araştırmalar, güncel derleme, gözlem, kısa bilimsel çalışmalar ve enstitüden haberler bırakılarak, A4 formundaki beyaz kağıda orijinal olması, en son yenilikleri içermesi, klasik bilgilerin tekrarı olmaması durumunda kabul edilir. Derlemeyi hazırlayan yazarın, o konuda ulusal ya da uluslararası düzeyde orijinal yayın ve araştırmalar yapmış olması koşulu aranır.

3. Türkçe ve İngilizce olarak hazırlanacak metinler 12 punto Times New Roman yazı karakterinde, düz metin olarak, çift aralıklı ve kenarlarda 30 mm boşluk bırakılarak, A4 formundaki beyaz kağıda yazılmalıdır. Yazıların tamamı, şekil ve tablolar dahil olmak üzere orijinal bilimsel araştırmalarda 16, derlemelerde 10, gözlemlerde 6 ve kısa bilimsel çalışmalarda 4 sayfayı geçmemelidir.

4. Microsoft Word formatındaki metin ile en az 300 dpi çözünürlükteki JPEG formatındaki resim/lerin tamamı etikvetmikrobiyologdergi@gmail.com e-posta adresine gönderilmelidir.

5. Türkçe orijinal çalışmalar konu başlığı, yazar/yazarların adları, adresleri, Türkçe özet ve anahtar sözcükler, İngilizce başlık, İngilizce özet ve anahtar sözcükler, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç, teşekkür ve kaynaklar sırası ile hazırlanmalıdır. İngilizce orijinal çalışmalar konu başlığı, yazar/yazarların adları, adresleri, İngilizce özet ve anahtar sözcükler, Türkçe başlık, Türkçe özet ve anahtar sözcükler, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç, teşekkür ve kaynaklar şeklinde hazırlanmalıdır. Kısa bilimsel çalışmaların ve derlemelerin başlık ve özet bölümleri orijinal çalışma formatında, bundan sonraki bölümleri ise, derlemelerde; giriş, metin ve kaynaklar şeklinde, kısa bilimsel çalışmalarda ise bölümlendirme yapılmadan hazırlanmalıdır.

6. Orijinal çalışmalar ve gözlemler aşağıdaki sıraya göre düzenlenerek yazılmalıdır.

Başlık, kısa, konu hakkında bilgi verici olmalı ve küçük harflerle yazılmalıdır.

Yazar(lar)ın, ad(lar)ı küçük, soyad(lar)ı büyük harflerle yazılmalı ve unvan belirtilmemelidir.

Özet, Türkçe ve İngilizce olarak, tek paragraf halinde ve en fazla 500 sözcük olmalıdır.

Anahtar kelimeler, alfabetik sıraya göre yazılmalı ve 5 sözcüğü geçmemelidir.

Giriş, konu ile ilgili kısa literatür bilgisi içermeli, son paragrafında çalışmanın amacı vurgulanmalı ve iki sayfayı geçmemelidir.

Materyal ve Metot, ayrıntıya girmeden, anlaşılır biçimde yazılmalıdır. Başlıklar kalın, alt başlıklar italik yazı tipiyle belirtilmelidir.

Bulgular bölümünde veriler, tekrarlama yapmadan açık bir şekilde belirtilmelidir. Tablo başlıkları tablonun üstünde, şekil başlıkları ise şeklin altında belirtilmelidir.

Tartışma ve Sonuç bölümünde, araştırmanın sonucunda elde edilen bulgular, diğer araştırmacıların bulguları ile karşılaştırılmalı ve literatüre olan katkısı kısaca belirtilmelidir.

Teşekkür bölümü, gerekli görülüyorsa kaynaklardan hemen önce belirtilmelidir.

Kaynaklar bölümünde, kaynaklar listesi alfabetik ve kronolojik olarak sıralanmalı ve numaralanmalıdır. Metin içerisindeki kaynak, yazar soyadı yazılıp sıra numarası ile; cümle sonunda ise sadece sıra numarası ile parantez içerisinde yazılmalıdır. Cümle sonunda birden çok kaynak belirtilecek ise kaynak numaraları küçükten büyüğe doğru sıralanmalıdır. Metin içerisinde ikiden çok yazarlı kay-

nak kullanımlarında ilk yazarın soyadı yazılmalı diğer yazarlar ise "ve ark." (İngilizce metinlerde "et al.") kısaltması ile belirtilmelidir. Dergi adlarının kısaltılmasında "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation" son baskısı esas alınmalıdır. Kaynaklar listesinde yazar(lar)ın aynı yıla ait birden fazla yayını varsa, yayın tarihinin yanına "a" ve "b" şeklinde belirtilmelidir.

Kaynak yazımı ve sıralaması aşağıdaki gibi yapılmalıdır; Süreli Yayın:

Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, Davis SW, Shen SK, (1992). *Induced transplacental transmission of N. caninum in cattle*. J Am Vet Med Ass. 201, 709-713.

Yazarlı Kitap:

Fleiss JI, (1981). *Statistical methods for rates and proportions*. Second edition. New York: John Wiley and Sons, p.103.

Editörlü Kitap:

Balows A, Hausler WJ, Herrmann KI, eds., (1990). *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth edition. Washington DC: IRL Press, p.37.

Editörlü Kitapta Bölüm:

Bak J, Marth EH, (1990). *Listeriosis and Listeria monocytogenes*. Cliver DD. eds. Foodborne Disease. Academic press Inc, San Diego. p.248-256.

Kongre Bildirileri:

Çetindağ M, (1994). *Pronoprymna ventricosa, a new digenetic trematode from the Alosa fallax in Turkey*. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October, 10-14, İzmir-Turkey.

Tezler:

Aksoy E, (1997). *Sığır Vebası hastalığının histolojik ve immüno-peroksidad yöntemle tanısı üzerine çalışmalar*. Doktora Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Anonim:

Anonim, (2009). *Contagious equine metritis*. Erişim adresi: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdf>, **Erişim tarihi: 17.10.2009**.

Peter AT (2009). *Abortions in dairy cows*. **Erişim adresi:** <http://www.wcds.afns.ualberta.ca.htm>, **Erişim tarihi: 14.11.2009**.

Yazışma adresi, çok yazarlı çalışmalarda yazışma adresi olarak yazarlardan sadece birinin adı/soyadı, adresi ve e-posta adresi çalışmanın sonunda belirtilmelidir.

7. Latince cins ve tür isimleri italik yazı tipi ile yazılmalıdır. Tüm ölçüler SI (Système Internationale)'ye göre verilmelidir.

8. Dergide yayımlanmak üzere gönderilen makaleler tüm yazarlar tarafından imzalanan "Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi" ve başvuru ilişkin bir dilekçe ile birlikte gönderilmelidir. Yayımlanması uygun görülen çalışmalar, istendiğinde Yayın Komitesi'nin basıma ilişkin kararı, yazar(lar)ına bildirilir.

9. Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'nde yayımlanacak olan, hayvan deneylerine dayalı bilimsel çalışmalarda "Etik Kurul Onayı Alınmıştır" ifadesi aranır.

10. Gönderilen yazıların basım düzeltmeleri orijinal metne göre yapıldığından, yazıların her türlü sorumluluğu yazarlara aittir.

11. Ürünlerin ticari adları ile karşılaştırılmalarına yönelik araştırmalar derginin ilgi kapsamı dışındadır.

12. Araştırmaya konu olan maddelerin ve ürünlerin ticari adları kullanılmamalıdır.

13. Şayet varsa araştırmacının desteklendiği kurum adı ve proje numarası belirtilmelidir.

14. Dergiye gönderilen yazılar geliş tarihine göre yayımlanır.

15. Yayımlanmayan yazılar, yazarına iade edilmez.

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Publication Conditions

1. The Journal is a refereed, scientific publication of Republic of Turkey Ministry of Food, Agriculture and Livestock, Directorate of Etlik Veterinary Control Central Research Institute and is published two issues in a year. The abbreviation of the journal is "J Etlik Vet Microbiol".

2. In the Journal of Etlik Veterinary Microbiology, original research articles, actual reviews, case reports, short communications on the issue of veterinary medicine whose one part or whole have not been published in any other place before, and news from the institute are published. The review articles will be accepted only if they are original, actual and not repeating the classical knowledge. The author of the review is asked to possess original publications or researches on the subject at national or international levels.

3. Manuscripts that will be prepared in Turkish and English should be typed as a full text, on A4 paper with 12 pt, in Times New Roman typing character, double-spaced and with 30 mm space in both sides of the paper. Manuscripts including figures and tables should not exceed 16 pages for original research articles, 10 pages for reviews, 6 pages for case reports and 4 pages for short communications.

4. Manuscript written in Microsoft Word format and figures in JPEG format at minimum 300 dpi resolution should be submitted to etikvetmikrobiyolderg@gmail.com

5. Original research articles and case reports should include in following rank: title, name(s) of the author(s), their addresses, abstract and key words in English, title, abstract and key words in Turkish, introduction, material and method, findings, discussion and conclusion, acknowledgements and references. In short communications and reviews, divisions except summaries should be omitted.

6. Original research articles and case reports should be arranged and composed as in the following.

Title should be brief, explanatory and written in small caps. Explanation(s) about the study should be written as footnotes.

Author(s) should be mentioned by their names and surnames; their surnames should be written in capital letters and author(s) title should not be mentioned.

Summary should be in Turkish and English, single paragraph and composed of at most about 500 words.

Key words should be written in alphabetical order and should not exceed 5 words.

Introduction not exceeding two pages should include a short review of the literature related with the subject and in the end paragraph; the aim of the study should be mentioned.

Material and Method should be written in an essential and comprehensible manner without getting into details. Subtopics should be mentioned first in bold and after in italic type.

Findings should be shortly explained and data should not be repeated within the text. Legends should be indicated at the top of each table, whereas should be indicated at the bottom of each figure and print. Vertical lines are not allowed in tables.

Discussion and Conclusion must include the evaluation and comparison of results with other researchers' findings. The study's contributions to the existing literature should also be explained briefly.

Acknowledgements must be indicated before references if necessary.

References should be listed alphabetically and chronologically by numbers. In the body of text, reference must be shown by author's surname and list number or only by list number within parenthesis. If there is more than one reference that refers to the same issue, these should be arranged by smallest to biggest reference list numbers at the end of sentence. If the reference is more than two

authors, the surname of the first author should be written and other authors should be mentioned with the abbreviation of "et al.". For the abbreviation of journals, the latest edition of the "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation" should be taken as basis. If the author(s) have more than one publication within the same year, besides the publication date, it should be mentioned as "a" and "b" in the list of references.

The writing of the references and their alignment should be as in the following examples.

For articles:

Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, Davis SW, Shen SK, (1992). *Induced transplacental transmission of N. caninum in cattle.* J Am Vet Med Ass. 201, 709-713.

For books:

Fleiss JI, (1981). *Statistical methods for rates and proportions.* Second edition. New York: John Wiley and Sons, p.103.

For edited books:

Balows A, Hausler WJ, Herrmann KI, eds., (1990). *Manual of Clinical Microbiology.* Fifth edition. Washington DC: IRL Press, p.37.

For chapter in edited books:

Bahk J, Marth EH, (1990). *Listeriosis and Listeria monocytogenes.* Cliver DD. eds. Foodborne Disease. Academic press Inc, San Diego. p.248-256.

For congress papers:

Çetindağ M, (1994). *Pronoprymna ventricosa, a new digenic trematoda from the Alosa fallax in Turkey.* Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October, 10-14, İzmir-Turkey.

For dissertations:

Aksoy E, (1997). *Siğir Vebası hastalığının histolojik ve İmmunoperoksidaz yöntemle tanısı üzerine çalışmalar.* PhD Thesis, Ankara University Institute of Health Sciences, Ankara.

Corresponding address, in multiple-author studies, as a correspondence address, only one of the authors' name/surname, address and e-mail should be mentioned at the end.

7. Genus and species names in Latin should be written in italic. All measures should be given according to the SI (Système Internationale) units.

8. The articles that are sent to be published in the journal should be sent with a covering letter and "Publication Rights Transfer Agreement" signed by all of the authors. The selected articles for the publication, and if asked for, the decision of the editorial committee concerning the publication, are declared to the article's author/authors.

9. The wording of "Ethical Commission Permission is obtained" should appear in scientific studies based on animal experiments, which will be published in the Journal of Etlik Veterinary Microbiology.

10. As the edition of the sent articles are done in accordance with the original text, all responsibility of the articles bear on the authors.

11. Researches that aim at comparisons of the products with their commercial names are out of the journal's theme scope.

12. The trademarks of materials and products that are subject of the research should not be mentioned.

13. If the research is supported by a foundation, name of the foundation and project number must be mentioned.

14. The articles that are sent to the journal are published in line with their coming date.

15. Unpublished papers are not returned to their author.

Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi**Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi - Ankara**

Aşağıda başlığı bulunan ve yazarları belirtilen makalenin tüm sorumluluğu Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayın Komisyonu Başkanlığı'na ulaşıncaya kadar yazar/larına aittir.

Yayının adı:

Yazar/ların ad/ları:

Aşağıda isim ve imzaları bulunan yazarlar; yayınlamak üzere gönderdikleri makalenin orijinal olduğunu, daha önce başka bir dergiye yayınlanmak üzere gönderilmediğini ve kısmen ya da tamamen yayınlanmadığını, gerekli düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkının, yazının yayımlanmasından sonra Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'ne devrettiklerini kabul ederler. Yayımlanmak üzere gönderilen bu makalenin tüm sorumluluğunu da yazar/lar üstlenmektedir.

Yukarıdaki makalenin tüm hakları Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'ne devredilmiştir.

Yazar ad/ları	İmza	Tarih
.....
.....
.....
.....
.....

Yazışma Adresi:

Copyright Release**Journal of Etlik Veterinary Microbiology Ankara - TURKEY**

The undersigned authors release Journal of Etlik Veterinary Microbiology from all responsibility concerning the manuscript entitled;

Title of paper:

Authors names:

Upon its submission to the publishing commission of the Journal of Etlik Veterinary Microbiology.

The undersigned author/s warrant that the article is original, is not under consideration by another journal, has not been previously published or that if has been published in whole or in part, any permission necessary to publish it in the above mentioned journal has been obtained and provided to the Journal of Etlik Veterinary Microbiology. We sign for and accept responsibility for releasing this material.

Copyright to the above article is hereby transferred to the Journal of Etlik Veterinary Microbiology, effective upon acceptance for publication.

To be signed by all author/s

Authors names	Signature	Date
.....
.....
.....
.....

Correspondence Address:

Laboratuvar fare, sıçan ve kobaylarında dışkı bakısı ile helmintlerin araştırılması

Yunus Emre BEYHAN¹, Ayşegül Taylan ÖZKAN², Tayfun İDE³

¹ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Ulusal Parazitoloji Referans Merkez Laboratuvarı, Ankara

² Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çorum

³ Gülhane Askeri Tıp Akademisi Araştırma Geliştirme Merkezi Başkanlığı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 24.06.2013, Kabul Tarihi / Accepted: 28.11.2013

Özet: Laboratuvar fare, sıçan ve kobaylarında helmint enfeksiyonlarının yaygınlığını tespit etmek amacıyla dışkı örnekleri yüzdürme yöntemiyle incelenmiştir. Çalışma 536 Sprag-Dawley, 265 Wistar Albino, 48 Long-Evans olmak üzere toplam 849 sıçan (*Rattus norvegicus*), 283 Balb/c fare (*Mus musculus*) ve 74 kobay (*Cavia porcellus*) üzerinde yürütülmüştür. Sıçan kafeslerinin %87,10'u ve fare kafeslerin %100'ü enfekte bulunurken kobaylarda herhangi bir parazite rastlanmamıştır. Sıçanlarda *Aspiculuris tetraptera*, *Syphacia muris*, *Hymenolepis nana* ve *Trichosomoides crassicauda*, farelerde de *A.tetraptera*, *Syphacia obvelata* ve *H.nana* bulunmuştur. Erkek sıçan kafeslerinde genel enfeksiyon oranı %79,41 (54/68) bulunurken dişi kafeslerinde %93,10 (81/87) olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma Türkiye'de Long-Evans sıçanlarda yapılan ilk parazitolojik araştırmadır.

Anahtar kelimeler: *Aspiculuris*, *Hymenolepis*, Laboratuvar hayvanları, *Syphacia*, *Trichosomoides*.

Investigation of helminths in laboratory mice, rat and guinea pigs by stool examination

Summary: Stool samples were examined by flotation method for determining the prevalence of helminth infections in laboratory mice, rats and guinea pigs. Study was carried out on 536 Sprag-Dawley, 265 Wistar Albino, 48 Long-Evans a total of 849 rats (*Rattus norvegicus*), 283 Balb/c mice (*Mus musculus*) and 74 guinea pigs (*Cavia porcellus*). While 87.10 % of rat cages and 100% of mice cages were found infected, any parasites weren't observed in guinea pigs. *Aspiculuris tetraptera*, *Syphacia muris*, *Hymenolepis nana* and *Trichosomoides crassicauda* were found in rats, *A.tetraptera*, *Syphacia obvelata* and *H.nana* in mice as well. The infection rate was 79.95% (295/369) in male rats and 92.92% in females (446/480). This study is the first parasitological research, which is done in Long-Evans rats in Turkey.

Key words: *Aspiculuris*, *Hymenolepis*, Laboratory animals, *Syphacia*, *Trichosomoides*.

Giriş

Tıp, veteriner ve biyoloji alanlarında yapılan bilimsel araştırmalarda çoğunlukla fare, sıçan, kobay ve tavşan gibi laboratuvar hayvanları kullanılmaktadır. Yapılan çalışma sonuçlarının güvenilirliği, bu hayvanların bakım, beslenme ve yaşam koşullarıyla olduğu kadar sağlık durumlarıyla da yakından ilişkilidir [12].

Parazitler enfekte hayvanların immünolojik ve fizyolojik durumu değişebilmekte, ayrıca bazı parazitler zoonoz karakter gösterdiklerinden araştırmacı ve hayvan bakıcıları için risk oluşturmaktadır [7,9,14]. Yaygın görülen bazı parazitlerin sağlıklı hayvanlarda bulunmasının önemli bir etki yapmadığı, ancak bir türle oluşan ağır enfeksiyonlarda veya birkaç türden ileri gelen karışık enfeksiyonlarda de-

ney sonuçlarının etkilenebileceği belirtilmektedir. Bu yüzden deneysel çalışmalarda kullanılacak laboratuvar hayvanlarının parazit taşıması istenmektedir [1,2,13-15].

Laboratuvar hayvanlarının kendilerine özgü parazitleri bulunmaktadır. Bu hayvanlarda birçok parazit türü bulunmasına karşın *Aspiculuris tetraptera*, *Syphacia obvelata*, *S.muris*, *Hymenolepis nana*, *H.diminuta* ve *Trichosomoides crassicauda* daha yaygın olarak görülmektedir. Bu parazitler genel olarak klinik belirti göstermemekte ancak düşük hijyen koşullarında, diğer enfeksiyonlarla birlikte ya da sayıca fazla olduklarında semptomlar ortaya çıkmaktadır [1,2,12,13].

Bu çalışmada Gülhane Askeri Tıp Akademisi Deneysel Hayvanları Kısmı laboratuvar fare, sıçan ve

kobaylarında bulunan paraziter etkenler ve yaygınlıkları araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışma Ekim 2011-Haziran 2012 tarihleri arasında Gülhane Askeri Tıp Akademisi Deney Hayvanları Kısmı'nda yapılmıştır. Konvansiyonel üretimi yapılan hayvanlar kafeslerde farklı sayılarda gruplar halinde barındırıldığı için toplam 155 sıçan (91 Sprag-Dawley, 53 Wistar Albino, 11 Long-Evans), 17 Balb/c fare ve 16 kobay kafesinden dışkı örneği alınmıştır. Araştırma 536 Sprag-Dawley, 265 Wistar Albino, 48 Long-Evans olmak üzere toplam 849 sıçan (*Rattus norvegicus*), 283 Balb/c fare (*Mus musculus*) ve 74 kobay (*Cavia porcellus*) üzerinde yapılmıştır. Bunların 704 (%58,37)'ü dişi, 502 (%41,63)'si erkektir (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmaya alınan toplam hayvan sayısı ve cinsiyet durumları

Hayvan	Erkek	Dişi	Toplam
Sprag-Dawley	254	282	536
Wistar Albino	95	170	265
Long-Evans	28	20	48
Fare	91	192	283
Kobay	34	40	74
Toplam	502 (%41,63)	704 (%58,37)	1206

Kafesin her bölgesinden eşit miktarda dışkı örneği temiz bir pens yardımıyla kaplara alınarak

Tablo 2. Sıçanlarda kafeslere göre tespit edilen helmintler ve cinsiyete göre dağılımı

Parazit	Erkek Kafesi	Dişi Kafesi	Toplam
<i>A.tetraptera</i> + <i>S.muris</i>	24	31	55 (%35,48)
<i>S.muris</i>	15	22	37 (%23,87)
<i>A.tetraptera</i>	12	23	35 (%22,58)
<i>A.tetraptera</i> + <i>S.muris</i> + <i>H.nana</i>	2	3	5 (%3,23)
<i>A.tetraptera</i> + <i>T.crassicauda</i>	-	2	2 (%1,29)
<i>S.muris</i> + <i>H.nana</i>	1	-	1 (%0,65)
Negatif (-)	14	6	20 (%12,90)
Toplam	68	87	155

İncelenen dişi ve erkek fare kafeslerinin tamamı (%100) enfekte bulunurken bunların %82,35'inde

üzerine gruba ait bilgiler ve numarası yazılmıştır. Alınan dışkı örnekleri bekletilmeden Fülleborn doymuş tuzlu su yüzdürme yöntemiyle incelenmiş ve bulunan parazit yumurtaları ilgili literatürlere göre teşhis edilmiştir [1,2,6,12].

Hayvanların cinsiyeti ve genel enfeksiyon oranı arasındaki ilişkinin istatistiksel analizi için ki kare testi kullanılmıştır.

Bulgular

Dışkı bakısı yapılan 155 sıçan kafesinin 135 (%87,10)'inde, 17 fare kafesinin ise tamamında (%100) bir veya birden fazla parazit türü tespit edilmiştir (Tablo2-3). Kobay kafeslerinde ise herhangi bir paraziter etkene rastlanmamıştır.

Wistar Albino'ların %88,68 (47/53)'i, Sprag-Dawley'lerin %87,91 (80/91)'i ve Long-Evans'ların %72,73 (8/11)'ü enfekte bulunmuştur. Bu sıçan kafeslerinin 55 (%35,48)'inde *A.tetraptera* ve *S.muris* birlikte, 37 (%23,87)'sinde yalnız *S.muris*, 35 (%22,58)'inde yalnız *A.tetraptera*, 5 (%3,23)'inde *A.tetraptera*, *S.muris* ve *H.nana*, 2 (%1,29)'sinde *A.tetraptera* ve *T.crassicauda*, 1 (%0,65)'inde ise *S.muris* ve *H.nana* birlikte görülmüştür.

Erkek sıçanlarda genel enfeksiyon oranı %79,41 (54/68) bulunurken dişilerde %93,10 (81/87) olarak tespit edilmiştir (Tablo 2). Ki kare testi ile sıçanların cinsiyeti ve genel enfeksiyon oranı arasında anlamlı fark bulunmuş ($p < 0.05$), dişilerde parazitlere daha fazla rastlanılmıştır.

A.tetraptera ve *S.obvelata*, %11,77'sinde *A.tetraptera*, *S.obvelata* ve *H.nana*, %5,88'inde ise

yalnız *A.tetraptera* görülmüştür. *S.muris* enfeksiyonuna ise rastlanılmamıştır (Tablo 3). Ki kare testi ile

farelerin cinsiyeti ve enfeksiyon arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 3. Fare kafeslerinde tespit edilen helmintler ve cinsiyete göre dağılımı.

Parazit	Erkek Kafesi	Dişi Kafesi	Toplam
<i>A.tetraptera</i> + <i>S.obvelata</i>	3	11	14 (%82,35)
<i>A.tetraptera</i> + <i>S.obvelata</i> + <i>H.nana</i>	2	-	2 (%11,77)
<i>A.tetraptera</i>	-	1	1 (%5,88)
Toplam	6	11	17

Tartışma ve Sonuç

Yapılan deneysel araştırma sonuçlarından doğru veriler alınmasının parametrelerinden biri de kullanılan deney hayvanlarının sağlıklı olmasıdır. Bu yüzden deneysel çalışmalarda kullanılacak laboratuvar hayvanlarının parazit taşımaması istenmektedir [2,7,15].

Paraziter hastalıklar genelde belirgin klinik belirtiler oluşturmazken, düşük hijyen şartlarında ve diğer enfeksiyonlarla birlikte olduklarında semptomlar ortaya çıkmaktadır. Başka bir ifadeyle parazitlerle enfekte hayvanların diğer enfeksiyonları da taşıdığından şüphelenilir [13,14].

Türkiye’de [4-6,15] ve farklı ülkelerde [3,8,10,11] deney hayvanlarının paraziter hastalıklarıyla ilgili bazı araştırmalar bulunmakla birlikte alınan sonuçlar birbirinden farklılık göstermektedir.

Farelerde yapılan çalışmalarda Samsun’da [4] *S.muris* %100, *S.obvelata* %46,4 oranında bulunurken, Bursa’da [15] *S.obvelata* %10,72 oranında tespit edilmiş ve *S.muris*’e rastlanmamıştır. Brezilya’da 116 fare üzerinde yapılan araştırmada *S.obvelata* yaygınlığı %91,5 oranında tespit edilmiştir [3]. Bu çalışmada da Bazzano ve ark. [3]’nin çalışmalarına paralel olarak *S.obvelata* farelerin büyük bir kısmında (%94,12) görülmüş, ayrıca *S.muris*’e de rastlanılmamıştır. Bizim bulgularımız Burgu ve ark. [2]’nin *S.obvelata* farelerin, *S.muris* ise sıçanların paraziti olduğu düşüncesini desteklemektedir. Beyhan ve ark. [4] farelerde cestodlardan yalnızca *H.diminuta*’yı (%17,9), Şenlik ve ark. [15] ise yalnız *H.nana*’yı (%15,45) tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da Şenlik ve ark. [15]’nin tespit ettiği gibi cestodlardan yalnız *H.nana*’ya (%11,77) rastlanmıştır. Farelerde *A.tetraptera*’yı Beyhan ve ark. [4] %53,6; Şenlik ve ark. [15] %79,18, Cheng ve Xinmei [8] %21,9 ve Gudissa ve ark. [10] %27,15

oranında bulmuşlardır. Bu çalışmada ise farelerin tümünde *A.tetraptera*’ya (%100) rastlanması, parazitin bu hayvanlarda *S.obvelata* kadar yaygın olduğunu göstermektedir.

Türkiye’de sıçanlarda yapılan çalışmaların çoğunda [4-6] olduğu gibi (%25-100) *S.muris* bu çalışmada da oldukça yaygın (%63,49) olarak bulunmuş, *S.obvelata*’ya da rastlanılmamıştır. Yine bir çok çalışmanın [4,6,10,16] verilerine paralel olarak *H.nana* ile az miktarda (%3,88) karşılaşılmış, Beyhan ve ark. [4] ve Burgu ve ark. [6]’nin aksine *H.diminuta*’ya rastlanılmamıştır. Bununla birlikte Bangladeş’te yapılan bir çalışmada sıçanlarda *H.nana* ve *H.diminuta* enfeksiyonları sırasıyla %56,25 ve %65,11 oranlarında bulunmuştur [11]. Birçok çalışmada [4,5,11,15,16] sıçanlarda *A.tetraptera* tespit edilmemiş fakat bu çalışmada parazite yüksek oranda (%62,88) rastlanılmıştır. Bulunan oranlardaki farklılıklar, yapılan çalışmaların sayıca az olmasından ve hijyen koşullarındaki değişiklikten kaynaklandığı düşünülmektedir. *T.crassicauda* idrar kesesinde yaşamakta ve yumurtalarını idrarla dışarı atmaktadır. Laboratuvar hayvanlarının idrarı kafeslerdeki dışkıya karıştığından dışkıda da bu parazitin yumurtalarına rastlanmaktadır. Sıçanlarda *T.crassicauda* enfeksiyonunu Burgu ve ark. [6] Ankara’da %2,3-31,4 oranlarında tespit etmişlerdir. Parazite bu çalışmadan (%1,29) daha yüksek oranda rastlanması çalışmanın hem dışkı bakışı hem de otopsi sonuçlarını içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada laboratuvar hayvanlarında paraziter etkenlerin yaygın olarak bulunduğu görülmüştür. Bilimsel araştırmalarda kullanılacak deney hayvanlarının bağırsak parazitleri yönünden incelenmesi, hem araştırma yönteminin duyarlılığı hem de araştırmacının sağlığı açısından önemlidir. Enfekte olduğu tespit edilen hayvanlar deneyi etkilemeye-

cek durumdaysa tedavi edilmelidir. Aksi takdirde bu tip hayvanlar çalışma grubundan çıkarılmalıdır. Laboratuvar hayvanların yetiştirildiği alanlarda hijyen koşullarına dikkat edilmeli ve belirli aralıklarla parazitolojik muayeneleri yapılmalıdır. Bu araştırmanın bitimiyle birlikte uygun antiparaziterler ile periyodik ilaçlamalara başlanmıştır.

Kaynaklar

1. **Baker DG**, (1998): *Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research*. Clin Microbiol Rev. 11, 231-266.
2. **Baker D**, (2007): *Parasites of rats and mice*. Baker D. ed. *Flynn's Parasites of Laboratory Animals*. Second Ed. Blackwell Publishing, Iowa, USA. p. 303-397.
3. **Bazzano T, Restel TI, Pinto RM, Gomes DC**, (2002): *Patterns of Infection with the Nematodes Syphacia obvelata and Aspiculuris tetrapterain Conventionally Maintained Laboratory Mice*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 97(6), 847-853.
4. **Beyhan YE, Gürler AT, Bölükbaş C, Açıcı M, Umur Ş**, (2010): *Bazı Laboratuvar Hayvanlarında Nekropsi ve Dışkı Bakısı ile Saptanan Helminthler*. Türkiye Parazitol Derg. 34(2), 98-101.
5. **Bıyıkoğlu G**, (1996): *Bazı laboratuvar hayvanlarında dışkı bakılarında saptanan helmintler*. Etlik Vet Mikrobiyol Derg. 8(4), 137-146.
6. **Burgu A, Doğanay A, Yılmaz H**, (1986): *Laboratuvar beyaz fare ve ratlarında Syphacia obvelata ve S.muris enfeksiyonları*. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 33(3), 434-451.
7. **Burgu A, Öge S, Gönenç B**, (1997): *Farelerde Hymenolepis nana'ya bazı antelmantiklerin etkisi*. Etlik Vet Mikrobiyol Derg. 9, 7-15.
8. **Cheng G, Xinmei Q**, (1990): *Observation on intestinal parasites of laboratory mice*. J Shanghai Agr Coll. 8(2), 125-130.
9. **Eastbrook JD, Kaplan JB, Vanasco NB, Reeves WK, Purcell RH, Kosoy MY, Glass GE, Watson J, Klein SL**, (2007): *A survey of zoonotic pathogens carried by Norway rats in Baltimore, Maryland, USA*. Epidemiol Infect. 135, 1192-1199.
10. **Gudissa T, Mazengia H, Alemu S, Nigussie H**, (2011): *Prevalence of gastrointestinal parasites of laboratory animals at Ethiopian Health and Nutrition Research Institute (EHNRI), Addis Ababa*. J Infect Dis Immun. 3(1), 1-5.
11. **Muznebin F, Khanum H, Nessa Z, Islam D**, (2009): *Endoparasitic Infection in Laboratory Rat Strain, Long-Evans (Rattus norvegicus Berkenhout, 1769)*. Bangladesh J Sci Ind Res. 44(1), 109-116.
12. **Nicklas W**, (2004): *Infectious in laboratory animals: Importance and control*. Kaliste E. ed. The Welfare of Laboratory Animals'da. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherland. p. 23-37.
13. **Nicklas W, Homberger FR, Illgen-Wilcke B, Jacobi K, Kraft V, Kunstyr I, Mähler M, Meyer H, Pohlmeier-Esch G**, (1999): *Implications of infectious agents on results of animal experiments: Report of the Working Group on Hygiene of the Gesellschaft für Versuchstierkunde-Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS)*. Lab Anim. 33, 39-87.
14. **Pinto RM, Vicente JJ, Noronha D, Gonçalves L, Gomes DC**, (1994): *Helminth parasites of conventionally maintained laboratory mice*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 89, 33-49.
15. **Şenlik B, Diker Aİ, Küçükıldız F**, (2005): *Bazı laboratuvar hayvanlarında dışkı muayenesi ile saptanan helmintler*. Türkiye Parazitol Derg. 29, 123-125.
16. **Yazar S, Hamamcı B, Ünver AC, Şahin İ**, (2002): *Ratlarda bağırsak parazitlerinin yaygınlığının araştırılması*. Türkiye Parazitol Derg. 26(2), 212-213.

Investigation of blood and milk lactoferrin concentrations in lactating ewes with subclinical mastitis

Cevat NİSBET¹, Gül Fatma YARIM¹, Gülay ÇİFTÇİ¹, Nilgün GÜLTİKEN², Sena ÇENESİZ¹

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ondokuz Mayıs, Samsun

² Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ondokuz Mayıs, Samsun

Geliş Tarihi / Received: 01.07.2013, Kabul Tarihi / Accepted: 13.11.2013

Summary: The aim of the present study was to determine the availability of blood and milk lactoferrin concentrations in the diagnosis of subclinical mastitis in lactating Karayaka ewes. The milk samples obtained from 43 mid-lactating Karayaka ewes, aged between 2 and 3, were examined by California Mastitis Test (CMT) and somatic cell count (SCC) methods. Animals (n=23) had positive CMT score and SCC between 300.000-1.000.000 cells/ml were defined as sub-clinical mastitis group, whereas ewes with CMT negative and SCC between 100.000-200.000 cells/ml were described as control (healthy) group. The serum was obtained from blood and milk samples of ewes and ELISA was performed to detect blood and milk lactoferrin concentrations. The mean blood lactoferrin concentrations in subclinical mastitis group and control group were 0.90±0.08 µg/ml and 0.85±0.08 µg/ml, respectively, however the difference was not significant (p>0.05). The mean milk lactoferrin concentrations in ewes with subclinical mastitis and healthy ewes was 23.98±3.45 µg/ml and 16.84±1.29 µg/ml, respectively (p<0.01). Consequently, it is suggested that the concentration of milk lactoferrin might be a useful marker in the diagnosis of ewes with subclinical mastitis.

Key words: Lactoferrin, mid-lactation, milk, ewe, subclinical mastitis.

Laktasyon periyodundaki subklinik mastitisli koyunlarda kan ve süt laktoferrin konsantrasyonlarının araştırılması

Özet: Bu çalışmada, laktasyon periyodundaki subklinik mastitisli ve sağlıklı Karayaka ırkı koyunlarda süt ve kan serumlarında laktoferrin konsantrasyonlarının belirlenmesi amaçlandı. Araştırmada, ortalama 2-3 yaşlarında ve laktasyonlarının orta döneminde bulunan Karayaka ırkı koyunlar, Kaliforniya mastitis test ve sütte somatik hücre sayımı yöntemleri ile subklinik mastitis yönünden incelendi. Sütleri Kaliforniya mastitis test pozitif ve somatik hücre sayımı 300.000-1.000.000 olan 23 adet koyun subklinik mastitis grubunu, Kaliforniya mastitis test negatif ve somatik hücre sayımı <300.000 olan 20 adet koyun ise kontrol grubunu oluşturdu. İneklerden kan ve süt örnekleri alınarak serumları çıkarıldı. Koyunların kan ve süt serumlarında laktoferrin ölçümleri ELISA test kitleri kullanılarak gerçekleştirildi. Subklinik mastitisli ve sağlıklı koyunların serum laktoferrin değişimleri sırasıyla ile 0.90±0.08 µg/ml ve 0.85±0.08 µg/ml olarak tespit edildi ve gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamadı (p>0.05). Süt serumu laktoferrin konsantrasyonları subklinik mastitisli ve kontrol gruplarında sırasıyla 23.98±3.45 µg/ml ve 16.84±1.29 µg/ml olarak bulundu. Subklinik mastitisli grubun süt serumu laktoferrin düzeylerinin kontrol grubununkine göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi (p<0.01). Sonuç olarak, koyunlarda süt serumu laktoferrin konsantrasyonunun subklinik mastitisin teşhisinde faydalı bir belirteç olarak kullanılabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Koyun, Laktasyon, Laktoferrin, Subklinik mastitis, Süt.

Introduction

Lactoferrin (LF) is an iron-binding glycoprotein of the transferrin family present in most biological secretions in the organism and it plays a key role immunity [22]. LF is synthesized from genital tract and mammary tissue [32] or from neutrophils by cell differentiation. It is also secreted by epithelial cells and can be found in exocrine fluids (saliva, pancreas, bile juice, gastric juice, lacrima,

semen, bronchial and nasal mucus) as apolactoferrin [22,36]. Transferrin is a glycoprotein and found in plasma for an iron transporter [14].

It is also characterized as a metalloprotein with molecular mass of 80 kDa [21]. It is well known that iron binding areas of lactoferrin and transferrin have the same composition and geometry but have differences in molecular structure [5,26]. Lactoferrin's capability of binding iron is two times higher than

that of transferrin [1]. The ability to keep iron bound even at low pH (pH~2) is important, especially at sites of infection and inflammation where, due to the metabolic activity of bacteria, the pH may fall under 4.5. In such a situation lactoferrin also binds iron released from transferrin, which prevents its further usage for bacterial proliferation [34]. Transferrin releases its iron at pH 5 [25]. Transferrin releases iron in low pH environment due to infection and lactoferrin binds transferrin to prevent bacterial proliferation [8]. Therefore, lactoferrin concentration increases during inflammation [17]. It has been stated that measurement of lactoferrin concentration in fluids, such as milk, is to be important in the investigation of mammary gland infections [10]. Since lactoferrin has antimicrobial [21], antifungal, antiparasitic [34], antiviral [22], immun-modulator and antineoplastic activities, evaluation of its concentrations in pathological conditions was proved to be an important tool in the diagnosis of the presence of infection [32, 35]. It is well known that mastitis is one of the main diseases that causes economic loss in dairy industries, as it alters physical and chemical composition of milk [23, 33]. Moreover, it is already described that the incidence of clinical mastitis was 5%, while subclinical mastitis was 5-30% in small ruminants [7,13] hence, early diagnosis of subclinical mastitis is of particular importance to preclude contamination and economic loss [15,30]. Therefore, the study was designed to blood and/or milk lactoferrin concentrations as an indicator in diagnosis of subclinical mastitis in lactating Karayaka ewes.

Material and Method

A total of 43 Karayaka ewes in mid-lactation period, aged between 2 and 3 were used in the study. One hundred fifty ewes were investigated in private farms in Tekkekoy, Samsun province, Turkey. Milk samples from each quarter were tested by California mastitis test (CMT) [29]. For this purpose, fresh milk sample obtained from each quarter was mixed with CMT reagent in the CMT test plate and gently rotated, gel formation and differentiation of the colour were investigated. CMT results were scored as negative (0), weak positive (+1), distinct positive (+2) and strong positive (+3). CMT positive or negative udder halves of ewes were recorded. In order to confirm CMT results microscopic meth-

od of somatic cell count (SCC) was performed. After SCC analysis [19], 20 ewes with negative CMT results and SCC between 100.000-200.000 cell/ml were included in the control group and 23 ewes with CMT positive results and SCC between 300.000-1.000.000 were included in subclinical mastitis group. Blood samples were collected from the jugular vein of each ewe into vaccinated tubes and centrifuged at 3000 rpm to separate serum. Ten ml quarter milk samples were centrifuged at 14.000 rpm for 15 minutes. After removal of lipid layer and sediment, casein was precipitated by acetic acid (0.1 M) reducing pH into 4.5 using pH meter. The extract centrifuged at 25.000 rpm, +2°C for 30 minutes to remove casein completely and to obtain approximately 2 ml of clear milk serum [37]. Blood and milk LF were measured by Bovine Lactoferrin ELISA test kits (Alpha Diagnostic International, 8090, USA) using ELISA reader (Digital and analog systems, Das, 2004, ITALY). In the present study bovine ELISA kit was used since amino acid composition of both ovine and bovine lactoferrins show that %80 of homology [9]. All steps were performed at room temperature. After each reagent addition, the plate was gently tapped to mix the well contents prior to beginning incubation. 100 µl of standards, samples and controls were added each to pre-determined wells. The plate was tapped gently to mix reagents and incubated for 60 min. The plate was washed four times and pat dry on fresh paper towels. 100 µl of diluted anti-bovine lactoferrin-HRP conjugate were added to each well and incubated for 30 min. The plate was washed five times. 100 µl tetramethylbenzidine (TMB) liquid substrate was added to each well and incubated for 15 min in the dark place. 100 µl of stop solution was added to each well. Absorbance of the entire plate was read at 450 nm using a single wavelength within 30 min after addition of stop solution. Significances of differences were analysed by Student t test [28]. Data of the groups are presented as mean±StD. A value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Findings

The mean blood and milk lactoferrin concentrations in healthy ewes (n=20) and ewes with subclinical mastitis (n=23) are shown in Table 1. Accordingly, the mean milk lactoferrin concentrations was

16.84±1.29 µg/ml in control group, while it was 23.98±3.45 µg/ml in ewes with subclinical mastitis ($p<0.01$). However, the mean blood lactoferrin con-

centrations in healthy ewes and ewes with subclinical mastitis were 0.85±0.08 and 0.90±0.08 µg/ml, respectively ($p>0.05$).

Table 1. The mean blood and milk lactoferrin concentrations (µg/ml) in healthy ewes and ewes with subclinical mastitis (mean±StD).

	Control group (n=20)	Subclinical mastitis group (n=23)	Significance
Blood LF	0.85 ± 0.08	0.90 ± 0.08	$p>0.05$
Milk LF	16.84 ± 1.29	23.98 ± 3.45	$p<0.01$

Discussion and Conclusion

Mastitis reduces not only the milk yield but also alters the chemical composition of the milk, hence it is a major problem for dairy industry. Clinical mastitis can be defined with the symptoms of the teat, udder and macroscopic changes in milk composition, whereas laboratory analysis is needed to diagnose subclinical mastitis [20]. After the beginning of inflammation in the mammary gland, polymorphonuclear cells pass through the endothelial cells to the inflammation site, therefore SCC, widely used method, is a quick and effective method in the determination of subclinical mastitis [2]. Moreover, CMT is also a reliable method to detect subclinical mastitis in ewes in veterinary practice [20]. In the present study, the CMT score was negative in healthy ewes and positive in ewes with subclinical mastitis, respectively. $SCC<300.000$ was evaluated as CMT negative in a healthy group and SCC 300.000 to 1.000.000 was evaluated as CMT+1 in a subclinical mastitis group. These results are consistent with the results of other studies [11,19].

LF is known to contribute to specific defense mechanisms of mammary gland in subclinical mastitis [6]. Therefore, it has been indicated that the measurement of milk lactoferrin concentration may be a useful method in the diagnosis of subclinical mastitis [12,31]. Moreover, a strong relationship has been reported between milk LF levels and SCC [16]. It was detected that milk LF and somatic cell count increased concurrently in both natural and experimental mastitis of goats compared to healthy ones [10]. The range of LF concentration is reported to be wide that is between 31.78-485.63 mg in healthy animals related to lactation periods and increases in inflammation [12]. Blood and milk LF concentrations were stated to be stable during lactation period

in the Ankara goat [4]. Kawai et al. [18] detected that milk LF concentration was higher in cows with clinical mastitis than cows with subclinical mastitis. In this study, the results revealed that milk LF concentrations in ewes with subclinical mastitis was higher than those in healthy ewes ($p<0.01$) (Table 1). Similarly, Hagiwara et al. [16] reported that cows with subclinical mastitis had higher milk LF concentrations as compared to healthy cows (2.23±0.39, 2.70±0.39). Al-Majali et al. [3] reported that concentration of milk lactoferrin from mastitic camels (3.8 ± 0.67) was significantly higher than that in normal camels (2.65 ± 0.88).

The circulating blood LF concentrations is normally very low; but it might increase due to LF secreted from the mammary gland endometrium and decidua during the pregnancy [24,27] due to neutrophil activation [8,17]. Indeed, the similar blood LF concentrations in both groups as shown in the results of the study suggested that the concentrations of blood LF might not be effected by the local defense of mammary gland. Moreover, it is predictable that the subclinical mastitis does not lead to a systemic infection, since it is a local inflammation and blood LF concentration does not increase.

In conclusion, based on the findings of the study, it is suggested that the determination of milk LF concentration is more reliable than blood LF concentration. Moreover, the milk LF concentration might be used in the diagnosis of subclinical mastitis in ewe.

Acknowledgements

This study was supported by University of Ondokuz Mayıs, Project Management Office with the code of VET-038.

References

1. Adlerova L, Bartoskova B, Faldyna M, (2008). *Lactoferrin: a review*. Veterinarni Medicina. 53, 457-468.
2. Alacam E, (1989). *Diseases of cattle*, Veterinary Medicine Teknografik Matbaa, Istanbul, Turkey. 459-482.
3. Al-Majali A, Ismail ZB, Al-Hami Y, Nour Ay, (2007). *Lactoferrin concentration in milk from camels (camelus dromedarius) with and without subclinical mastitis*. Int J Appl Res Vet Med. 5, 120-124.
4. Avci G, Sel T, (2004). *Milk and serum lactoferrin levels in Angora Goats during lactation period*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 51, 181-187.
5. Baker EN, (2005). *Lactoferrin: a multi-tasking protein par excellence*. Cell Mol Life Sci. 62 (22), 2529-2530.
6. Baveye S, Elas E, Mazurier J, Spik G, Legrand D, (1999). *Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process*. Clin. Chem. Lab. Med. 37, 281-286.
7. Bergonier D, Berthelot X, (2003). *New advances in epizootiology and control of ewe mastitis*. Livest Prod Sci. 79, 1-16.
8. Brock JH, (2002). *The physiology of lactoferrin*. Biochem Cell Biol. 80, 1-6.
9. Buchta R, (1991) *Ovine lactoferrin: isolation from colostrum and characterization*. J Dairy Res. 58(2):211-218.
10. Chen Gh, Yin Li, Chiang JH, Jiang ST, (2008). *Cloning and expression of antibacterial goat lactoferrin from Escherichia coli AD494(DE3)pLysS expression system*. J Food Prot. 71 (12), 2523-2525.
11. Chen PW, Shyu C, Mao FC, (2003). *Antibacterial activity of short hydrophobic and basic-rich peptides*. Am J Vet Res. 64 (9), 1088-1092.
12. Cheng JB, Wang JQ, Bu DP, Liu GL, Zhang CG, Wei HY, Zhou LY, Wan JZ, (2008). *Factors Affecting the Lactoferrin Concentration in Bovine Milk*. J Dairy Sci. 91, 3, 970-976.
13. Contreras A, Sierra D, Sanchez A, Corrale JC, Marco JC, Paape MJ, Gonzalo C, (2007). *Mastitis in small ruminants*. Small Rum Res. 68, 145-153.
14. De Jong G, Van Dijk JP, Van Eijk HG, (1990). *The biology of transferrin*. Clin Chim Acta. 190, 1-46.
15. Graaf T, Dwinge RH, (1995). *Estimation of milk production losses due to subclinical mastitis in dairy cattle in Costa Rica*. In proceeding of the third IDF international mastitis seminar, 11, 28 May-1 June, Tel-Aviv, Israel.
16. Hagiwara SI, Kawa K, Anri A, Nagahata H, (2003). *Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows*. J Vet Med Sci. 65 (3), 319-323.
17. Kanyshkova TG, Buneva VN, Nevinsky GA, (2001). *Lactoferrin and its biological functions*. Biochemistry (Moscow). 66, 1-7.
18. Kawai K, Hagiwara S, Anri A, Nagahata H, (1999). *Lactoferrin concentration in milk of ovine clinical mastitis*. Vet Res Commun. 23, 391-398.
19. Kilicoglu Ç, Alacam E, Izzur H, Akay O, Wiesner HU, (1989). *Eutergesundheitskontrolle von Milchkühen im Gebiet von Ankara (Turkei)*. Dtsch Tierärztl Wschr. 96, 486-488.
20. Lafi SQ, (2006). *Use of somatic cell counts and California Mastitis Test results from udder halves milk samples to detect subclinical intramammary infection in Awassi sheep*. Small Rum Res. 62, 83-86.
21. Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J, (2005). *Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses*. Cell Mol Life Sci. 62, 2549-2559.
22. Legrand D, Pierce A, Ellass E, Carpentier M, Mariller C, Mazurier J, (2008). *Lactoferrin structure and functions*. Adv Exp Med Biol. 606, 163-94.
23. Leitner G, Chaffer M, Shamay A, Shapiro F, Merinu E, Ezra A, Saran A, Silanikove N, (2004). *Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep*. J Dairy Sci. 87, 46-52.
24. Levay PF, Viljoen M, (1995). *Lactoferrin: a general review*. Haematologica. 80, 252-267.
25. Mazurier J, Lhoste JM, Montreuil J, Spik G, (1983). *Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. II. Electron paramagnetic resonance of mixed metal complexes of human lactotransferrin*. Biochim Biophys Acta. 30, 745 (1), 44-49.
26. Moguelevsky N, Retegui La, Masson PL, (1985). *Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes. Relative molecular mass, isoelectric point, iron-binding properties and uptake by the liver*. Biochem J. 229 (2), 353-359.
27. Oberg G, Lindmar G, Moberg L, Venge P, (1983). *The peroxidase activity and cellular content of granule proteins in PMN during pregnancy*. Br J Haematol. 55 (4), 701-708.
28. Rao CR, (1973). *Linear Statistical Inference and Its Applications*, John&Sons, New York
29. Schalm OW, Carroll Ej, Jain NC, (1971). *Bovine Mastitis*, Lea and Febiger, Philadelphia. P, 24.
30. Silanikove N, Shapiro F, Leitner G, Merin U, (2005). *Subclinical mastitis affects the plasmin system, milk composition and curd yield in sheep and goats: comparative aspects*. In: Hogeveen, H. (Ed.), Mastitis in Dairy Production. Wageningen Academic Press Publishers, The Netherlands, 511-516.
31. Sordillo LM, Streicher KL, (2002). *Mammary Gland Immunity and Mastitis Susceptibility*. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 7, 2, 135-146.
32. Teng CT, Beard C, Gladwell W, (2002). *Differential expression and estrogen response of lactoferrin gene in the female reproductive tract of mouse, rat and hamster*. Biol Reprod. 67, 1439-1449.
33. Tripathi BN, (2000). *Diseases of the mammary glands of goats and sheep*. Vet Bul. 70, 1117-1142.
34. Valenti P, Antonini G, (2005). *Lactoferrin: an important host defense against microbial and viral attack*. Cell Mol Life Sci. 62, 2576-2587.
35. Vorland LH, (1999). *Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein*. APMIS. 107, 971-981.
36. Weinberg ED, (2003). *The therapeutic potential of lactoferrin*. Expert Opin Investig Drugs. 12 (5), 841-51.
37. Welty FK, Smith KL, Schanbacher FL, (1976). *Lactoferrin concentration during involution of the bovine mammary gland*. J Dairy Sci. 59, 224-231.

Real-Time PCR tekniği ile çeşitli et ürünlerinde tavuk ve sığır eti oranlarının kantitatif tayini*

Yıldız AYZ¹, Naim Deniz AYZ², Mihriban AKSOY¹, Yusuf Ziya KAPLAN¹

¹ Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Etlik, Ankara

² Kırıkkale Üniversitesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Yahşihan, Kırıkkale

Geliş Tarihi / Received: 12.11.2013, Kabul Tarihi / Accepted: 27.12.2013

Özet: Et ürünleri üretiminde kullanılan et türlerinin tür bazında ve oransal olarak doğru belirlenmesi tüketicinin aldatılmasının önlenmesi, halk sağlığının korunması ve üreticiler arası haksız rekabetin önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Yapılan bu çalışmada, hem tür analizi hem de kantitatif analiz yapabildiği üretici firma tarafından ifade edilen SureFood Animal QUANT Beef ve SureFood Animal QUANT Chicken real-time PCR kitleri kullanılmıştır. Çalışmada deneysel olarak belirli oranlarda (%10 sığır eti + %90 tavuk eti, %20 sığır eti + %80 tavuk eti, %30 sığır eti + %70 tavuk eti, %50 sığır eti + %50 tavuk eti, %20 tavuk eti + %80 sığır eti, %30 tavuk eti + %70 sığır eti olmak üzere) sığır eti + tavuk eti karışımlarının yanı sıra farklı oranlarda sığır ve tavuk etinden hazırlanmış et ürünleri (salam, sosıs ve sucuk) test materyali olarak kullanılmıştır. Et karışımlarından ve et ürünlerinden DNA ekstraksiyon işlemleri SureFood Prep Animal DNA ekstraksiyon kiti (Congen S 1003, Berlin, Almanya) ile yapılmıştır. DNA ekstraksiyonunu takiben Real-Time PCR tekniği ile et oranları tayin edilmeye çalışılmıştır. PCR analizleri Light Cycler-2 (Roche) cihazında gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, kullanılan SureFood Animal QUANT Beef and SureFood Animal QUANT Chicken real-time PCR kitlerinin deneysel olarak farklı oranlarda sığır ve tavuk etinden hazırlanmış et karışımları ile yine çeşitli sığır ve tavuk eti karışımlarından yapılan salam, sosıs ve sucuk örneklerinde sığır ve tavuk eti oranlarını kantitatif olarak doğru tespit edemediği ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Et ürünleri, et türleri, kantitatif analiz, Real-Time PCR.

Quantitative detection of chicken and beef meat from meat products by Real-Time PCR

Summary: Quantitative detection of meat species that are used in production of meat products has a great importance for preventing consumers from adulteration, protection of public health and prevention of unfair competition between producers. In this study, SureFood Animal QUANT Beef and SureFood Animal QUANT Chicken real-time PCR kits were used to detect meat species quantitatively. For this purpose, various proportions (10% bovine + 90% chicken, 20% bovine + 80% chicken, 30% bovine + 70% chicken, 50% bovine + 50% chicken, 80% bovine + 20% chicken, 70% bovine + 30% chicken) of bovine and chicken meat mixtures and meat products (salami, sausage and sucuk from different bovine + chicken meat) were experimentally prepared. After DNA extraction process of these meat mixtures and products, Real-Time PCR technique was used for the quantitative detection of meat species. SureFood Prep Animal DNA extraction kit (Congen S 1003, Berlin, Germany) was used for the extraction of DNA from mixtures. PCR analyses were carried out with Light Cycler-2 (Roche, Germany). According to the real-time PCR results, SureFood Animal QUANT Beef and SureFood Animal QUANT Chicken kits were not able to detect the rates of meat species in meat mixtures (beef and chicken) and meat products (salami, sausage and sucuk) accurately.

Key words: Meat products, meat species, quantitative detection. Real-Time PCR.

Giriş

Çeşitli et karışımları ve et ürünlerinde kullanılan et türleri (sığır eti, at, eşek eti, domuz eti, tavuk, hindi eti vb.) AGID, ELISA, RT PCR ve Real-Time PCR metotları ile teşhis edilebilmektedir. Türk Gıda Kodeksi Et Ürünleri Tebliği madde 4/a) “Et; sığır, manda, koyun, keçi gibi büyük ve küçükbaş

hayvanlar; tavuk, hindi, kaz, ördek, beç tavuğu gibi evcil kanatlı hayvanlar ile tavşan ve domuzdan elde edilen, insan tüketimine uygun olan tüm parçaları” olarak tanımlanmıştır. Kodeks 2000 yılına kadar salam, sosıs, sucuk gibi et ürünlerinde sığır eti ile karışık olarak tavuk eti kullanımına izin vermemiştir. Ancak Türk Gıda Kodeksi 2000/4 no’lu tebliğinde et ürünlerinde sığır eti + tavuk eti kullanımına izin

Yazışma adresi / Correspondence: Yıldız Ayaz, Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Gıda Kontrol Laboratuvarı, Etlik, Ankara E-posta: yildizayaz@hotmail.com

*TAGEM/GY/11/03/191 nolu Gıda Tarım ve Hayvancılık projesinden özetlenmiştir.

vermiştir. Türk Gıda Kodeksi 2000/4 tebliği madde 12/ b ye göre “Et ürünlerinin elde edildiği et türü karışım söz konusu ise ürün adının hemen yanına en az 12 puntoluk büyüklükte üretimde kullanılan her et türünün yüzdesi yazılacaktır.” koşulu getirilmiştir. Laboratuvarlarımızda kullanılan presipitan serumlar, ELISA kitleri, primerler veya kalitatif kitler değişik hayvan türlerinden elde edilen ve et karışımlarında kullanılan etlerin oranlarını tespit etmek için yeterli değildir. Bu nedenle Kodekste sığır eti, koyun eti vb. kullanımına izin verilen etlere tavuk eti katılarak üretilen et ürünlerinde tavuk eti oranını saptamak olanaksızdır.

Yapılan bu çalışmada son yıllarda yurt dışında üretilerek tanıtımı yapılan, hem tür analizi hem de kantitatif analiz yapabilen Real-Time PCR kiti kullanılarak bu sorun aşılmaya çalışılmıştır.

Sığır eti ve tavuk eti karışımlarından yapılan Et Ürünlerinde (salam, sucuk, sosis vb.) tavuk etinin yüksek oranda kullanılması ürünün maliyet fiyatını düşürürken raf ömründe kıalmaya neden olmakta ürünün tad, koku, aroma ve yapı kalitesini bozmaktadır. Ayrıca tavuk eti sığır etine oranla Salmonella spp. yönünden daha büyük bir risk taşımaktadır. Et ürünlerinde kullanılan et karışımlarında et türü oranları etikette doğru olarak belirtilmediği takdirde tüketicinin kandırılmasının yanı sıra üreticiler arasında da etik çalışanların aleyhine olarak haksız rekabete neden olmaktadır. Laboratuvarlarda et ürünlerinde kullanılan et oranlarının miktarı tespit edilmediğini bilen bir kısım üreticiler bu boşluktan yararlanarak ürün etiketinde sığır eti oranını olduğundan yüksek, tavuk eti oranını da olduğundan daha düşük gösterebilmektedir. Laboratuvarlarda et ürünlerinde kullanılan hayvan türlerinin tür bazında ve oransal olarak doğru belirlenmesi tüketicinin aldatılmasının önlenmesi, halk sağlığının korunması ve üreticiler arası haksız rekabetin önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Et ürünlerine düşük değerli et türlerinin karıştırılması, ekonomik, dini ve sağlık yönünden önemli olduğu kadar et ve et ürünleri üretiminde kullanılan et türlerinin tespiti ve kantitasyonu ürünün mevzuata uygunluğunun kontrolü gıda hijyeni, gıda kontrolü, gıda kodeksi ve veteriner adli tıp açısından büyük öneme sahiptir.

Bu çalışma et ürünlerinde sığır eti ve tavuk eti oranlarını Real-Time PCR tekniği ile kantitatif olarak test etmek amacı ile yapılmıştır.

Kanatlı eti ve sığır eti karışımından yapılan et ürünleri örnekleri:

Materyal ve Metot

Bu çalışmada çeşitli ulusal firmalar tarafından üretilen, etiketlerinde tavuk eti ve sığır eti karışımından yapıldığı belirtilen 30 sosis, 30 salam ve 30 sucuk olmak üzere toplam 90 adet et ürünündeki sığır eti ve tavuk eti oranları Real-time PCR tekniği ile kantitatif olarak test edilmesi planlanmıştır.

Metot validasyonu için belirli oranlarda:

%10 sığır eti + %90 tavuk eti

%20 sığır eti + %80 tavuk eti

%30 sığır eti + %70 tavuk eti

%50 sığır eti + %50 tavuk eti

%20 tavuk et i+ %80 sığır eti,

%30 tavuk eti + %70 sığır eti karışımları hazırlanarak bu karışımlarda DNA ekstraksiyonu işlemini takiben Real-Time PCR tekniği ile et oranları tayin edilmeye çalışılmıştır

Deneme çalışmalarında kullanılmak amacıyla özel bir firmaya tavuk eti ve sığır eti karışımı oranı

%50 Sığır eti + %50 Tavuk eti

%70 Sığır eti + %30 Tavuk eti

%80 Sığır eti + %30 Tavuk eti olan sosis, salam ve sucuk örnekleri yaptırılmıştır.

Çalışmada laboratuvarında hazırlanan, bilinen orandaki sığır eti ve tavuk etinden oluşan et karışımları ve belirli oranlarda sığır eti ve tavuk eti karışımından yaptırılan sucuk, sosis ve salam ürünlerinden toplam hayvansal et DNA oranı ile sığır ve tavuk eti DNA oranı karşılaştırılarak ürünündeki sığır eti ve tavuk eti oranını belirlemek amacıyla Real-time PCR tekniği kullanılmıştır. Analiz; örneklerin hazırlanması, DNA ekstraksiyonu, Real-time PCR reaksiyon karışımlarının hazırlanması, cihaza yükleme yapılması ve Real Time PCR işlemini takiben sonuçların bilgisayarda değerlendirilmesi aşamalarından oluşmuştur.

Çalışmalar Kurumumuz Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarında bulunan Roche marka Light Cycler-2 cihazında gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin hazırlanması ve DNA ekstraksiyonu: Et karışımlarından ve et ürünlerinden DNA ekstraksiyonu amacıyla SureFood Prep Animal DNA

ekstraksiyon kiti (Congen S 1003, Berlin, Almanya) kullanılmıştır.

SureFood Prep Animal DNA ekstraksiyon kiti manüeline göre örneklerden DNA ekstraksiyonu yapıldı. Mekanik olarak homojenize edilen et örneğinden 40 mg 1.5 ml'lik eppendorf tüpünde tartılarak alındı ve üzerine 400 µl Lysis buffer (Kit kod L) ve 40 µl Proteinaz K (Kit kod K) eklendi. Vortekslenerek homojenize edilen örnek benmaride çalkalanarak ve sık sık vortekslenerek 52°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpler 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant başka bir 1.5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı. Süpernatant 200 µl Binding buffer (Kit kod B) ile süspanse edilerek vortekslendi. Karışım spin filtreden (Kit kod S) geçirilerek yeni bir tüpe (Kit kod R) filtre edildikten sonra 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Filtrat atıldı ve spin filtre tekrar başka tüpe yerleştirildi. Spin filtreden 550 µl yıkama solüsyonu (Kit kod W) geçirildi ve 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Bu şekilde filtre yıkama solüsyonundan arındırıldı. Aynı şekilde yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı. Filtrat atıldıktan sonra spin filtre tekrar tüpe yerleştirildi ve kurutma işlemi için 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından filtreler yeni bir tüpe (Kit kod R) yerleştirildi ve üzerine 100 µl Eluasyon buffer (Kit kod E) eklendi. Tüpler 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtreler atılarak tüp içinde DNA' elde edildi. DNA miktarı Nano drop cihazında ölçüldü. Elde edilen ekstraksiyon PCR için aynı gün içinde kullanılmayacaksa kullanım aşamasına kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Real-Time PCR analizi: Çalışmada SureFood Animal Real-time PCR kitleri (Congen) kullanılmış olup Amplikasyon işlemi toplam 20.0 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Bu kitin manuali izlenerek yapılan çalışmalarda üründe bulunan toplam ete ait DNA oranı ve tespit edilmek istenen hayvan eti türüne özgü spesifik DNA oranı için Real Time PCR karışımları ayrı ayrı hazırlanmıştır. Et ürünündeki toplam ete ait DNA miktarını saptarken her bir örnek için 17 µl Ref reaksiyon karışımı (kod 3), 1.0 µl FDE (kod 5), 0.1 µl Taq polymerase (kod 6) ve 2.0 µl örneğe veya standartlara ait DNA PCR tüple-

rinde karıştırıldı. Tavuk veya sığır etine özgü DNA miktarının belirlenmesi için 17 µl hayvan türü (sığır veya tavuk) reaksiyon karışımı (kod 4), 1.0 µl FDE (kod 5), 0.1 µl Taq polymerase (kod 6) ve 2.0 µl örneğe veya standartlara ait DNA PCR tüplerinde karıştırıldı. Standart DNA'lar 105, 104, 103, 102, 101 kopya/µl olmak üzere 5 farklı dilüsyonda kullanıldı. Real-Time PCR işleminde LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics) cihazı kullanılmış olup sığır eti ve tavuk eti için Kitte verilen programlar uygulanmıştır.

Tablo 1. PCR Quant Beef Programı

	LightCycler
Initial Denaturation (HOLD)	1 min, 95°C
CYCLES	45
Denaturation	5 sec, 95°C
Annealing	10 sec, 62°C
Extension (CYCLE)	15 sec, 65°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	20°C/sec
Fluorescence Detection Setup	Channel: 530/610 or F1/F2 Acquisition mode: Single in extension phase

Tablo 2. PCR Quant Chicken Programı

	LightCycler/Rotor-Gene Q
Initial Denaturation (HOLD)	1 min, 95°C
CYCLES	45
Denaturation	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	20°C/sec
Fluorescence Detection Setup	Channel: 530/610 or F1/F2 Acquisition mode: Single in extension phase

Standart curve eldesi için kit içinde bulunan standart DNA TE buffer ile 1/10 oranında sulandırıldıktan sonra 10 katlı dilüsyonları hazırlandı.

Tablo 3. Standart DNA Dilüsyonlarının Hazırlanması

Standard	Dilutions	Copy number per µl	Final copy number per reaction
S1	45 µl TE Buffer + 5 µl Standard DNA	100.000 copies	500.000 copies
S2	45 µl TE Buffer + 5 µl DNA of S1	10.000 copies	50.000 copies
S3	45 µl TE Buffer + 5 µl DNA of S2	1000 copies	5000 copies
S4	45 µl TE Buffer + 5 µl DNA of S3	100 copies	500 copies
S5	45 µl TE Buffer + 5 µl DNA of S4	10 copies	50 copies

PCR protokolü sonrası aranan hayvan türüne özgü et DNA kopya sayısı toplam et DNA kopya sayısına bölünüp 100 ile çarpılarak karışık ette aranan ete ait et oranı bulundu. Düzeltme faktörü olarak K değeri %100 pozitif DNA sayısının ölçüm sonunda bulunan test sonunda elde edilen değere bölünmesi ile bulundu.

K: %100 pozitif DNA / % Ölçülen pozitif DNA

Bulgular

Laboratuvarda hazırlanan, bilinen orandaki sığır eti ve tavuk etinden oluşan et karışımlarında yapılan analizler sonucunda bulunan değerler Tablo 4 de gösterilmiştir.

Tablo 4. Sure Food ANİMAL QUANT Chicken test kiti ile yapılan çalışma sonuçları

Sıra no	Hazırlanan Karışım Oranı %	Bulunan Tavuk Eti Oranı %
1	70 Sığır eti + 30 Tavuk eti	44
2	70 Sığır eti + 30 Tavuk eti	18,92
3	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	43,91
4	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	59,57
5	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	15,7
6	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	-
7	70 Sığır eti + 30 Tavuk eti	18
8	70 Sığır eti + 30 Tavuk eti	15,6
9	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	15,6
10	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	16,2
11	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	46,8
12	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	37,2
13	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	22,29
14	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	35,85

15	20 Sığır eti + 80 Tavuk eti	29,25
16	20 Sığır eti + 80 Tavuk eti	24,12
17	10 Sığır eti + 90 Tavuk eti	27,63
18	10 Sığır eti + 90 Tavuk eti	34,54
19	10 Sığır eti + 90 Tavuk eti	48,46
20	100 Tavuk eti	204
21	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	29,9
22	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	76
23	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	100
24	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	900
25	10 Sığır eti + 90 Tavuk eti	33,7
26	10 Sığır eti + 90 Tavuk eti	39,5

Tablo 5. Sure Food ANİMAL QUANT Beef test kiti ile yapılan çalışma sonuçları

Sıra no	Hazırlanan Et Karışım Oranı %	Bulunan Sığır Eti Oranı %
1	100 Sığır eti	102
2	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	13,72
3	5 Sığır eti + 95 Tavuk eti	1,55
4	70 Sığır eti + 30 Tavuk eti	68,75
5	70 Sığır eti + 30 Tavuk eti	52,4
6	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	67
7	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	53
8	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	66
9	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	33,8
10	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	18
11	30 Sığır eti + 70 Tavuk eti	14,3
12	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	46,1
13	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	28

Tablo 6. Sure Food ANİMAL QUANT Chicken ve Beef test kitleri ile et ürünlerinde yapılan çalışma sonuçları

Numune	Karışım Oranı %	Bulunan Sığır Eti Oranı %
Salam	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	58,37
Salam	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	48,33
Sosis	80 Sığır eti + 20 Tavuk eti	49,25
Sosis	80 Sığır eti + 20 Tavuk eti	117,18
Sosis	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	20,59
Sosis	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	49,06
Sucuk	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	71,42
Sucuk	50 Sığır eti + 50 Tavuk eti	73,04
Sucuk	70 Sığır eti + 30 Tavuk eti	207,28
Sucuk	70 Sığır eti + 30 Tavuk eti	484,7

Çalışmanın tümünde standartlarla ilgili bir sorun yaşanmadı, PCR da linear doğrular elde edildi.

TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü laboratuvarında %10 sığır eti ve %90 tavuk eti karışımından birlikte yaptığımız çalışma sonucunda bulunan değer Tablo 7 de verilmiştir.

Tablo 7. TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü ve EVKMAE Gıda Kontrol Laboratuvarının Birlikte Surefood ANİMAL QUANT Beef Kiti İle Yapılan Çalışma Sonuçları

Kod no	Hazırlanan Karışım Oranı %	Bulunan Sığır Eti Oranı %
1	10 Sığır Eti + 90 Tavuk Eti	6,3
1	10 Sığır Eti + 90 Tavuk Eti	5,9

Bulunan değerler hazırlanan karışımda bulunan değerden düşüktür.

Deneyisel ortak çalışma: 31 Ekim 2011 tarihinde Ulusal Gıda Referans Laboratuvar Müdürlüğünde yapılan "Et ve Et ürünlerinde miktar analizi" ile ilgili toplantıda yapılan görüşmeler sonunda kurumumuz ve Ulusal Gıda Referans Laboratuvar Müdürlüğünden katılan teknik personelle birlikte hazırladığımız 4 farklı oranda sığır eti + tavuk etinden oluşan ve rondoda homojenize edilmiş et karışımları örnekleri kodlanarak Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne, TÜBİTAK Gen Müh. ve Biyoteknoloji Laboratuvarına ve MAM Gıda Enstitüsüne yollandı. Bu kurumlardan gelen analiz sonuçları Tablo 8 de verilmiştir.

Tablo 8. TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü Çalışma Sonuçları

Numune Kodu	SUREFOOD KİTİ İLE		SENTROMER KİTİ İLE		Hazırlanan Numune Oranları %	
	SIĞIRETİ	TAVUKETİ	SIĞIRETİ	TAVUKETİ	SIĞIRETİ	TAVUKETİ
ETLİK1	20	80	42	57	30	70
ETLİK2	50	50	73	26	70	30
ETLİK3	13	87	23	77	20	80
ETLİK4	32	68	65	35	50	50

TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Hayvan Genetiği ve Üreme Biyolojisi Laboratuvarı Sonuçları

Tablo 9. SUREFOOD BEEF Kiti İle Yapılan Çalışma Sonuçları

Numune Kodu	SUREFOOD KİTİ İLE		SUREFOOD KİTİ İLE TEKRAR		Hazırlanan Numunede Et Oranları %	
	(2 Paralelin CT Ortalaması alınmış)		(2 Paralelin CT Ortalaması alınmamış)		SIĞIR ETİ	TAVUK ETİ
	SIĞIR ETİ		SIĞIR ETİ			
ETLİK1	23,6		20	25	30	70
ETLİK 2	59,2		55	60	70	30
ETLİK 3	11,1		10	15	20	80
ETLİK 4	31		30	35	50	50

Tablo 10. SENTROMER Firmasına yaptırılan Real Time PCR Analiz Kiti (Sentroplex kit) ile yapılan çalışma sonuçları

Numune Kodu	SENTRO PLEX REAL TIME PCR ET TÜRÜ ANALİZ KİTİ		Hazırlanan Numunede Et Oranları %	
	TAVUK ETİ	SIĞIR ETİ	TAVUK ETİ	SIĞIR ETİ
ETLİK 1	50	50	70	30
ETLİK 2	10	90	30	70
ETLİK 3	60	40	80	20
ETLİK 4	10-20	80-90	50	50

Tartışma ve Sonuç

Laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda elde edilen et oranları sonuçları ile kontrollü olarak hazırlanarak analize alınan et oranları arasında bir paralellik görülmemiştir. Sonuçlar incelendiğinde: bulunan değerler her çalışmada bilinen değerlerin üzerinde veya değerlerin altında değil karışık bir tablo sergilemiştir. Paralel örneklerin sonuçlarında da bir standart gözlenmemiştir.

Et ve et ürünlerinde hayvan türlerinin tayininde serolojik [20], histolojik [24], İmmunoelektroforezis [19] ve immünokimyasal [21] tekniklerin yanında, yüksek duyarlılığı, spesifitesi ve kantitatif sonuç verebilmesi nedeniyle moleküler biyolojik bir teknik olan Real-time PCR tekniğinin etkin olarak kullanılan bir metot olduğu bildirilmektedir[15]. Kullanılan aynı metotla yapılan sonuçlarımız ile bu bildirim uyusmamaktadır.

Dooley ve ark. [6] yapmış oldukları çalışmada Real-time PCR tekniği ile et karışımı içinde %0.5 gibi çok düşük oranlardaki et türlerinin kantitatif olarak tespit edilebildiğini ortaya koymuşlardır. Et karışımlarında düşük miktarlardaki et türlerini kantitatif olarak laboratuvarımızda biz de ayırt edebilmekteyiz.

Chisholm ve ark. [4] yapmış oldukları çalışmada Real-time PCR tekniğinin et türlerinin kantitatif tespiti açısından kompleks yapıları ticari ürünlerde de spesifik ve duyarlılığı yüksek bir metot olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmaların aksine son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda bazı çelişkili sonuçlar elde edilmiştir.

Köppel ve ark. [14] sığır, koyun, domuz ve at eti karışımlarından Real -time PCR ile et türlerinin miktar olarak tespitine yönelik yapmış oldukları çalışmada; 5 farklı et karışımlarına %1, %9, %25,

%35, %55 olarak katılan sığır eti miktarını sırasıyla %0,35, %23, %34, 529,9 ve %51,2 olarak bulmuşlardır. Dolayısıyla bazı numunelerde yakın değerler tespit edilse de hiçbir numunede sığır eti yüzde değeri doğru olarak belirlenmemiştir. Bu çalışmada yaptığımız çalışmayı doğrular sonuçlar alınmıştır.

Et ürünlerine istenmeyen veya düşük değerli et türlerinin karıştırılması, ekonomik, dini ve sağlık yönünden olduğu kadar [2], et ürünleri üretiminde kullanılan et türlerinin tespiti ve mevzuata uygunluğunun kontrolü de gıda mevzuatı ve tüketici hakları yönünden büyük öneme sahiptir [22].

Et ürünlerine hile amacıyla ucuz et türlerinin karıştırılması, üreticiye haksız ekonomik kazanç sağlarken, bazı et türlerine hassasiyet gösteren insanlarda allerjik reaksiyonların şekillenmesiyle sağlık problemlerine neden olmakta ve dini inanışlar doğrultusunda bazı et türlerini tüketmeyen insanlar aldatılmaktadır [12]. Ayrıca BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy) hastalığının ortaya çıkmasına bağlı olarak et türlerinin tespiti daha da önem kazanmıştır [19].

Kanatlı etinin memeli hayvan etlerine oranla daha az doymuş yağ ve kolesterol içermesi nedeniyle Avrupa'da kanatlı eti tüketiminin artmasına bağlı olarak kanatlı eti üretiminin arttığı, bu nedenle diğer kasaplık hayvanların etinden üretilen ürünlere hile amacıyla mekanik olarak ayrılmış kemiksiz kanatlı dokularının katılması olasılığının yükseldiği bildirilmiştir [1].

Hsieh ve ark. [13] yerel marketlerden almış oldukları sığır ve kuzu kıyma örneklerinin kanatlı etiyle karıştırılmış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu durumun sığır ve kuzu etlerinin pahalı olmasına karşın kanatlı etinin daha ucuz olmasından ve tam olarak temizlenmemiş kıyma makinalarında farklı

et türlerinin arka arkaya çekilmiş olmasından kaynaklanabileceğini vurgulamışlardır.

Ayaz ve ark. [1] Ankara'da ELISA tekniği ile yapmış oldukları analizler neticesinde, 28 sucuktan 11'inin (%39.2), 14 salamdan 5'inin (%35.7), 11 sosisten 3'ünün (%27.2), 9 parça etten 2'sinin (%22.2), 16 kıyma ve köfteden ise 1'inin (%6.2) olmak üzere toplam 100 çiğ veya pişmiş et ve et ürünlerinden 22'sinin (%22.0) etiket bilgileri ile bağdaşmadığını bildirmişlerdir.

Günşen ve ark., [10] İstanbul'da yapmış oldukları çalışmada ELISA tekniği ile analiz edilen 410 adet numunenin tümünde (%100) sığır eti, bunun 85 adedinde (%20.7) tavuk eti, 14 adedinde (%4.3) at eti tespit etmişlerdir. İncelenen 410 numuneye ait etiket bilgilerinin, 67 örnek (%16.3) için etiket üzerinde verilen bilgiler ile uyumlu olmadığı belirlenerek, toplam 79 adet (%19.2) örneğin hileli olduğu sonucuna varılmıştır.

Et ve et ürünlerinde hayvan türlerinin tayininde basit teknikler [11], serolojik [20], histolojik [24] ve immünokimyasal [21] tekniklerin yanında, yüksek duyarlılığı, spesifitesi ve kantitatif sonuç verebilmesi nedeniyle moleküler biyolojik bir teknik olan real-time PCR tekniği etkin olarak kullanılan bir metottur [15].

Son yıllarda ELISA tekniğine ek olarak PCR [9], polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) [5], random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) [7], DNA hybridization [18] ve nükleotid sekanslama [8] gibi moleküler tekniklerde et türlerinin tespitinde etkin olarak kullanılmaya başlanmıştır. PCR tekniği ise bu moleküler teknikler arasında en yaygın kullanılan moleküler biyolojik metottur [3]. Son yapılan çalışmalar Real-time PCR tekniğinin et türlerinin kantitatif tespitinde etkin olarak kullanılabilceğini ortaya koymuştur [15,16,17]. Bizim çalışma sonuçlarımız bu bildirimleri desteklemektedir.

Soares ve ark [23] bilinen oranlarda hazırlanan kanatlı ve domuz eti karışımlarında Real-time PCR ile kantitatif olarak et türü tayini yaptıkları çalışmada domuz eti miktarının tespitinde varyasyon katsayısının %4,1 ile %7,6 oranında olduğunu bildirmişlerdir.

Bugünkü durumuyla et karışımlarından hazırlanmış et ürünlerinde kullandığımız ticari kitlerle et

türü oranlarını doğru ve kesin tekrarlanabilir olarak tespit etmek mümkün görülmemektedir. Kitlerle ilgili AR-GE çalışmalarının devam ettirilmesi ve bu kitlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Deneysel çalışmalarda olumlu sonuçlar alınmadığından yanlış bilgilendirme yapmamak adına piyasa ürünlerinde analizler yapılmamıştır.

Sığır eti ve kanatlı etlerinin karışımından yapılan et ürünlerinde kullanılan sığır eti ve kanatlı eti oranlarının doğru olarak tespit edilemediği ortak görüşüyle 2012 yılında revize edilen Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliğinde (Tebliğ No:2012/74) sığır etine kanatlı eti katılması yasaklanmıştır. Ancak, kanatlı etinden yapılan et ürünlerine katılan oran etiketinde bildirilmeden sadece isim verilerek sığır eti veya yağı katılabilmektedir.

Sonuç olarak sığır eti ve tavuk eti karışımlarından üretilen et ürünlerinde kullanılan sığır eti ve tavuk eti oranları bu amaçla kullanılan Real Time PCR kitleri ile doğru olarak tespit edilemediğinden et ürünlerinde yapılabilecek hileleri önlemek ve haksız rekabetin önüne geçmek amacıyla 2012 yılında yayınlanan Et ve Et Ürünleri Tebliğinde Sığır etinden yapılan et ürünlerine kanatlı eti katılması yasaklanmıştır.

Kaynaklar

1. Ayaz Y, Ayaz ND, Erol I, (2006). *Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay*. J Muscle Foods. 17, 214-220.
2. Berger RG, Mageau RP, Schwab B, Johnston RW, (1988). *Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme linked immunosorbent assays*. J AOAC Int. 71, 406-409.
3. Chikuni K, Tabata T, Kosugiyama M, Monma M, (1994). *Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats*. Meat Scie. 37, 337-345.
4. Chisholm J, Conyers C, Booth C, Lawley W, Hird H, (2005). *The detection of horse and donkey using real-time PCR*. Meat Scie. 70, 727-732.
5. Chung ER, Kim YS, Han SK, (2000). *Identification of Hawoon meat using PCR-RFLP marker of MCIR gene associated with bovine coat color*. J Animal Sci Technol. 42, 379-380.
6. Dooley JJ, Paine KE, Garrett SD, Brown HM, (2004). *Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays*. Meat Scie. 68, 431-438.
7. Ganai TAS, Sing RK, Butchiah G. (2000). *DNA amplification fingerprinting of cattle and buffalo genome by RAPD-PCR utilizing arbitrary oligonucleotide primers*. Buffalo J. 3, 331-339.

8. **Girish PS, Anjaneyulu ASR, Viswas KN, Anand M, Rajkumar N, Shivakumar BM, Et Al.**, (2004). *Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species*. Meat Sci. 66, 551-556.
9. **Guoli Z, Mingguang Z, Zhiang Z, Hongsheng O, Qiang L**, (1999). *Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef*. Meat Sci. 51, 233-236.
10. **Günşen U, Aydın A, Ovalı BB, Coşkun Y**, (2006). *Detection of Different Meat Species in Raw Meat and Cooked Meat Products Using ELISA Technique*. J Vet Fac Vet Med. Istanbul Univ. 32, 45-52.
11. **Hsieh YHP, Chen FC, Sheu SC**, (1997). *A. AES research developing simple, inexpensive tests for meat products.*, Highlights of Agricultural Research, 44(2), Summer.
12. **Hsieh YHP, Johnson MA, Wetzstein CJ, Green NR**, (1996). *Detection of species adulteration in pork products using agar gel immunodiffusion and enzyme linked immunosorbent assay*. J Food Quality. 19, 1-9.
13. **Hsieh YHP, Woodward BB, Ho SH**, (1995). *Detection of species substitution in raw and cooked meats using immunoassays*. J Food Quality. 58, 555-559.
14. **Köppel R, Ruf J, Rentsch J**, (2011). *Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep*. Eur Food Res Technol. 232, 151-155.
15. **Kremer P, Rencova E**, (2005). *Quantitative Detection of Species-Specific DNA in Feedstuffs and Fish Meal*. Journal of Food Protec. 68, 1217-1221.
16. **Lahiff S, Glennon M, Lyng J, Smith T, et al.** (2001). *Real-time Polymerase chain reaction detection of bovine DNA in meat and bone meal samples*. J Agric Food Chem. 7, 1158-1165.
17. **Lombardo F, Galli A, Bongioni G**, (2004). *Real-Time PCR Approach for Detection of Bovine DNA in Animal Feedstuffs*, Atti del 39 Simposio Internazionale di Zootecnica "Meat scie and research", 10 giugno Roma.
18. **Matsunga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya H, Shibata K, Yamada J, Et Al.** (1998). *Determination of mitochondrial cytochrome b gene sequence for red deer (Cercus elaphus) and the differentiation of closely related deer meats*. Meat Sci. 49, 379-385.
19. **Necidova L, Recencova E, Svoboda L**, (2002). *Counter immunoelectrophoresis: a simple method for detection of species specific muscle proteins in heat processed products*. Vet Med Czech. 47, 143-147.
20. **Reddy PM, Reddy VSL, Rao ZS, Murthy GK**, (2000). *Identification of origin of fresh, cooked, and decomposed meats by using brain antigens*. J Food Sci. Technol. 37, 201-203.
21. **Rencova F, Necidova L, Svoboda L**, (2000). *Identification by ELISA of poultry, horse, kangaroo, and rat muscle specific proteins in heat processed products*. Vet Med Czech. 45, 353-356.
22. **Shericar AT, Karkare UD, Khot JB, Jayarao BM, Bhilegaonkar KN**, (1993). *Studies on thermostable antigens, production of species specific antiadrenal sera and comparison of immunological techniques in meat speciation*. Meat Sci. 33, 121-136.
23. **Soares S, Amaral JS, Mafra I, Oliveira MBPP**, (2010). *Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay*. Meat Sci. 85, 531-536.
24. **Tremlova B**, (2000). *Histologischer Nachweis von Knochenpartikein in Fleischprodukten*. Fleischwirtsch. 80, 73-74.

Konya yöresindeki sığırlarda *Neospora caninum*'un yaygınlığının serolojik olarak araştırılması*

Hasan AYTEKİN, Kadir KAMBURGİL, Erol HANDEMİR, Funda ALTINÖZ

Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü

Geliş Tarihi / Received: 08.04.2010, Kabul Tarihi / Accepted: 16.06.2010

Özet: Bu çalışmada; Konya yöresindeki dişi sığırlarda *Neospora caninum*'un yaygınlığının serolojik olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Kan serum örnekleri, Ocak 2010 - Aralık 2010 tarihleri arasında farklı yaş gruplarındaki atık yapan ve yapmayan, toplam 385 inekten toplanmıştır. Kan serumlarında İndirekt Fluoresan Antikor (IFA) testi kullanılarak *N.caninum*'a karşı oluşan IgG antikorları aranmıştır. Yapılan muayenede; toplam 385 kan serumunun 34'ünde (%8.83) seropozitiflik saptanmış, bunlardan atık hikayeli 76 kan serumunun 9'u (%11.84) ve atık yapmamış 309 kan serumunun ise 25'i (%8.09) seropozitif bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: İnek, Konya, *Neospora caninum*, Seroprevalans.

Seroprevalance of *Neospora caninum* in cattle investigation in Konya

Abstract: In this study aimed to determine Konya region was detected in cows with the prevalence of *Neospora caninum*. Blood sera samples, January 2010 - December 2010 between the different age groups considered in aborted or not the total of 385 animals were collected. Blood sera Indirect Fluorescent Antibody (IFA) test using the *N.caninum* IgG antibodies were searched: 34 (8.83%) of 385 blood sera were seropositive. In the evaluation, 9 (11.84%) of aborted the 76 cows blood sera seropositive and 25 (8.09%) of 309 not aborted group blood sera were seropositive.

Key words: Cow, Konya, *Neospora caninum*, Seroprevalance.

Giriş

Neosporosis, parazit protozoon *Neospora caninum*'un neden olduğu bir hastalıktır. Sığırlarda meydana gelen atıkların önemli sebeplerinden biridir. Son konakçısı köpekler, arakonakçısı ise sığır, koyun, keçi, geyik, manda ve atlardır. Sığırlarda hastalığın tek belirtisi gebeliğin genellikle 5-7 ayları arasında görülen yavru atmadır. Ayrıca ölü ve canlı doğumlar olabilir. Canlı doğan buzağular inkoordinasyon bozukluğu, patellar refleksde azalma, ön ve arka bacaklarda gerilme, bilinç kaybı gibi belirtiler gösterebildiği gibi, klinik belirtiler göstermeksizin kronik olarak enfeksiyonu taşıyabilirler [6, 13-16, 18,40].

Sığırlara *Neospora caninum*'un bulaşması, köpekler tarafından dışkıyla çevreye saçılan ookistlerin sporlandıktan sonra oral yolla alınması ya da gebe ineklerde plasenta yoluyla yavruya geçerek olmaktadır. Köpeklere bulaşma ise kistik formları içeren enfekte dokuların alınmasıyla olur. Ayrıca

etken içeren fötüs, plasenta ve uterus atıkları da enfeksiyon kaynağıdır [13,15,16,18].

N.caninum, ilk defa 1984'de Bjerkas ve ark. [8] tarafından Norveç'te myositis ve ensefalomyelitisi köpeklerde tanımlanmış ve 1988 yılında Dubey ve ark. [12] tarafından isimlendirilmiştir. ABD'nin New Mexico eyaletinde 1987 Eylül ayında başlayan ve 5 aydan fazla süren sığır atık vakalarının incelenmesi sonucu 3 fötusta etkenin tespit edilmesi ile sığır atık fötüslerinde da ortaya konmuştur [41]. Ayrıca, sığırlarda serolojik olarak parazite spesifik antikorlar da saptanmıştır [3,10,11,19,22,24,25].

Hastalığın tanısında immunohistokimyasal teknikler, moleküler teknikler, doku kültürleri ve serolojik testler kullanılabilir. En uygun ve yaygın olarak kullanılan serolojik testler ELISA ve IFA testleridir [9,10,14,17,21,31,33,34,40].

N.caninum enfeksiyonlarına yaygın olarak rastlanıldığı; ABD'de %26.90 [19], Kanada'da %5.60 [42], Arjantin'de %39.86-43.10 [29,30],

Yazışma adresi / Correspondence: Funda Altınöz, Veteriner Kontrol Enstitüsü, Parazitoloji Laboratuvarı, Konya, Türkiye
E-posta: fundaaltoz@myynet.com

*TAGEM-HS-10-10-01-02-162 nolu Gıda Tarım ve Hayvancılık projesinden özetlenmiştir.

Brezilya'da %14.09-%34.80 [22,27], Hindistan'da %8.20 [28], Meksika'da %11.60-26.00 [20,37], Japonya'da %5.70 [25], İran'da %15.18 [38], Kosta Rika'da %43.30 [36], Senegal'de %17.90 [24] ve Yeni Zelanda'da %6.75 [35] seroprevalans oranları tespit edildiği bildirilmiştir.

Türkiye'de *N.caninum*'un varlığı ilk kez, nörolojik klinik belirtiler gösteren, 20 günlük Simental buzağının dokularından immunohistokimyasal yöntemle tespit edildiği 2009 yılında Kul ve ark. [26] tarafından bildirilmiştir. Serolojik çalışmada ise [1-3, 5,7,23,32,39,43], sığır neosporosisinin seroprevalansı Türkiye'de %2.00-32.72 aralığında belirtilmiştir. Buna göre neosporosis, Doğu Anadolu Bölgesinde Bingöl'de %4.69, Elazığ'da %15.00, Malatya'da %4.00 ve Muş'ta %4.86 [3], Erzurum'da %10.65 [5], İç Anadolu Bölgesinde Ankara'da %10.15, Çankırı'da %6.93, Nevşehir'de %5.10, Kırşehir'de %19.55, Kırıkkale'de %32.72, Eskişehir'de %5.43, Yozgat'ta %20.32 [43] ve Kayseri'de %7.00-%10.82 [23,43] olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, Şanlıurfa yöresinde %7.50 [39], Sakarya yöresinde %9.20 [32], Trakya'da %8.02 [7] ve Kars yöresinde %2.00 [1] oranlarında neosporosis yaygınlığı saptanmıştır.

Bu çalışma ile Konya yöresindeki dişi sığırlarda *N.caninum*'un yaygınlığı serolojik olarak IFA testi kullanılarak belirlenmiştir.

Materyal ve Metot

Bu araştırma; Ocak 2010-Aralık 2010 tarihleri arasında Konya merkez ilçeler ile Akşehir, Altınekin, Çumra, Seydişehir, Ilgın, Kadınhanı, Sarayönü, Bozkır, Karapınar ve Ereğli İlçelerinde tesadüfen belirlenen ineklerden alınan toplam 385 kan örneği üzerinde yapıldı. İneklere ilişkin ırk, yaş ve atık bilgileri kaydedildi. İneklerden alınan kan örnekleri 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumlar ayrıldı ve endorf tüplerine konularak test edilinceye kadar -20°C'de muhafaza edildi. Daha sonra IFA testi ile test edildi.

Örnek büyüklüğü, %95 güven aralığında tahmini prevalansın %10 ve azami kesinliğin %3 olduğu düşünülerek hesaplandı. Bu çalışmada, atık yapan ve yapmayan inekler ile yaşlı ve genç olanlar değerlendirmede dikkate alındı.

Antijen: Antijen kaplı lamalar VMRD Inc, Pulman, USA (No: 210-88-12-NC)'dan temin edildi.

Konjugat: Konjugat olarak FITC Conjugated anti-bovine IgG (Sigma No: F-7887) kullanıldı. Konjugat 1/10'dan başlayarak 1/640'a kadar PBS ile sulandırıldı. Pozitif ve Negatif kontrol serumları ile yapılan işlemlerde, negatif kontrol serumlarının tamamı fluoresan vermediği halde pozitif kontrol serumlarının hepsinin fluoresan verdiği gözlemlendi. En iyi fluoresan 1/40 konjugat dilasyonunda görüldü.

Pozitif Kontrol Serum: Pozitif kontrol serum VMRD Inc, Pulman, USA (No: 211-P-NC-BOV)'dan temin edildi.

Negatif Kontrol Serum: Negatif kontrol serum VMRD Inc, Pulman, USA (No: 211-N-NC-BOV)'dan temin edildi.

PBS: Sigma, P-4417, pH 7.4

Testin uygulanması: Bu çalışmada serum sulandırma için eşik değer 1/200 kabul edilerek serum muayeneleri yapıldı. Serumlar 1 gün önceden derin dondurucudan buzdolabı (4°C)'na konuldu. Antijen kaplı lamaların birer gözlerine pozitif kontrol serum ve negatif kontrol serum, diğer gözlerine ise şüpheli serumların 1/200 dilüsyonlarından 10'ar µl damlatıldı. Bu lamalar, nemli bir küvetin içine konulduktan sonra 37°C'lik etüvde 30 dakika inkübe edildi, sonra PBS ile 5'er dakika süreyle üç kez yıkandı ve oda sıcaklığında havada kurutuldu. Kuruyan lamaların üzerine 1/40 oranında PBS ile sulandırılan konjugattan 10'ar µl ilave edildi ve aynı şekilde nemli bir küvet içinde 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Etüvden çıkarılan preparatlar PBS ile 5'er dakika süreyle üç kez yıkandı. Kurumadan, üzeri 1 kısım PBS ile 9 kısım gliserin karışımından oluşan kaplama solüsyonu ile kaplandı ve lamel kapatılarak fluoresan mikroskopun X40 (Olympus B H) objektifinde incelendi. Pozitif ve negatif kontrol serumlar dikkate alınarak, muayenesi yapılan serumlardan karanlık sahada fluoresan verenler pozitif olarak değerlendirildi [10,29].

Sonuçlara ilişkin istatistiksel hesaplamalar khi kare (χ^2) testi ile yapıldı.

Bulgular

Bu çalışmada, Konya yöresinde toplam 385 ineğin 34'ünde *N.caninum*'a spesifik IgG antikorları saptanmış olup, seroprevalans %8.83 olarak bulunmuştur. Seroprevalansın ilçelere göre durumu Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Sığırlarda *N.caninum* Seroprevalansının İlçelere Göre Dağılımı

İlçeler	Sığır Adedi	Seropozitivite	
		Adet	(%)
Akşehir	30	0	0.00
Altınekin	35	3	8.57
Bozkır	29	2	6.89
Çumra	30	2	6.66
Ereğli	30	4	13.33
İlgın	30	0	0.00
Kadınhanı	30	7	23.33
Karapınar	30	2	6.66
Karatay	29	6	20.68
Meram	30	4	13.33
Sarayönü	30	2	6.66
Selçuklu	22	0	0.00
Seydişehir	30	2	6.66
Toplam	385	34	8.83

Tablo 1'e göre, *N.caninum*'un seroprevalansı Altınekin'de %8.57, Bozkır'da %6.89, Çumra'da %6.66, Ereğli'de %13.33, Kadınhanı'nda % 23.33, Karapınar'da %6.66, Karatay'da %20.68, Meram'da %13.33, Sarayönü'nde %6.66 ve Seydişehir'de %6.66 düzeyinde bulunmuştur. Akşehir, İlgın ve Selçuklu'dan alınan örneklerin hiçbirinde antikor tespit edilememiştir.

Konya yöresinde atık yapan ve yapmayan sığırlarda *N.caninum*'un seroprevalansı Tablo 2'de verilmiştir. Buna göre, *N.caninum*'un seroprevalansı atık yapan sığırlarda %11.84 ve atık yapmayan sığırlarda %8.09 olarak saptanmıştır. İki grup arasındaki fark istatistiksel bakımdan önemsizdir ($p>0.05$).

Tablo 2. Atık yapan ve yapmayan sığırlarda *N.caninum* seroprevalansı

Grup	Sığır Adedi	Seropozitivite	
		Adet	(%)
Atık Yapan	76	9	11.84
Atık Yapmayan	309	25	8.09
Toplam	385	34	8.83

Konya yöresinde sığırlarda *N.caninum*'un yaş gruplarına göre seroprevalansı Tablo 3'de verilmiştir. Tablo 3'de belirtildiği gibi seroprevalans < 3 yaş grubunda %10.00, 4-5 yaş grubunda %9.83 ve > 6 yaş grubunda %6.19 olarak tespit edilmiştir. Yaş grupları arasındaki fark istatistiksel bakımdan önemsizdir ($p>0.05$).

Tablo 3. Sığırlarda *N.caninum* seroprevalansının yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş	Sığır Adedi	Seropozitivite	
		Adet	(%)
<3	150	15	10.00
3-6	122	12	9.83
>6	113	7	6.19
Toplam	385	34	8.83

Konya yöresinde sığırların ırklarına göre *N.caninum*'un seroprevalansı Tablo 4'de verilmiştir. Buna göre; Holstein sığırlarda %8.45, Montofon sığırlarda %10.20 ve Simental sığırlarda %6.66 seroprevalans belirlenmiştir. Sığır ırkları arasındaki fark istatistiksel bakımdan önemsizdir ($p>0.05$).

Tablo 4. Sığırlarda *N.caninum* seroprevalansının ırklara göre dağılımı

İrk	Sığır Adedi	Seropozitivite	
		Adet	(%)
Holstein	272	23	8.45
Montofon	98	10	10.20
Simental	15	1	6.66
Toplam	385	34	8.83

Tartışma ve Sonuç

Dünya üzerinde geniş bir coğrafyada varlığı bilinen *N.caninum*'un değişik ülkelerdeki sığırlarda seroprevalans değerleri %5.60-43.30 [19,22,24,25, 27-30, 35-38] arasında olup, Türkiye'de ise %2.00-32.72 [1-3, 5,7,23,32,39,43] arasında değişmektedir. Neosporosis seroprevalansı; Bingöl'de %4.69, Elazığ'da %15.00, Malatya'da %4.00, Muş'ta %4.86 [3], Erzurum'da %10.65 [5], Ankara'da %10.15, Çankırı'da %6.93, Nevşehir'de %5.10, Kırşehir'de %19.55, Kırıkkale'de %32.72, Eskişehir'de %5.43, Yozgat'ta %20.32 [43], Kayseri'de %7.00-10.82 [23,43], Şanlıurfa %7.50 [39], Sakarya %9.20 [32],

Trakya'da %8.02 [7] ve Kars'ta %2.00 [1] oranlarında bildirilmiştir. Bu çalışmada, Konya yöresindeki sığırlarda *N.caninum* seroprevalansı %8.83 olarak bulunmuştur. Bu sonuç, dünyanın değişik ülkelerinde ve Türkiye'de saptanan seroprevalans değerleri içerisinde olup özellikle Ankara, Şanlıurfa, Kayseri, Sakarya, Erzurum ve Trakya'da saptanan seroprevalans değerleri ile uygunluk göstermektedir.

Campero ve ark. [8] atık fütüslerin %7.30'ünde, Anderson ve ark. [4] ise %45.50'sinde etkenin saptandığını, *N.caninum*'un sığırlarda önemli atık sebebi olduğunu bildirmişlerdir. Davison ve ark. [11] ise, seropozitif sığırların seronegatif sığırlara göre yavru atma riskinin, 3.5 kat daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Atık yapan ve yapmayan gruplar arasındaki seroprevalans farkın, önemli olduğu bildirimlerinin [5,23,28,37,43] aksine, Sadrebazaz ve ark. [38] ile Aktaş ve ark. [3] her iki grup arasındaki farkın önemli olmadığını ifade etmektedirler. Bu çalışmada; *N.caninum* seroprevalansı atık yapan grupta %11.84, atık yapmayan grupta ise %8.09 oranlarında saptanmış, ancak iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Bu sonuç, Sadrebazaz ve ark. [38] ile Aktaş ve ark. [3]'ün görüşlerini desteklemektedir.

Sığır yaşlarının *N.caninum* seroprevalansı üzerine etkileri konusunda değişik görüşler vardır. Bazı araştırmacılar [5,24,28,29,37] seroprevalans olgularının yaş grupları arasında önemli olduğunu, bazıları [23,25,38,43] ise önemli olmadığını ifade etmektedirler. Bu çalışmada yaş grupları ile seroprevalans değerlerinin arasındaki fark önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$).

Yapılan bazı çalışmalarda [3,38,39], sığır ırkları ile seroprevalans sonuçları arasındaki farkın önemli olmadığı belirtilmiştir. Bu çalışmada da, sığır ırkları ile seroprevalans değerleri arasında önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Sonuç olarak, Konya yöresinde atık yapan ve yapmayan sığırlarda *N.caninum* varlığı, serolojik olarak tespit edilmiştir. *N.caninum* yaygınlığının koruyucu hekimlik açısından da önemi dikkate alındığında, sonraki araştırmacılar için bu durumun etken izolasyonu yapılarak desteklenmesi önerilebilir. Ayrıca, sığırcılık işletmelerinde ve özellikle damızlık sığır işletmelerinde anne ve yavru sağlığı açısından *N.caninum*'un da etkili bir hastalık ajanı olduğu dikkate alınmalı ve yetiştiriciler bu konuda eğitilmelidir.

Kaynaklar

1. Akça A, Gökçe H, (2003). Kars yöresi yerli ve kültür ırkı ithal sığırlarında *Neospora caninum*'un seroprevalansı. XIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 8-12 Eylül, Konya-Türkiye.
2. Akça A, Gokce, HI, Guy CS, McGarry JW, Williams DJ, (2005). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in local and imported cattle breeds in the Kars province of Turkey. Res Vet Sci. 78, 123-126.
3. Aktaş M, Şaki CE, Altay SŞ, Ütük AE, Köroğlu E, Dumanlı N, (2005). Doğu Anadolu Bölgesinin bazı illerinde bulunan sığırlarda *Neospora caninum*'un araştırılması. T Parazitol Derg. 29, 22-25.
4. Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, Picanso JP, Blanchard PC, Breitmeyer RE, Layton AW, McAllister M, Daft B, Kinde H, Read DH, Dubey JP, Conrad PA, Barr BC, (1995). Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. J Am Vet Med Assoc. 207, 1206-1210.
5. Balkaya I, Bastem Z, Avcioglu H, Onalan SK, (2012). Seroprevalance of *Neospora caninum* antibodies in cattle in Eastern Turkey. Isr J Vet Med. 67, 109-112.
6. Barr BC, Conrad PA, Dubey JP, Anderson ML, (1991). *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, immunoreactivity. J Vet Diagn Invest. 3, 39-46.
7. Bıykoğlu G, Öncel T, Bağcı Ö, (2003). Trakya sığırlarında *Neospora caninum* seroprevalansı. XIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 8-12 Eylül, Konya-Türkiye.
8. Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J, (1984). Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z Parasitenkd. 70, 271-274.
9. Campero CM, Moore DP, Odeón AC, Cipolla AL, Odriozola E, (2003). Aetiology of bovine abortion in Argentina. Vet Res Commun. 27, 359-369.
10. Conrad PA, Sverlow K, Anderson M, Rowe J, BonDurant R, Tuter G, Breitmeyer R, Palmer C, Thurmond M, Ardans A, Dubey JP, Duhamel G, Barr B, (1993). Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. J Vet Diagn Invest. 5, 572-578.
11. Davison HC, Otter A, Trees AJ, (1999). Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. Int J Parasitol. 29, 1189-94.
12. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A, (1988). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. J Am Vet Med Assoc. 192, 1269-1285.
13. Dubey JP, Lindsay DS, (1996). A review of *Neospora caninum* and neosporosis. Vet Parasitol. 67, 1-59.
14. Dubey JP, Lindsay DS, Adams DS, Gay JM, Baszler TV, Blagburn BL, Thulliez P, (1996). Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. Am J Vet Res. 57, 329-336.
15. Dubey JP, (1999). Recent advances in *Neospora* and neosporosis. Vet Parasitol. 84, 49-367.

16. Dubey JP, (2003). *Review of Neospora caninum and neosporosis in animals*. The Korean J Parasitol. 41, 1-16.
17. Dubey JP, Schares G, (2006). *Diagnosis of bovine neosporosis*. Vet Parasitol. 140, 1-34.
18. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM, (2007). *Epidemiology and Control of Neosporosis and Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev. 20, 323-367.
19. Dyer RM, Jenkins MC, Kwok OC, Douglas LW, Dubey JP, (2000). *Serologic survey of Neospora caninum infection in a closed dairy cattle herd in Maryland: risk of serologic reactivity by production groups*. Vet Parasitol. 90, 171-181.
20. Garcia-Vazquez Z, Rosario-Cruz R, Mejia-Estrada F, Rodriguez-Vivas I, Romero-Salas D, Fernandez-Ruvalcaba M, Cruz-Vazquez C, (2009). *Seroprevalence of Neospora caninum antibodies in beef cattle in three southern states of Mexico*. Trop Anim Health Prod. 41, 749-53.
21. Ghalmi F, China B, Losson B, (2007). *Diagnostic et surveillance epidemiologique de Neospora caninum*. Ann Med Vet. 151, 123-149.
22. Gondim LFPI, Sartor F, Hasegawa M, Yamane I, (1999). *Seroprevalence of Neospora caninum in dairy cattle in Bahia, Brazil*. Vet Parasitol. 86, 71-75.
23. İca A, Yıldırım A, Düzlü Ö, İnci A, (2006). *Kayseri yöresinde sığırlarda Neospora caninum'un seroprevalansı*. T Parazitoloj Derg. 30, 92-94.
24. Kamga-Waladjo AR, Gbati OB, Kone P, Lapo RA, Chatagnon G, Bakou SN, Pangui LJ, Diop Pel H, Akakpo JA, Tainturier D, (2010). *Seroprevalence of Neospora caninum antibodies and its consequences for reproductive parameters in dairy cows from Dakar-Senegal, West Africa*. Trop Anim Health Prod. 42, 953-959.
25. Koiwai M, Hamaoka T, Haritani M, Shimizu S, Zeniya Y, Eto M, Yokoyama R, Tsutsui T, Kimura K, Yamane I, (2006). *Nationwide seroprevalence of Neospora caninum among dairy cattle in Japan*. Vet Parasitol. 135, 175-179.
26. Kul O, Kabakci N, Yildiz K, Ocal N, Kalender H, İlkme NA, (2009). *Neospora caninum associated with epidemic abortions in dairy cattle: The first clinical neosporosis report in Turkey*. Vet Parasitol. 159, 69-72.
27. Locatelli-Dittrich R, Soccol VT, Richartz RR, Gasino-Joineau ME, Vinne R, Pinckney RD, (2001). *Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil*. J Parasitol. 87, 1493-1494.
28. Meenakshi, KS, Sandhu MS, Ball H Kumar, S Sharma, PK Sidhu, C Sreekumar, Dubey JP, (2007). *Seroprevalence of Neospora caninum antibodies in cattle and water buffaloes in India*. J Parasitol. 93, 1374-1377.
29. Moore DP, Campero CM, Odeon AC, Posso MA, Cano D, Leunda MR, Basso W, Venturini MC, Spath E, (2002). *Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of Neospora caninum in Argentina*. Vet Parasitol. 2002, 303-316.
30. Moore DP, Pérez A, Agliano S, Brace M, Cantón G, Cano D, Leunda MR, Odeón AC, Odriozola E, Campero CM, (2009). *Risk factors associated with Neospora caninum infections in cattle in Argentina*. Vet Parasitol. 161, 121-125.
31. Ortega-Mora LM, Fernández-García A, Gómez-Bautista M, (2006). *Diagnosis of bovine neosporosis: recent advances and perspectives*. Acta Parasitol. 51, 1-14.
32. Öncel T, Bıyıkoğlu G, (2003). *Sakarya yöresi süt sığırlarında Neosporosis caninum*. Uludağ Univ J Fac Vet Med. 22, 87-89.
33. Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA, Loomis EF, Rowe JD, Anderson ML, Marsh AE, Cray C, Barr BC, (1998). *A Modified Agglutination Test for Neospora caninum: Development, Optimization, and Comparison to the Indirect Fluorescent-Antibody Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Clin Diagn Lab Immunol. 5, 467-473.
34. Razmi GR, Maleki M, Farzaneh N, Talebkhan Garoussi M, Fallah AH, (2007). *First report of Neospora caninum-associated bovine abortion in Mashhad area, Iran*. Parasitol Res. 100, 755-757.
35. Reichel MP, (1998). *Prevalence of Neospora antibodies in New Zealand dairy cattle and dogs*. New Zealand Vet J. 46, 38.
36. Romero JJ, Breda SV, Vargas B, Dolz G, Frankena K, (2005). *Effect of neosporosis on productive and reproductive performance of dairy cattle in Costa Rica*. Theriogenology. 64, 1928-1939.
37. Romero-Salas D, Garcia-Vazquez, Z, Montiel-Palacios F, Montiel-Pena T, Aguilar-Dominguez M, Medina-Esparza L, Cruz-Vazquez C, (2010). *Seroprevalence of Neospora caninum Antibodies in Cattle in Veracruz, Mexico*. J Anim Vet Adv. 9, 1445-1451.
38. Sadrebazzaz A, Haddadzadeh H, Esmailnia K, Habib IG, Vojgani M, Hashemifesharaki R, (2004). *Serological prevalence of Neospora caninum in healthy and aborted dairy cattle in Mashhad, Iran*. Vet Parasitol. 124, 201-204.
39. Sevgili M, Altaş MG, (2006). *Seroprevalence of Neospora caninum in cattle in the province of Şanlıurfa*. Turk J Vet Anim Sci. 29, 127-130.
40. Sevgili M, Altaş MG, (2006). *Sığırlarda neosporosis*. F Ü Sağ Bil Derg. 20, 79-83.
41. Thilsted JP, Dubey JP, (1989). *Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle*. J Vet Diagn Invest. 1, 205-209.
42. Van Leeuwen JA, Forsythe L, Tiwari A, Chartier R, (2005). *Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum in dairy cattle in Saskatchewan*. Can Vet J. 46, 56-58.
43. Vural G, Aksoy E, Bozkir M, Kuçukayan U, Ertürk A, (2003). *Seroprevalence of Neospora caninum in dairy cattle herds in Central Anatolia, Turkey*. Vet Arhiv. 76, 343-349.

Samsun ve çevresinde atık su ve kanalizasyon çıkışlarında yetişen midyelerde Hepatitis A virüsü prevalansı

Gökhan İNAT¹, Ahmet KOLUMAN²

¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Kurupelit, Samsun

² Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı, Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 18.09.2013, Kabul Tarihi / Accepted: 23.12.2013

Özet: Hepatitis A Virüsü (HAV) kontamine su, taze ürünler ve su ürünlerinden kaynaklanan akut hepatit ile seyreden bir enfeksiyona neden olmaktadır. Avrupa Birliği (AB) ve diğer sosyal refahı yüksek, temiz suya ulaşımı kolayca sağlayan, gelişmiş ülkelerde seropozitiflik oranı %5-10 seviyesinde bildirilmektedir. Buna karşılık refah seviyesi ve sosyo ekonomik güç düştükçe seropozitiflik oranının %95'e kadar çıktığı bildirilmektedir. Midye ve diğer filtrasyonla beslenen su ürünleri HAV kontaminasyonu yönünden önemli bir kaynak olarak bildirilmektedir. Bu çalışmada, Şubat-Mayıs 2012 tarihleri arasında; Samsun ili merkezi ile Alaçam, Engiz, 19 Mayıs ve Canik ilçelerinde, özellikle bölge arıtma ve lağım sularının denize döküldüğü bölgeler seçilerek toplanan 60 adet midye materyal olarak kullanıldı. Midyelerin her biri steril poşetlere konularak soğuk zincir altında laboratuara gönderildi ve laboratuara geldiği gün içerisinde analiz edildi. Analiz amacıyla öncelikle numunenin hazırlanması takiben proses kontrol virusu (Mengo Virus) ile kontaminasyon, elüsyon, konsantrasyon, RNA ekstraksiyonu, viral RNA'nın Real Time PCR ile tespiti ve sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması gerçekleştirilmiştir. Analiz işlemlerinin her bir aşamasında farklı yazarlar tarafından bildirilen yöntemler kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre toplam 60 midye örneğinin 5 tanesinde (%8,33) HAV kontaminasyonu saptanmıştır. Örneklerin alındığı bölgelere göre HAV dağılımı şu şekildedir; Merkez ve Alaçam'dan alınan 12 örneğin 2'sinde (%16,66) ve Canik ilçesinden alınan 12 örneğin 1'inde (%8,33) tespit edilmiştir. Endüstriyel ve evsel atıklardan kaynaklanan çevre ve kıyı kirlenmesi doğrudan insan sağlığını tehdit etmektedir. Aynı zamanda midye gibi deniz kabuklularının tüketimine bağlı olarak insanlarda HAV enfeksiyonları gelişebilmektedir.

Anahtar kelimeler: Hepatitis A virüsü, Mengo Virüs, Midye, Real Time PZR.

The prevalence of Hepatitis A virus in mussels rearing live in outfalls of wastewater and sewers in Samsun province

Summary: Virus Hepatitis A (HAV) is widespread in contaminated water, fresh products and water products and cause an infection prosecuting with acute hepatitis. It is announced that seropositivity is 5-10% in European Union (EU) and other socially high affluent, easily reaching clean water, developed countries. However, it is declared that as affluence level and socio-economic power decrease seropositivity increases up to 95%. It is noted that mussel and other water products feed by filtration are important source for HAV contamination. In this study over the period February-March 2012, 60 mussels are used as a material collected from places where district refining and underground sewer flow into the sea in Samsun, Alaçam, Engiz, 19 Mayıs and Canik. Mussels were transferred to laboratory in sterilized bags under cold chain and analysed in the same day. For the purpose of analysis, contamination with process control virus (Virus Mengo), elusion, concentration, RNA extraction, viral RNA detection with Real Time PCR and assesment of results and interpretation are done. Methods noted by different authors are used in the steps of the analysis. According to the results of the study, 5 mussels (8,33%) are found to be contaminated with HAV. HAV distribution according to the regions where samples are collected is as follows; 2 (16,66%) of 12 samples from Centrum and Alaçam and 1 (8,33%) of 12 samples from Canik are identified. Enviromental and coastal contamination caused by industrial and domestic waste impends human health directly. Also, there could be an infection on people depending on the accumulation on water products taking nourishment by filtration such as mussel, after mussel consumption.

Key words: Mussel, Real Time PCR, Virus Hepatitis A, Virus Mengo.

Giriş

Hepatit A Virüsü (HAV) Picornaviridea ailesi, Hepatovirüs genusu içinde yer alır. HAV, bu genusun tek üyesidir. Hepatit A'nın tanımlanan en az 20 genotipi olmasına rağmen, sadece bir serotipi vardır. Tanımlanan 20 kadar suştan dördü (I, II, III, VII) insanlarda hastalık yapabilmektedir. Hepatitis A Virüsü (HAV) kontamine su, taze ürünler ve su ürünlerinden kaynaklanan akut hepatit ile seyreden bir enfeksiyona neden olmaktadır [8].

Her ne kadar birincil bulaş yolu insandan insana olsa da özellikle gelişmekte olan ülkelerde kanalizasyon sistemlerinin yeterince düzenli olmaması ve su temininin uygun şekilde yapılamaması; besinler ve su yolu ile bulaşmayı ön plana çıkarmaktadır. Kontamine su, pişmemiş yiyecekler veya piştikten sonra temas edilen yiyecekler kontaminasyon kaynağıdır [17]. Çiğ ya da az pişmiş kabuklu deniz ürünlerinin tüketimi enfeksiyon geçişinde önemli bir yoldur. Avrupa Birliği (AB) ve diğer sosyal refahı yüksek, temiz suya ulaşımı kolayca sağlayan, gelişmiş ülkelerde seropozitiflik oranı %5-10 seviyesinde bildirilmektedir. Buna karşılık refah seviyesi ve sosyo ekonomik güç düştükçe seropozitiflik oranının %95'e kadar çıktığı bildirilmektedir. Midye ve diğer filtrasyonla beslenen su ürünleri HAV kontaminasyonu yönünden önemli bir kaynak olarak bildirilmektedir [12, 10].

Bu çalışma ile Samsun merkez ve çevre ilçelerde özellikle atık su ve kanalizasyon çıkışlarında yetişen ve toplanan, ve bölgede oldukça yaygın olarak tüketilen midyelerde HAV tespiti, yaygınlığı ve dağılımının moleküler analizler ile ortaya konulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada, Şubat-Mayıs 2012 tarihleri arasında; Samsun ili merkezi ile Alaçam, Engiz, 19 Mayıs ve Canik ilçelerinde, özellikle bölge arıtma ve lağım sularının denize döküldüğü bölgeler seçilerek toplanan 60 adet midye materyal olarak kullanıldı. Midyelerin her biri steril poşetlere konularak soğuk zincir altında laboratuara gönderildi ve laboratuara geldiği gün içerisinde analiz edildi.

Analiz amacıyla öncelikle numunenin hazırlanmasını takiben proses kontrol virusu (Mengo Virus) ile kontaminasyon, elüsyon, konsantrasyon, RNA ekstraksiyonu, viral RNA'nın Real Time PCR

ile tespiti, sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması gerçekleştirildi. Farklı aşamalardan oluşan analiz işlemlerinin her bir aşamasında farklı yazarlar tarafından bildirilen yöntemler kullanıldı [7,16,14].

Numune Hazırlama: Analize alınmaya uygun şekilde gelen numuneler HAV analizi için hazırlandı. Aseptik koşullarda mevcut numuneyi temsil edecek şekilde 25 gr numune tartılarak steril petri kaplarına alındı.

Kontrol Virusunu ile numunenin kontaminasyonu: Ceeram mengo@ceeramTools kitinin kullanma talimatına göre numune kontrol virusu ile kontamine edildi. Bu amaçla uygun miktarlarda kontrol virusu kullanılır. İlgili kitin kullanma talimatında stok virusun 3 kez den fazla dondurulup çözülmemesi tavsiye edildiğinden stok virus 2 numune için 20 µl olacak şekilde 0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine taksim edilerek -80°C'ye kaldırıldı. Bir numune için 0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpündeki 10 µl kontrol virusunun üzerine 90 µl steril ultrapure su eklenerek vortekste homojenize edildikten sonra kısa süreli santrifüj edildi. Laminar flow kabinde steril petride bulunan numunenin üzerine 10-100 µl'lik otomatik pipet kullanılarak damlalar halinde verildi ve kurumaya bırakıldı.(yaklaşık 1.5-2 saat) Daha sonra midye 250 ml'lik bir behere steril pens kullanılarak alındı ve buzdolabına kaldırılarak 1 gece buzdolabında bırakıldı (tam kurumanın sağlanması ve stabilizasyon için).

Elüsyon: Bir gece buzdolabında beklemiş PKV ile kontamine edilen numune buzdolabından çıkarılarak oda sıcaklığında 20 dakika bırakıldı. Bunun üzerine laminar kabin içinde oda ısısına getirilmiş Glisin-saline tamponundan 75 ml mezürle ölçülerek eklendi ve 5 dk bu şekilde bırakıldı. Daha sonra 100-1000 µl'lik otomatik pipet ve steril bir pens kullanılarak her midyenin iki yüzü de yukarıdan aşağıya zikzak yapılarak 20 şer kez olmak kaydı ile beher içinde bulunan tampon ile yıkandı. Yıkanan midye petri kabına alınarak diğerleri ile karışması engellendi. Bütün midye tampon ile yıkandıktan sonra beherdeki elüsyon tamponu 2 adet 50 ml'lik santrifüj tüpüne eşit miktarda aktararak soğutmalı santrifüjde +4°C'de 10000Xg de 30 dk. santrifüj edildi. Santrifüj bitiminde süpernatant dikkatli bir şekilde 100 ml'lik bir behere alınarak pH'sı 7.2±0.5 e ayarlandı (Numunenin pH sına göre bu işlem 1N HCl veya 1N NaOH ile yapılır).



Şekil 1. Samsun ili siyasi haritası.

Konsantrasyon: Bu işlem için PEG 6000 (Polyethylen Glycol) kullanıldı. Bir önceki aşamada pH'sı $7,2 \pm 0,5$ e ayarlanmış olan süpernatantın içerisine son konsantrasyon %10 PEG 6000+0,3M NaCl olacak şekilde (60 ml süpernatant için 6 gr PEG + 1.1 gr NaCl) daha önceden tartılmış kimyasal maddeler ve steril manyetik balık eklendi. PEG eriyinceye kadar oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda bırakıldı (yaklaşık 15 dakika). Daha sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de manyetik karıştırıcıda orta hızda 4 saat bırakıldı. Bu sürenin sonunda 50 ml'lik santrifüj tüplerine eşit miktarda paylaştırılan karışım $+4^{\circ}\text{C}$ 'de $10000 \times g$ 'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant dikkatli bir şekilde kendine ait behere aktarıldı ancak tüpün dibinde bir miktar kalması sağlandı. Bu kalan süpernatant ile 100-1000 μl 'lik otomatik pipet kullanılarak pelet homojenize edildi ve "konsantre homojenizat" olarak adlandırıldı. Bu konsantre homojenizat 1.5 ml'lik 2 mikrosantrifüj tüpüne alındı (Her mikrosantrifüj tüpünde yaklaşık 1 ml olacak şekilde).



Şekil 2. Analiz için hazırlanan Midye örnekleri.

Ekstraksiyon: Viral nükleik asidin ekstraksiyonu 2 aşamada gerçekleştirildi.

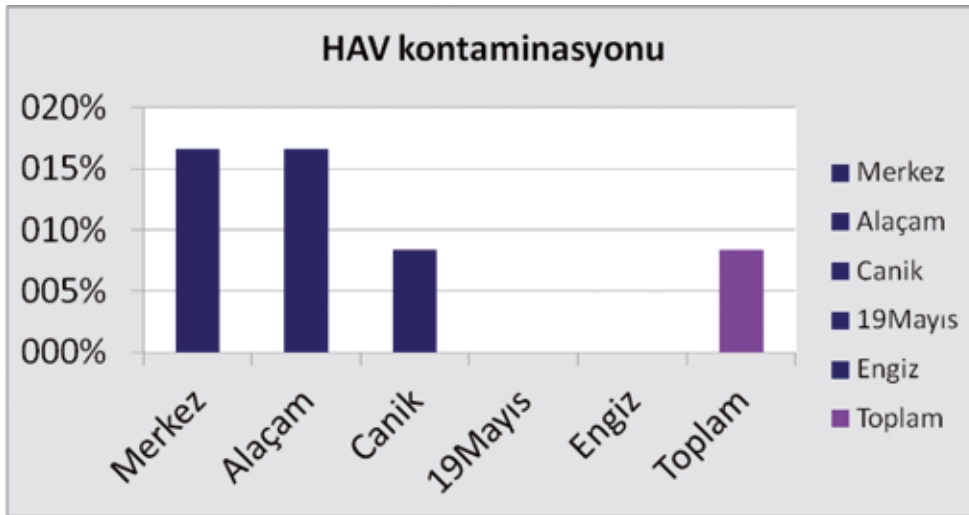
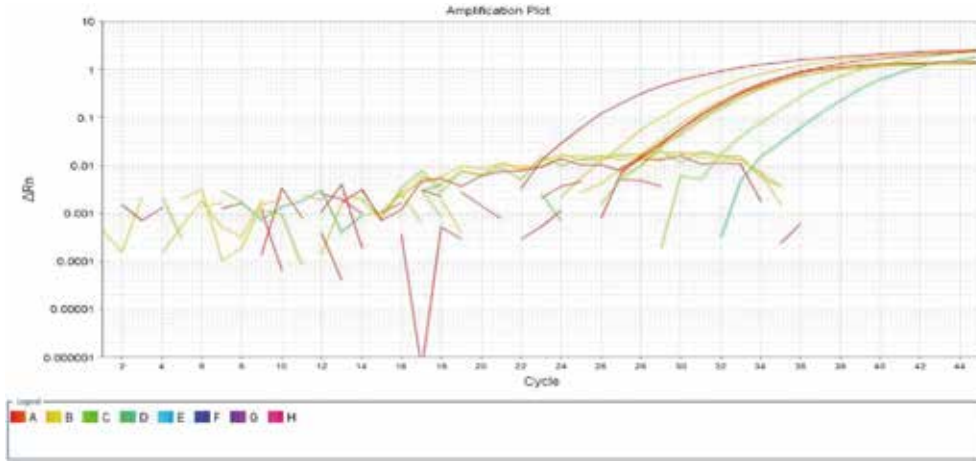
1. Lizis ve faz ayırımının yapılması
2. RNA'nın kolona bağlanması, yıkama ve RNA elüsyonu

Viral RNA'nın tespiti: Bu amaçla Real Time PCR (RT-PCR) kullanıldı. Hem numunede bulunup bulunmadığı araştırılan HAV için hem de PKV olarak kullanılan Mengovirus için 2 ayrı kit kullanılarak aynı pleytte iki reaksiyon beraber yürütüldü. Bu reaksiyonlar için mastermix hazırlanmadan önce ABI 7500 Real Time PCR cihazının reaksiyonlar için özgül ayarları yapılarak zaman kaybı önlenmiş olur. Bunun için cihaz ve cihaza bağlı bilgisayar açıldıktan sonra aşağıdaki işlemler sırasıyla yapıldı.

	1.Basamak	2.Basamak	3.Basamak	
	1 kez	1 kez	45 döngü	
Zaman	10 dakika	10 dakika	15 saniye	45 saniye
Isı	45°C	95°C	95°C	60°C

HEDEF	HAV	IPC	SONUÇ
Floresan	FAM-MGB	VIC-TAMRA	
	+	+/-	Hepatitis A pozitif
	-	+	Hepatitis A negatif
	-	-	Ekstraksiyon tekrar edilir veya numune RNA'sı 1/10 dilüe edildikten sonra reaksiyon tekrarlanır

Bulgular



Çalışmanın sonuçlarına göre toplam 60 midye örneğinin 5 tanesinde (%8,33) HAV kontaminasyonu saptanmıştır. Örneklerin alındığı bölgelere göre HAV dağılımı şu şekildedir; Merkez ve Alaçam'dan alınan 12'şer örneğin 2'sinde (%16,66) ve Canik ilçesinden alınan 12 örneğin 1'inde (%8,33) HAV tespit edilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Kabuklu deniz ürünleri ile bağlantılı viral hastalıklara neden olan patojenlerin tespiti halk sağlığı için potansiyel tehlikeyi belirlemede birincil öneme sahiptir. Kabuklu deniz ürünleri özellikle de midyelerde viral RNA tespiti için yapılan analizlerde çeşitli yöntemlerin kullanımı daha önce rapor edilmiştir [11,1,5,18]. Yapılan birçok çalışma göstermiştir ki,

midyelerde viral patojenlerin tespiti için en başarılı yol PCR analizleridir. Bununla birlikte midyelerden HAV tespitinde RT-PCR kullanımının analizlerde duyarlılığın artmasına neden olduğu ve düşük yoğunluktaki viral patojenlerin tespitini kolaylaştırdığı bildirilmiştir [7,13,20].

Çalışmamızda 60 midye örneğinde viral RNA'nın RT-PCR ile tespiti yapılmış ve (%8,3)'lük bir prevalans saptanmıştır. Tablo 1'de, seçilmiş bölgelerde yapılan çalışmalarda pozitif HAV oranında farklı sonuçlar ortaya çıktığı görülmektedir. Bu çalışma bulguları, söz konusu bölgeden toplanan midye örneklerindeki HAV kontaminasyonunun düşük düzeylerde olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, Karadeniz bölgesinin nispeten daha az nüfus yoğunluğuna sahip olması ve dolayısıyla deniz kirliliğinin daha az olması ile ilişkilendirilebilir. Lee

ve arkadaşlarının (1999), kirliliği bilinen ve nüfus yoğunluğu fazla olan bir bölgede yaptıkları çalışmada buldukları %5,5'lik oran, numunelerin büyük

kısımının marketlerden toplanması ve duyarlılığı düşük yöntemlerin kullanılması bu düşük pozitifliği açıklayabilir.

Tablo 1. Bazı Seçilmiş Bölgelerde yapılan çalışmalarda PCR ile Analize Alınan Deniz Kabukluları ve Midyelerde Pozitif HAV Dağılımı.

Lokalizasyon	Örnek sayısı	Örnek	Metot	Pozitif HAV	Kaynak
Güney İtalya	180	Midye	RT-PCR	67 (%37.2)	[6]
İtalya	118	Deniz kabuklusu	RT-PCR	17 (%14.4)	[21]
İtalya, Yunanistan ve İspanya	290	Midye	RT-PCR	53 (%18.2)	[3]
Hong Kong	150	Midye	PCR	(%5.5)	[9]
Portekiz	2000	Deniz kabuklusu	PCR	%33	[15]
İspanya	164	Midye ve istiridye	RT-PCR	%27.4	[19]
Amerika	31	Deniz kabuklusu	RT-PCR	18 (%58)	[4]
Fransa	108	Deniz kabuklusu	RT-PCR	%13	[12]
İspanya	81	Midye	RT-PCR	%18.5	[2]

Sonuç olarak, mevcut moleküler teknikler çevre ve gıda kaynaklı HAV tespitinde yeterli gibi görülse de daha ucuz ve standart yöntemlerin geliştirilmesi ile kabuklu deniz ürünleri ve özellikle de midyelerde kantitatif viral hepatit tespiti daha da kolaylaşacaktır. Endüstriyel ve evsel atıklardan kaynaklanan çevre ve kıyı kirlenmesi doğrudan insan sağlığını tehdit etmektedir. Aynı zamanda, midye gibi filtrasyonla beslenen canlılarda birikime bağlı olarak HAV, yeterince ısı işlemi görmemiş midye tüketimi sonrasında enfeksiyonu tetikleyebilmektedir. Kabuklu deniz ürünlerinin çiğ veya az pişmiş olarak tüketilme alışkanlığı hastalık riskini arttırmaktadır. Pişirme süresi (1 dk.) ve sıcaklığına (merkezde +85°C) azami dikkat virüsün inaktivasyonunda önemli bir rol almaktadır. Son olarak moleküler epidemiyolojik araştırmalar ile bu çalışma bölgelerindeki midyelerden izole edilen suşlar ile insanlarda hastalık oluşturan HAV suşları arasında ki ilişkiyi ortaya koymak son derece önemlidir.

Kaynaklar

1. Atmar RL, Neill FH, Romalde JL, Le Guyader F, Woodley CM, Metcalf TG, Estes MK, (1995). *Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR*. Appl Environ Microbiol. 61, 3014-3018.
2. Carmen FM, Jesús LR, (2013). *Detection and Characterization of Hepatitis A Virus and Norovirus in Mussels from Galicia (NW Spain)*. Food Environ Virology. 5, 110-118.

3. Chironna M, Germinario C, De Medici D, Fiore A, Di Pasquale S, Quarto M, Barbuti S, (2002). *Detection of Hepatitis A Virus in Mussels from Different Sources Marketed in Puglia Region (South Italy)*. Int J Food Microbiol. 75, 11-18
4. Chung H, Jaykus LA, Sobsey MD, (1996). *Detection of human enteric viruses in oysters by in vivo and in vitro ampli®cation of nucleic acids*. Appl Environ Microbiol. 62, 3772-3778.
5. Croci L, De Medici D, Morace G, Fiore A, Scalfaro C, Beneduce F, Toti L, (1999). *Detection of hepatitis A virus in shellfish by nested-reverse transcription-PCR*. Int J Food Microbiol. 48, 67-71.
6. Croci L, De Medici D, Ciccozzi M, Di Pasquale S, Suffredini E, Toti L, (2003). *Contamination of Mussels by Hepatitis A Virus: A Public-Health Problem in Southern Italy*. Food Control. 14, 559-563.
7. De Medici D, Croci L, Di Pasquale S, Fiore A, Toti L, (2001). *Detecting the presence of infectious hepatitis A virus in molluscs positive to RT-nested-PCR*. Lett Appl Microbiol. 33, 362-366.
8. Koopmans M, Duizer E, (2004). *Foodborne viruses: an emerging problem*. Int J Food Microbiol. 90, 23-41.
9. Lee T, Yam WC, Tam TY, Ho BSW, Ng MH, Brown WG, (1999). *Occurrence of hepatitis A virus in green-lipped mussels (Perna viridis)*. Water Res. 33, 885-889.
10. Lees D, (2000). *Viruses and bivalve shellfish*. Int J Food Microbiol. 59, 81-116.
11. Le Guyader F, Dubois E, Menard D, Pommepuy M, (1994). *Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcriptionsemimested PCR*. Appl Environ Microbiol. 60, 3665-3671.

12. Le Guyader F, Miossec L, Haugarreau L, Dubois E, Kopecka H, Pommepuy M, (1998). *RT-PCR evaluation of viral contamination in five shellfish beds over a 21-month period*. *Water Sci Technol*. 38, 45-50.
13. Le Guyader F, Parnaudeau S, Schaeffer J, Bosch A, Loisy F, Pommepuy M, Atmar RL, (2009). *Detection and quantification of noroviruses in shellfish*. *Appl Environ Microbiol*. 75, 618-624.
14. Loisy F, Atmar RL, Guillon P, Le Cann P, Pommepuy M, Le Guyader FS, (2005). *Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish*. *J Virol Methods*, 123, 1-7.
15. Mesquita JR, Vaz L, Cerqueira S, Castilho F, Santos R, Monteiro S, (2011). *Norovirus, hepatitis A virus and enterovirus presence in shellfish from high quality harvesting areas in Portugal*. *Food Microbiol*. 28, 936-941.
16. Muniain-Mujika I, Calvo M, Licena F, Girones R, (2003). *Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish*. *Int J Food Microbiol*. 83, 75-85.
17. Omana VN, Guoliang X, Gilberto V, Harold SM, (2006). *Diagnosis of Hepatitis A Virus Infection: a Molecular Approach*. *Clin Microbiol Rev*. 19, 63-79.
18. Pintó RM, Costafreda MI, Bosch A, (2009). *Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A*. *Appl Environ Microbiol*. 75, 7350-7355.
19. Romalde JL, Area E, Sánchez G, Ribao C, Torrado I, Abad X, (2002). *Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve mollusks from Galicia (NW Spain): Inadequacy of the EU standards of microbiological quality*. *Int J Food Microbiol* 74, 119-130.
20. Shieh YC, Khudyakov YE, Xia G, Ganova-Raeva LM, Woods JW, Veazey JE, Motes ML, Glatzer MB, Bialek SR, Fiore AE, (2007). *Molecular confirmation of oysters as the vector for hepatitis A in a 2005 multistate outbreak*. *J Food Prot*. 70,145-150.
21. Terio V, Di Pinto A, Di Pinto B, Martella V, Tantillo G, (2010). *RNA Extraction Method for the PCR detection of hepatitis A Virus in Shellfish*. *Int J Food Microbiol*. 142, 198-201.

Wistar ırkı ratlardan izole edilen *Escherichia coli*'lerin filogenetik analizi

H. Kaan MÜŐTAK¹, Ebru TORUN¹, İnci Başak KAYA¹, Elif Ergüven KAYA², Şeyda DİKER², Elvan ANADOL², Elçin GÜNAYDIN³

¹Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Gazi Üniversitesi, Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi, Ankara

³Etlık Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Yetiştirme Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 28.11.2013, Kabul Tarihi / Accepted: 27.12.2013

Özet: Doğal ortamlarında yaşayan ratlardan (*Rattus* spp.), insanlara ve duyarlı hayvanlara birçok hastalık etkeninin geçtiği bilinmektedir. İnsanlarda önemli sistemik hastalıklara yol açan ve diğer memeli hayvanlar gibi ratların da doğal konakçısı olduğu bilinen *Escherichia coli* (*E.coli*), önemli bir zoonotik etkidir. Ancak laboratuvar hayvanı olarak kullanılan ratlar ile ilgili özellikle ülkemizde yeterli veri bulunmamaktadır. Diğer hayvan türlerinde olduğu gibi laboratuvar ortamında yetiştirilen ratlardan da izole edilen *E.coli*'lerin genotipik ve fenotipik özelliklerinin bilinmesi, *E.coli* kökenli enfeksiyonların önlenmesinde önemlidir. Bu çalışmada, deney hayvanı olarak kullanılan Wistar ırkı ratlardan elde edilen fekal örneklerde *E.coli* varlığı ve izole edilen *E.coli*'lerin dahil oldukları filogenetik gruplar araştırılmıştır. Bu amaçla, 112 rattan toplanan dışkıdan klasik kültür yöntemiyle izole edilen 61 *E.coli* suşuna, chuA, yjaA, arpA ve trpA genlerine ve TspE4.C2 DNA fragmentine, spesifik primerlerin kullanıldığı PCR yöntemi uygulandı. Elde edilen sonuçlara göre 43/61 (%70.4) suş B1 grubuna (kommensal), 18/61 (%29.5) suş ise B2 grubuna (ekstraintestinal) dahil olarak bulundu. Yapılan bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez ratlardan izole edilen *E.coli*'lerin filogrup analizleri yapılarak, ağırlıklı olarak B1 grubunda yer aldıkları ve kommensal özellikte oldukları saptandı.

Anahtar kelimeler: *E.coli*, filogenetik analiz, Wistar rat

Phylogeny of *Escherichia coli* isolated from Wistar rats

Abstract: It is already known that several bacterial agents can be transmitted from rats (*Rattus* spp.) that live in natural habitats to human beings and susceptible animals. *Escherichia coli* (*E.coli*) which cause systemic diseases in humans and naturally found in rats like other mammals are important zoonotic agents. Nevertheless, there are few reports on rats which are used as laboratory animal. Like other animal species, it is important to know phenotypic and genotypic features of *E.coli* isolated from laboratory animals in order to prevent infections due to *E.coli*. In this study the presence of *E.coli* isolated from faeces of Wistar rats and the phylogeny of these strains were investigated. For this purpose, 61 *E.coli* strains isolated from faeces of 112 rats were investigated for the presence of chuA, yjaA, arpA and trpA genes and a DNA fragment known as TspE4.C2, by PCR. The results showed that 43/61 (70.4%) and 18/61 (29.5%) strains belong to B1 (commensal) and B2 (extraintestinal) groups, respectively. For the first time in this study *E.coli* isolated from rats were phylogrouped, assigned as B1 group and designated as commensal *E.coli* in Turkey.

Key words: *E.coli*, phylogenetic analysis, Wistar rat

Giriş

Ratlar (*Rattus* spp.) tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de laboratuvar hayvanı olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar. Doğal ortamlarında ve laboratuvar koşullarında yaşayan ratlarda klinik olarak hastalık tablosu gözlenirse de, ratların birçok zoonotik hastalık etkeninin doğal konağı olduğu (*Salmonella* serotipleri, *Yersinia pestis*, *Leptospira* spp., *Helicobacter* spp., *Mycoplasma* spp. ve *Escherichia coli*), insanlara ve duyarlı hayvanlara

bu hastalıkların geçerek enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir [1]. Laboratuvar ratlarında bu etkenlerin bulunması, özellikle bu hayvanlarla çalışan personelin taşıdığı risk açısından önemlidir [5,10]. *Escherichia coli* (*E.coli*) insanlar ve ratların da dahil olduğu pek çok hayvanın gastrointestinal sisteminin normal florasının bir üyesidir [3]. Hayvanların doğumlarından sonra gastrointestinal sistemlerinde kolonize olur ve hayvanların yaşamı boyunca gastrointestinal sistem florasında kalır [7]. Birçok

E.coli suşu bağırsak mukozasına penetre olmadığı sürece konakta kommensal olarak bulunabilmektedir [7,11]. Fakat patojen özellik gösteren bazı *E.coli* suşları insan ve hayvanlarda, başta diyare olmak üzere çeşitli intestinal enfeksiyonlar ile üriner sistem enfeksiyonları, meningitis, septisemi gibi ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olabilmektedir [3]. Patojen *E.coli* suşları zoonotik özellikte olup, insanlara, çeşitli evcil ve yabani hayvanların dışkıları ile direkt temas veya kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu bulaşabilmektedir. Bu sebepten, taşıyıcı veya hasta hayvanlarla temas halindeki insanlar muhtemel risk altındadır [6,11]. Ancak laboratuvar hayvanı olarak kullanılan ratlar ile ilgili özellikle ülkemizde yeterli veri bulunmamaktadır.

Diğer hayvan türlerinde olduğu gibi laboratuvar ortamında yetiştirilen ratlardan da izole edilen *E.coli*'lerin genotipik ve fenotipik özelliklerinin bilinmesi, *E.coli* kökenli enfeksiyonların önlenmesinde önemlidir. 1980'lerden günümüze kadar yapılan çalışmalar, *E.coli* suşlarının çeşitli genetik alt yapılara sahip olduğunu ve bu alt yapılara göre filogenetik sınıflara ayrıldıklarını göstermiştir [4]. İlk filogenetik sınıflandırma, multi-lokus enzim elektroforez (MLEE) yöntemi ile yapılan çalışmalar sonrasında, *E.coli* suşlarının A, B1, B2, C, D ve E ile gösterilen altı ana filogenetik gruba ayrılması ile ortaya çıkmıştır. Daha sonrasında yapılan analizler sonucunda ise *E.coli* suşlarının dört ana filogenetik grupta toplandığı (A, B1, B2 ve D) görülmüştür. Sınıflandırılmayan suşlar ise E grubunda dahil edilmiştir [2,3]. Bununla beraber, ekstraintestinal enfeksiyondan sorumlu suşların daha çok B2 ve D grubuna ait olduğu, birçok kommensal suşun ise B1 ve A grubuna ait olduğunu gösterilmiştir. Bu çalışmalar çeşitli filogruplardaki suşların fenotipik ve genotipik özelliklerindeki farklılık ve hastalık oluşturma yetenekleri üzerine bilgi edinmemizi sağlamaktadır [3,4]. Bununla beraber 2000'lerden sonra *E.coli*'ye ait multi-lokus sekans tiplendirme (MLST) ve tüm genom sekans verilerinin çoğaltılması ile filogruplar tekrar incelenmiş ve *E.coli*'ye ait yedi filogrup (A, B1, B2, C, D, E, F) ve *Escherichia* cinsine ait bir filogrup (*Escherichia* clade I) olmak üzere sekiz filogrup tanımlanmıştır. *Escherichia* clade 1 filogrubunun ise, *E.coli*'den fenotipik olarak ayırt edilmesi olanaksız olan fakat genetik olarak ayrılabilen *Escherichia*'nın yeni türlerinin içene almasından dolayı *E.coli*'nin bir filogrubu olarak dikkate alınması gerektiği ortaya konmuştur [4].

Bu çalışmada, deney hayvanı olarak kullanılan Wistar ırkı ratlardan elde edilen fekal örneklerde *E.coli* varlığı ve izole edilen *E.coli*'lerin dahil oldukları filogenetik grupların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bakteriyel İzolasyon: Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi, Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi, Ankara'da kontrollü şartlarda ve kafes ortamında barındırılan 112 adet rattan toplanan dışkı örnekleri *E.coli* varlığı yönünden araştırıldı. Cary-Blair Transport Medium (Oxoid; CM0519) içeren steril plastik kaplara her bir rattan alınan 1 gr sabah dışkısı, %5 koyun kanı eklenmiş Kanlı Agar (Oxoid; CM0271), MacConkey Agar (Oxoid; CM0007) ve Eosin Methylene Blue Agar (Oxoid; CM0069)'da, 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, şüpheli üç dört koloni alınarak Gram boyama ve standart biyokimyasal testler yapıldı [11]. Filogrupların belirlenmesinde kullanılmak üzere tüm *E.coli* izolatları %20 gliserol eklenmiş Brain Heart Infusion Broth (Oxoid; CM1135)'da -80°C'de saklandı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Dalı'na ait suş koleksiyonundan alınan *E.coli* AVMC92-35 suşu pozitif kontrol olarak tüm testlerde kullanıldı.

***Escherichia coli* suşlarının filogruplandırılması:** İdentifiye edilen *E.coli*'lerden DNA ekstraksiyonu için kit kullanım talimatlarına uygun olarak DNA izolasyon kiti (QIAamp DNA Mini Kit; Qiagen, Cat no: 51104) kullanıldı. İzole edilen DNA'ya, Clermont ve ark. (2013)'nin metoduna göre quadruplex PCR yöntemi uygulanarak *E.coli* suşlarının filogrup analizi gerçekleştirildi [4]. Buna göre, her primerden 0.2 µM (Tablo 1), 200 µM dNTP, 2.5 µl PCR reaksiyon buffer, 3 mM MgCl₂, 2 U Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific; EP0402) ve 1 µl template DNA'nın bulunduğu 25 µl PCR karışımı hazırlandı. Amplifikasyon koşulları: 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takip eden 30 siklus, denatürasyon 94°C'de 10 sn, bağlanma 59°C'de (group E için 57°C) 20 sn, uzama 72°C'de 10 sn ve 72°C'de 5 dk son uzama aşaması olarak uygulandı. Amplifiye olan ürünler, UV altında %1.5 agaroz (Prona, EU) jel elektroforezi sonucu görüntülendi. Quadruplex PCR sonuçları, genetik belirleyiciler olan chuA, yjaA ve arpA genleri ile TSPE4.C2 DNA fragmanın

var ve/veya yok olma durumuna göre değerlendirildi. Grup E ve grup C'nin belirlenmesinde sırasıyla, ArpAgpE.f, ArpAgpE.r ile trpAgpC.1, trpAgpC.2

primer dizileri kullanıldı (Tablo 1) [9]. Aynı zamanda, grup E ve C'nin belirlenmesinde internal kontrol kullanıldı [4].

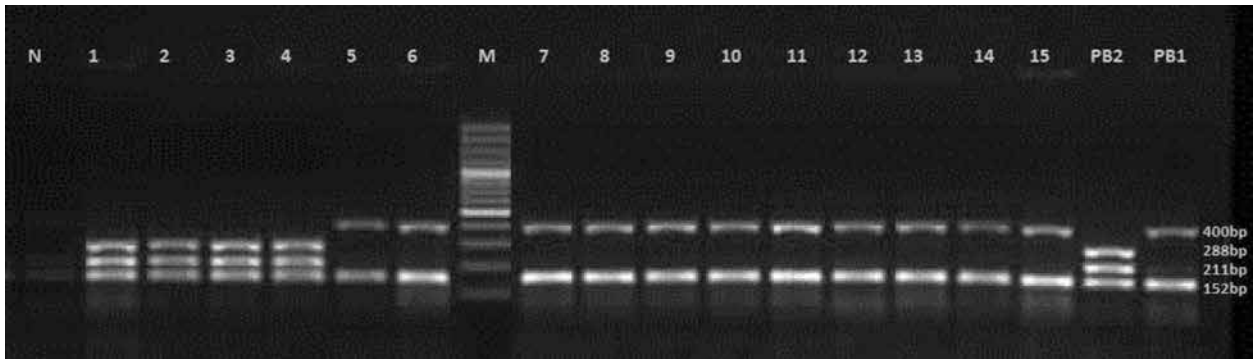
Tablo 1. Hedef gen bölgeleri, uygulanan metot, primer sekansları ve PCR ürün büyüklüğü.

Metod	Primer	Gen	Sekans	PCR ürünü (bp)
Quadruplex	chuA.1b	<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288
	chuA.2		TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
	yjaA.1b	<i>yjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211
	yjaA.2b		AATGCGTTCCTCAACCTGTG	
	TspE4C2.1b	TspE4.C2	CACTATTTCGTAAGGTCATCC	152
	TspE4C2.2b		AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	
	AceK.f	<i>arpa</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400
	ArpA1.r		TCTCCCCATACCGTACGCTA	
Group E	ArpAgpE.f	<i>arpa</i>	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	301
	ArpAgpE.r		GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	
Group C	trpAgpC.1	<i>trpA</i>	AGTTTTATGCCAGTGCGAG	219
	trpAgpC.2		TCTGCGCCGGTCACGCCC	
Internalcontrol	trpBA.f	<i>trpA</i>	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489
	trpBA.r		GCAACGCGGCCTGGCGGAAG	

Bulgular

Laboratuvar hayvanı olarak yetiştirilen 112 rattan toplanan dışkılarından klasik kültür yöntemi ile 61 (%54.4) *E.coli* şusu izole edildi. Elde edilen quad-

ruplex PCR sonuçlarına göre; 43/61 (%70.4) suş B1 grubuna (kommensal), 18/61 (%29.5) suş ise B2 grubuna (ekstraintestinal) dahil olarak bulundu (Şekil 1).



Şekil 1. Agaroz jel elektroforez sonucu. N, negatif kontrol; M, Moleküler marker (100-1500 bp); PB2, B2 pozitif kontrol; PB1, B1 pozitif kontrol; 1-4, B2 pozitif örnekler (152, 211, 288 bp); 5-15 B1 pozitif örnekler (152, 400 bp).

Tartışma ve Sonuç

Escherichia coli bütün sıcakkanlı hayvanların gastrointestinal sistemlerinde bulunan ve gıda kaynaklı enteritislere birçok ekstraintestinal hastalığa ka-

dar değişen enfeksiyonların etiyolojisinde yer alan zoonotik bir bakteri türüdür. Diyareye neden olan *E.coli*'ler virulens özelliklerine, patojenite mekanizmalarına ve klinik semptomlarına göre entero-

toksijenik *E.coli* (EPEC), enteropatojenik *E.coli* (EPEC), enteroaggregative *E.coli* (EAaggEC), enteroinvasive *E.coli* (EIEC), enterohemorragik *E.coli* (EHEC) ve Shiga (Vero) toksin üreten *E.coli* (STEC/VTEC)'ler olmak üzere 5 temel patogru-ba ayrılmaktadır [8,12]. Son yıllarda yapılan çalışmalar hayvan kökenli *E.coli*'lerin üriner sistem enfeksiyonları gibi ekstraintestinal enfeksiyonlardan sorumlu olduklarını ortaya koymuşlardır [8]. Hayvanlarda ve insanlarda çok çeşitli enfeksiyonlara neden olduğu bilinen *E.coli*'lerin fenotipik ve genotipik özelliklerinin bilinmesi enfeksiyonların önlenmesinde ve tedavisinde önem taşımaktadır. Bu çalışmada son yıllarda hastalık modelleme ve enfeksiyon patogenezi gibi çeşitli denemelerde kullanımı artan rat dışkılarında *E.coli* prevalansının belirlenmesi ve izole edilen *E.coli*'lerin filogrup analize göre sınıflandırmalarının yapılması amaçlandı.

Bu çalışmada 112 adet rattan toplanan dışkıdan %54.4 (61/112)'luk izolasyon oranı elde edilmiştir. Elde edilen quadruplex PCR sonuçlarına göre 43/61 (%70.4) suşun B1 grubuna (kommensal), 18/61 (%29.5) suşun ise B2 grubuna (ekstraintestinal) dahil oldukları anlaşılmıştır. Daha önce birçok hayvan türünden izole edilen *E.coli*'ler ile ilgili filogruplandırma çalışmaları yapılmış olmasına rağmen deney hayvanı olarak kullanılan ratlarda ilk kez bu çalışma ile filogruplandırma yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre izole edilen *E.coli*'lerin çoğunlukla patojen olmayan kommensal B1 grubuna dahil oldukları saptanmıştır.

Laboratuvar hayvanı olarak kullanılan ratlar ile ilgili özellikle ülkemizde yeterli veri bulunmamaktadır. Ülkemizde laboratuvar hayvanı kullanımının arttığı düşünüldüğünde, bu hayvanlar ile çalışan personelin içinde bulunduğu riskin bilinmesi gerekmektedir. Diğer hayvan türlerinde olduğu gibi laboratuvar ratlarından da izole edilen *E.coli*'lerin genotipik ve fenotipik özelliklerinin bilinmesi, *E.coli* kökenli enfeksiyonların önlenmesinde önemlidir. Yapılan bu çalışma ile ratlardan izole edilen

E.coli'lerin filotiplendirmeleri, Türkiye'de ilk kez yapılarak, ağırlıklı olarak B1 grubunda yer aldıkları ve kommensal özellikte oldukları saptandı.

Kaynaklar

1. **Baker DG**, (1998). *Natural Pathogens of Laboratory Mice, Rats, and Rabbits and Their Effects on Research*. Clin Microbiol Rev. 11, 231-266.
2. **Chaudhuri RR, Henderson IR**, (2012). *The evolution of the Escherichiacoli phylogeny*. Infect Genet Evol. 12, 214-226.
3. **Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E**, (2000). *Rapid and Simple Determination of the Escherichiacoli Phylogenetic Group*. Appl Environ Microbiol. 66, 4555-4558.
4. **Clermont O, Christenson J K, Denamur E, Gordon D M**, (2013). *The Clermont Escherichiacoli phylo-typing method revised: improvement of specificity and detection of new phylo-groups*. Environ Microbiol Rep. 5, 58-65.
5. **Fox JG, Lipman NS**, (1991). *Infections transmitted by large and small laboratory animals*. Infect Dis Clin North Am. 5, 131-63.
6. **Gülhan T, İlhan Z, Aksakal A, Solmaz H, Ekin İH**, (2009). *Hayvan Orijinli Escherichiacoli Suşlarının Enterotoksin Tiplerinin (LT, ST) Belirlenmesi*. YYU Vet Fak Derg. 20, 27-31.
7. **Gyles CL, Fairbrother JM**, (2010). *Escherichiacoli İn: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals Fourth Edition Ed.: Gyles C L, Prescott J F, Songer J G, Thoen C O, Blackwell Publishing p: 267-308*
8. **Hammerum AM, Heuer OE**, (2009). *Human health hazards from antimicrobial-resistant Escherichiacoli of animal origin*. Food Safety. 48: 916-21.
9. **Lescat M, Clermont, O, Woerther PL, Glodt J, Dion S, Skurnik D**, (2012). *Commensal Escherichiacoli strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure*. Environ Microbiol Rep. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2012.00374.x.
10. **Livingston RS, Riley LK**, (2003). *Diagnostic testing of mouse and rat colonies for infectious agents*. Lab Anim (NY). 32, 44-51
11. **Quin P J, Carter M E, Markey B, Carter G R**, (1999). *Clinical Veterinary Microbiology*. Elsevier Health Sciences p: 220-225.
12. **Wasteson Y**, (2001). *Zoonotic Escherichiacoli*. Acta Vet Scand Suppl. 95, 79-84.