

Pisolithus arrhizus Ekstraktı Kullanılarak Sentezlenen Titanyum Nanopartikülünün Antimikrobiyal Etkisi.....157
Antimicrobial Effect of Titanium Nanoparticles Synthesized Using Pisolithus arrhizus Extraction
G. YUVALI ÇELİK, D. ONBAŞLI, Ö. ÖZBAHAR, İ. ÖÇSOY

Koç ve Boğa Abomazumunda Progesteron Reseptörünün İmmunlokalizasyonu.....162
The Immunolocalization of Progesterone Receptor in the Abomasum of Ram and Bull
N. LIMAN, E. ERGEN, U. K. KAVRAAL, Z. KARAKOÇ

The Effects of Using Oregano and L-Carnitine on Second Phase Laying Performance Parameters of Force Molting Programs in Laying Hens.....170
Zorlamalı Tüy Dökümü programlarında Kekik ve L-Karnitin Kullanılmasının Yumurta Tavuklarında İkinci Yumurtlama Periyodu Verim Parametreleri Üzerine Etkisi
A.B. AKKAYA, İ. BAYRAM

Diyarbakır Yöresindeki Çiğ Koyun Sütlerinin Mikrobiyolojik, Fiziko-Kimyasal ve Organoleptik Özelliklerinin Araştırılması.....178
The Study of the Microbiological, Physico-Chemical and Organoleptic Properties of the Raw Ewe's Milk in Diyarbakır Province
M.N. ÇELİK, A. VURAL, M.E. ERKAN

Laktasyondaki Keçilerde Lökosit CaSR Gen Ekspresyon Seviyesi İle Plazma Kalsiyum Seviyesinin Belirlenmesi.....184
Determination of Leucocyte CaSR Gene Expression Level and Plasma Calcium Level in Lactated Goats
S. DALKIRAN, A. YAKAN

Kayseri İlinde Satışa Sunulan Sokak Sütlerinde Mycobacterium paratuberculosis Varlığının Konvansiyonel ve Serolojik Yöntemlerle Araştırılması.....190
The Investigation of Mycobacterium paratuberculosis by Serological and Cultural Methods in Raw Milks Retailed in Kayseri
M. ÖZTÜRK KALIN, K.S. GÜMÜŞSOY, H. HIZLISOY

Taze ve Alkid Resinle Hazırlanan Rat Sindirim Sistemi Organlarının Tekstür ve Renk Değerlerinin Karşılaştırılması.....198
Comparison of Texture and Color Values of Rat Digestive System Organs Prepared with Fresh and Alkid Resin
H. KELEŞ, S. ÇINAROĞLU

Elazığ'da Açıkta Satılan Baharatların Mikrobiyolojik Kalitesi.....204
Microbiological Qualities of Unpacked Spices Sold Out in Elazığ
P. DEMİR, S.ERKAN, G.ÖKSÜZTEPE, G.K. İNCİLİ

Perakende Olarak Satışa Sunulan Kaymak ve Tereyağlarda Aflatoxin M1 Varlığı.....213
Presence of Aflatoxin M1 in Sales as Retail Cream and Butter
N.A. ÖZKAN, N. ERTAŞ ONMAZ

Hasmer Koyunu Mandibula'sı Üzerinde Makroanatomik ve Morfometrik İncelemeler.....218
Investigations of Macroanatomical and Morphometric on the Mandible in Hasmer Sheep
Z. ÖZÜDOĞRU, R. İLGÜN, D. ÖZDEMİR

DERLEMELER / REVIEW ARTICLES

İneklerde Süperovulasyon Uygulamalarında Son Gelişmeler.....224
Recent Advances in the Application Superovulation in Cattle
U. KARA, T. BEKYÜREK

Inhalation Anesthesia: Technical Information and Inhalant Anesthetics.....233
İnhalasyon Anestezisi: Teknik Bilgi ve İnhalant Anestezikler
N. APAYDIN

OLGU SUNUMLARI / CASE REPORTS

Bir Martıda (Larus cachinnans) Türkiye Faunası İçin İki Yeni Nematod Türü; Cosmocephalus obvelatus (Creplin, 1825) ve Paracuarria adunca (Creplin, 1846).....238
Two New Nematode Species for Turkey Fauna in a Seagull (Larus cachinnans); Cosmocephalus obvelatus (Creplin, 1825), and Paracuarria adunca (Creplin, 1846)
Ş. UMUR, G.Z. PEKMEZCİ, C.S. BÖLÜKBAŞI, C. ATEŞ



ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

ISSN-1304-7280



Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

Journal of Faculty of Veterinary Medicine,
Erciyes University

Yılda 3 sayı yayımlanır
Published 3 issues per year

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

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

Yıl / Year : 2019
Cilt / Volume : 16
Sayı / Number : 3

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

E-posta: ercvet@gmail.com

Baskı Tarihi: Aralık 2019

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

Sahibi / Owner

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

Editörler Kurulu / Editorial Board

Baş Editör / Editor-in Chief

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

Editör Kurul Üyeleri / Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arş. Gör. İmdat ORHAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

İngilizce Dil Danışmanı/ Language Editor

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

Danışma Kurulu / Advisory Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Yazışma Adresi / Correspondence

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

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

E-posta : ercivet@gmail.com

Tel : 0 352 339 94 84

Fax : 0 352 337 27 40

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

Mizanpaj / Designer: Erhan GÜMÜŞ

Basım / Print: Erciyes Üniversitesi Matbaası, Melikgazi/KAYSERİ

ISSN-1304-728

ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES

- Pisolithus arrhizus Ekstraktı Kullanılarak Sentezlenen Titanyum Nanopartikülünün Antimikrobiyal Etkisi.....157**
Antimicrobial Effect of Titanium Nanoparticles Synthesized Using Pisolithus arrhizus Extraction
G. YUVALI ÇELİK, D. ONBAŞLI, Ö. ÖZBAHAR, İ. ÖÇSOY
- Koç ve Boğa Abomazumunda Progesteron Reseptörünün İmmunlokalizasyonu.....162**
The Immunolocalization of Progesterone Receptor in the Abomasum of Ram and Bull
N. LİMAN, E. ERGEN, U. K. KAVRAAL, Z. KARAKOÇ
- The Effects of Using Oregano and L-Carnitine on Second Phase Laying Performance Parameters of Force Molting Programs in Laying Hens.....170**
Zorlamalı Tüy Dökümü programlarında Kekik ve L-Karnitin Kullanılmasının Yumurta Tavuklarında İkinci Yumurtlama Periyodu Verim Parametreleri Üzerine Etkisi
A.B. AKKAYA, İ. BAYRAM
- Diyarbakır Yöresindeki Çiğ Koyun Sütlerinin Mikrobiyolojik, Fiziko-Kimyasal ve Organoleptik Özelliklerinin Araştırılması.....178**
The Study of the Microbiological, Physico-Chemical and Organoleptic Properties of the Raw Ewe's Milk in Diyarbakır Province
M.N. ÇELİK, A. VURAL, M.E. ERKAN
- Laktasyondaki Keçilerde Lökosit CaSR Gen Ekspresyon Seviyesi İle Plazma Kalsiyum Seviyesinin Belirlenmesi.....184**
Determination of Leucocyte CaSR Gene Expression Level and Plasma Calcium Level in Lactated Goats
S. DALKIRAN, A. YAKAN
- Kayseri İlinde Satışa Sunulan Sokak Sütlerinde *Mycobacterium paratuberculosis* Varlığının Konvansiyonel ve Serolojik Yöntemlerle Araştırılması.....190**
The Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* by Serological and Cultural Methods in Raw Milks Retailed in Kayseri
M. ÖZTÜRK KALIN, K.S. GÜMÜŞSOY, H. HIZLISOY
- Taze ve Alkid Resinle Hazırlanan Rat Sindirim Sistemi Organlarının Tekstür ve Renk Değerlerinin Karşılaştırılması.....198**
Comparison of Texture and Color Values of Rat Digestive System Organs Prepared with Fresh and Alkid Resin
H. KELEŞ, S. ÇINAROĞLU
- Elazığ'da Açıkta Satılan Baharatların Mikrobiyolojik Kalitesi.....204**
Microbiological Qualities of Unpacked Spices Sold Out in Elazığ
P. DEMİR, S.ERKAN, G.ÖKSÜZTEPE, G.K. İNCİLİ
- Perakende Olarak Satışa Sunulan Kaymak ve Tereyağlarda Aflatoxin M1 Varlığı.....213**
Presence of Aflatoxin M1 in Sales as Retail Cream and Butter
N.A. ÖZKAN, N. ERTAŞ ONMAZ
- Hasmer Koyunu Mandibula'sı Üzerinde Makroanatomik ve Morfometrik İncelemeler.....218**
Investigations of Macroanatomical and Morphometric on the Mandible in Hasmer Sheep
Z. ÖZÜDOĞRU, R. İLGÜN, D. ÖZDEMİR

DERLEMELER / REVIEW ARTICLES

- İneklerde Süperovulasyon Uygulamalarında Son Gelişmeler.....224**
Recent Advances in the Application Superovulation in Cattle
U. KARA, T. BEKYÜREK
- Inhalation Anesthesia: Technical Information and Inhalant Anesthetics.....233**
İnhalasyon Anestezisi: Teknik Bilgi ve İnhalant Anestezikler
N. APAYDIN

OLGU SUNUMLARI / CASE REPORTS

- Bir Martıda (*Larus cachinnans*) Türkiye Faunası için İki Yeni Nematod Türü; *Cosmocephalus obvelatus* (Creplin, 1825) ve *Paracuaria adunca* (Creplin, 1846).....238**
Two New Nematode Species for Turkey Fauna in a Seagull (*Larus cachinnans*); *Cosmocephalus obvelatus* (Creplin, 1825), and *Paracuaria adunca* (Creplin, 1846)
Ş. UMUR, G.Z. PEKMEZCİ, C.S. BÖLÜKBAŞ, C. ATEŞ



Pisolithus arrhizus* Ekstraktı Kullanılarak Sentezlenen Titanyum Nanopartikülünün Antimikrobiyal Etkisi

Gökçen YUVALI ÇELİK¹, Dilşad ONBAŞLI¹, Özge ÖZBAHAR¹, İsmail ÖÇSOY²

¹Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

*Sorumlu yazar: Gökçen YUVALI ÇELİK; E-posta: gycelik@erciyes.edu.tr; ORCID:0000-0002-3990-1346
Atıf yapmak için: Yuvalı Çelik G, Onbaşı D, Özbahar Ö, Öçsoy İ. *Pisolithus arrhizus* ekstraktı kullanılarak sentezlenen titanyum nanopartikülünün antimikrobiyal etkisi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(3): 157-161.

Özet: *Pisolithus arrhizus* (Scop.) Rauschert (Basidiomycetes) türü okalıptüs ve çam ağaçlarının birçok türünü çevreleyen kökleri toprakta bulunan bir ektomikorizal mantardır. Bu çalışmada *Pisolithus arrhizus* etanol ekstraktı kullanılarak hazırlanan Titanyum (TiO₂) nanopartikülünün (NP) farklı patojen mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etkisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada hidrotermal yöntem kullanılarak sentezlenen mantar ekstrel TiO₂ NP, UV-Vis Spektrometre (UV-vis) ve taramalı elektron mikroskop (SEM) ile karakterize edilmiştir. Hazırlanan ve karakterize edilen bu NP'lerin, disk difüzyon yöntemi kullanılarak *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* ve *Streptococcus mutans* test patojenleri üzerinde antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Mantar ekstrel TiO₂ NP'lerin patojenler üzerinde zayıf bir inhibisyon etkisine sahip oldukları (7.5-9.3 mm), maksimum inhibisyonu (9.3 mm) *S. mutans*'a karşı gösterdiği buna karşın *C. albicans*'a karşı antifungal etkiye sahip olmadıkları tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, *Pisolithus arrhizus*, TiO₂ nanopartikülü

Antimicrobial Effect of Titanium Nanoparticles Synthesized Using *Pisolithus arrhizus* Extraction

Summary: *Pisolithus arrhizus* (Scop.) Rauschert (Basidiomycetes) type is an ectomycorrhizal fungi found in the soil that surrounds many species of eucalyptus and pine trees. In this study, it was aimed to determine the inhibitory effect of Titanium (TiO₂) nanoparticle (NP) prepared by using *Pisolithus arrhizus* ethanol extract on different pathogenic microorganisms. In the study, NP's synthesized using hydrothermal method was characterized by UV-vis spectrometer (UV-vis) and scanning electron microscope (SEM). The antimicrobial activity of these prepared and characterized NP's, have been investigated by using disk diffusion method on test pathogens of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. While NPs have a weak inhibitory effect on pathogens (7.5-9.3 mm), the maximum inhibition (9.3 mm) is shown against *S. mutans*. Whereas antifungal effect against *C. albicans* have not been found.

Key words: Antimicrobial activity, *Pisolithus arrhizus*, TiO₂ nanoparticle

Giriş

Nanoteknoloji, nanometre düzeyinde yeni malzemeler üretmek amacıyla bilim ve teknolojiye uygulamayla birlikte hızla büyüyen bir alan olarak ortaya çıkmaktadır (1). Nanomalzemeler, çeşitli fiziko-kimyasal özellikleri nedeniyle yüzlerce yeni ürünün geliştirilmesine neden olan ticari bir devrimin parçasıdır (27). Metal nanopartiküller yüksek bir spesifik yüzey alanı ve yüzey atomlarının yüksek oranına sahiptirler.

Kalay oksit, demir oksit, çinko oksit ve titanyum gibi metal oksit nanopartikülleri çok caziptir ve çeşitli ci-

haz uygulamalarında önemli bir yere sahiptir (23,24). TiO₂, foto katalizi, güneş pili cihazları, gaz sensörleri ve biyomalzemeler gibi birçok alanda büyük önem taşıyan bir materyaldir (12). Titanya'nın toksik olmayan ve biyolojik olarak uyumlu özelliklerinden dolayı farmasötik endüstrilerde olduğu kadar kemik dokusu mühendisliği gibi biyomedikal bilimlerde de uygulamaları bulunmaktadır (11,15).

Katalitik aktivite, optik özellikler, elektronik özellikler, antibakteriyel özellikler ve manyetik özellikler gibi eşsiz fiziko-kimyasal karakteristikleri nedeniyle, nanopartikülleri geliştirmek için yapılan yeni sentez yöntem çalışmaları oldukça yoğunluk kazanmıştır (5,8,18,33). Nanopartikül sentezinde çevresel olarak toksik olmayan sentetik protokollere duyulan ihtiyaç, toksik kimyasalların kullanımından bağımsız biyolojik yaklaşımlara olan ilginin artmasına yol açmakta ve biyolojik sentez için deneysel süreçlerin geliştirilmesi, nanoteknolojinin önemli bir koluna dönüşmektedir (2,28). Bugüne kadar bakteriler de dahil olmak üzere

Geliş Tarihi/Submission Date : 26.09.2017

Kabul Tarihi/Accepted Date : 11.10.2018

*Bu çalışma; "*Pisolithus arrhizus* Ekstraktı Kullanılarak Sentezlenen Titanyum Nanopartiküllerinin Antimikrobiyal Etkisi" adlı Bitirme tezinden özetlenmiştir. Ayrıca bu çalışmanın özeti, 26-29 Nisan 2017 tarihinde İstanbul'da düzenlenen 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi'nde (IVEK) sunuldu ve özet metni sayfa 342'de yayımlandı.

mikroorganizmalar, mantar ve bitkiler kullanılarak biyolojik yaklaşımla yapılan bir çok nanopartikül sentezi bildirilmiştir (30).

Çalışmada kullanılan *P. arrhizus* Agaricomycete ailesine ait olup dünya çapında bir dağılıma sahip mikorizal bir mantar türüdür (22). Ülkemizde Antalya, Aydın, Balıkesir, Çanakkale, Denizli, İzmir, Kahramanmaraş, Kütahya, Malatya, Manisa, Mersin Muğla bölgeleri olmak üzere geniş bir yayılım alanına sahiptir (21). Yapılan birçok çalışmada mantarların antibakteriyel, antiviral ve antifungal etkileri bildirilmiştir (4,31)

Bu çalışmada, *P. arrhizus* etanol ekstraktlı TiO₂ NP'lerin sentezi ve karakterizasyonu, ayrıca NP'lerin patojen test mikroorganizmalar üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılarak yeni bir antimikrobiyal strateji olasılığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmada, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 35218, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) ATCC 6633, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ATCC 68175 ve *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 90028 standart suşları kullanılmıştır. Bu suşlar Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji ve Farmasötik Mikrobiyoloji kültür koleksiyonlarından temin edilmiştir.

Araştırmada kullanılan makrofungus örneği

Bu araştırmada kullanılan *P. arrhizus* makrofungus örneği Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hakan ALLI tarafından Muğla-Datça, İçmeler Deresi Bölgesinden toplanmış ve tanımlanmıştır.

P. arrhizus ekstraktlarının hazırlanması

Mantar örnekleri kurutulmuş ve toz haline getirilmiştir. Her bir numunenin %70'lik etanol ekstraktı 3 gün manyetik bir karıştırıcıda 37°C'de karıştırılarak hazırlanmıştır. Ekstraktlar vakum altında bir desikatörde kurutulmuş ve liyofilize edilmiştir.

TiO₂ NP'ünün sentezi ve karakterizasyonu

Mantar ekstresi (1mL) (10%w/v) çözeltisi, 50 mM Ti (IV) (5mL) isopropoxide çözeltisine eklenerek homojen bir çözelti elde edilinceye kadar oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra elde edilen karışım, teflon kaplı paslanmaz çelik otoklav içerisine aktarılmış ve fırın sıcaklığı 80 °C ye ayarlanarak belirli bir süre inkübe edilmiştir. Teflon kap dibinde oluşan ürün TiO₂ NP, su ve etanol ile sonikasyon altında en az 3 kez yıkanarak bağlanmamış mantar ekstresi fazlası ortamdaki uzaklaştırılarak TiO₂ NP çökeleği elde edilmiş ve vakum altında 60°C derecede kurutulmuştur.

Çökelti tampon içerisinde çözülerek stok çözelti ppm olarak ayarlanmıştır. Daha sonra elde edilen TiO₂ NP karakterizasyon ve antimikrobiyal çalışmalar için saklanmıştır. TiO₂ NP'nin morfolojisi ve boyutu taramalı elektron mikroskobu (SEM, ZEISS EVO LS10, 25 kV), absorbands noktası ise Uv-Vis spektrometresi (Perkin Elmer) ile karakterize edilmiştir.

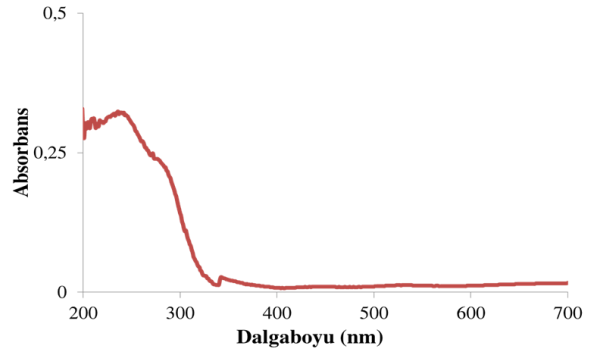
Antimikrobiyal aktivite testi

Çalışmada kullanılan *P. arrhizus* ekstraktı ile hazırlanan NP'nin test mikroorganizmaları üzerindeki inhibisyon etkisini belirlemek amacıyla disk diffüzyon yöntemi kullanılmıştır (7). Disk diffüzyon testinde, bakterilerin gelişimi için nutrient sıvı (NB), *C. albicans* için ise sabouraud dextrose sıvı (SDB) (Merck) kullanılmıştır. Test bakterileri NB, *C. albicans* ise SDB besiyerlerinde 37°C'de 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Antimikrobiyal duyarlılık testi, çalışmada kullanılan bakteriler için nutrient agarda, *C. albicans* için ise sabouraud dekstroz agarda gerçekleştirildi. Elde edilen kültürler Mc Farland 0.5 nolu bulanıklık standartına göre ayarlandıktan sonra her birinden 100 µL alınarak ayrı ayrı besiyerlerine cam bir baget yardımıyla yayılmıştır. Daha sonra 6 mm çapındaki steril diskler (Bioanalyse, Antimicrobial Susceptibility Test Discs) besiyerlerinin yüzeyine belli aralıklarla yerleştirilmiştir. Yerleştirilen disklerin üzerine 20 µL *P. arrhizus* ekstresi ile hazırlanan NP, mikro pipetlerle ilave edilerek emdirilmiştir. Petri kapları 37 °C'de 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Inkübasyon sonunda disk çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile ölçülmüştür.

Bulgular

UV-vis spektrofotometre

TiO₂ NP'nin karakteristik ışık absorbands noktası Şekil 1'de gösterilmektedir. TiO₂ NP~246 nm civarında zayıf ve geniş bir absorbands piki vermiştir.

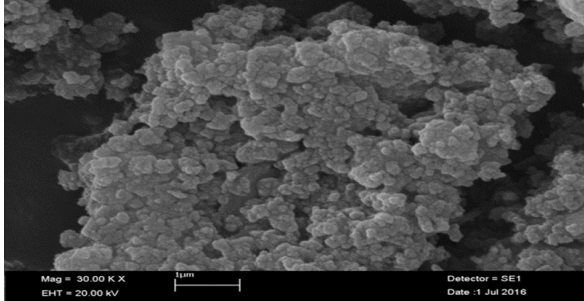


Şekil 1. TiO₂ UV-vis spektroskopisi (TiO₂'nin karakteristik absorbands pik: ~246 nm=0,354)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

TiO₂ NP'lünün taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri Şekil 2'de gösterilmiştir. Buna göre, TiO₂

NP'nin boyutu 65 ± 5 nm civarında ölçülmüştür. Morfolojileri ise genel itibarı ile küresel olarak gözlenmiştir.



Şekil 2. TiO_2 NP'lerin SEM görüntüsü 65 ± 5 nm

Antimikrobiyal aktivite

Disk difüzyon metoduna göre tespit edilen antimikrobiyal aktivite sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre; sentezlenen mantar ekstreli titanyum nanopartikülünün hem Gram negatif hem de Gram bakterilere karşı inhibitörük etkiye sahip olduğu fakat *C. albicans* ATCC 90028 suşuna karşı antifungal aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Test edilen patojen bakteriler arasında *P. arrhizus* - TiO_2 NP'lün en yüksek aktiviteyi *S. mutans* ATCC 68175 suşuna karşı göstermiş olduğu belirlenmiştir.

Tablo 1. *P. arrhizus* - TiO_2 NP'lünün antimikrobiyal aktivite sonuçları

| Test suşları | İnhibisyon Zon Çapı (mm) | |
|--------------------|--|--|
| | <i>P. arrhizus</i> - TiO_2 NP | |
| <i>E. coli</i> | 8.0±0.0 | |
| <i>S. aureus</i> | 8.2±0.0 | |
| <i>S. mutans</i> | 9.3±0.0 | |
| <i>B. subtilis</i> | 7.5±0.0 | |
| <i>C. albicans</i> | - | |

"-" Herhangi bir etki gözlenmemiştir; "±" Ortalama ±Standart sapma

Tartışma ve Sonuç

Nanopartiküller, nano ölçekli boyutlarından dolayı benzersiz katalitik, optik, manyetik ve elektriksel özelliklere sahiptirler (32). Gümüş ve altınların biyosentezi üzerine birçok araştırma uzun yıllardır yapılmaktadır. Hem altın hem de gümüş nanopartiküllerin çeşitli alanlarda yoğun uygulamaları bulunmaktadır (29). Lantum ve titanyum gibi nadir metal nanopartiküllerinin biyosentezi konusunda ise pek fazla çalışma rapor edilmemiştir. Titanyum nanopartikülleri oksijen ve hidroksil serbest radikallerini elde etmek için yüzeye adsorbe edilen O_2 ve OH^- ile reaksiyona girme kabiliyetine sahip, kozmetik ürünler ve farmasötik de dahil bir çok alanda büyük önem taşıyan bir malzemedir (17,26).

Yakın zamanlarda nanopartikül sentezleri bakteri (16,25), mantar (2,9) ve bitkiler (3,6,14,19) ile elde edilmiştir. Ancak literatür araştırmalarında *P. arrhizus*

mantarı ile yapılan çalışmalara rastlanmamıştır. Çalışmada sentezlenen mantar ekstreli TiO_2 nanopartikülü, disk difüzyon yöntemi ile *E. coli*, *S. aureus*, *S. mutans*, *B. subtilis* ve *C. albicans* standart suşlarına karşı antimikrobiyal etkinlikleri bakımından test edildi. Maksimum inhibisyon zonu (9.3 mm) *S. mutans*'a karşı belirlendi. Petrilerde ölçülen inhibisyon zonları TiO_2 nanopartikülünün bakteri türlerine karşı zayıf inhibitörük etkiye sahip olduğunu ayrıca *C. albicans*'a karşı antifungal aktivite göstermediklerini ortaya koymuştur. TiO_2 parçacıklarının bakterisidal etkisini açıklayan birkaç muhtemel mekanizma vardır. TiO_2 , güneş ışığına veya UV ışığına maruz bırakıldığında güçlü oksitleyici özelliği nedeniyle antimikrobiyal aktivite gösterir. Mikrobiyal yüzey, ışınlanmış TiO_2 parçacıkları ile temas ettiğinde başlangıçtaki oksidatif atağın ana hedefi olur (10,20) Ayrıca TiO_2 parçacıkları üzerinde oluşturulan H_2O_2 miktarının çeşitli bakteri türlerine karşı antibakteriyel aktivite gücünü etkilediği rapor edilmiştir (13,20).

Nanoteknolojiye teknolojik faydaları açısından baktığımızda, laboratuvarından büyük ölçekli endüstriyel üretime hızla geçmeye başladıkça, artık tüm biyomedikal uygulamalarda nanomalzemelerin oldukça gözde olduğu görülmektedir. Günümüzde TiO_2 NP'ler, optik özellikleri, yüksek kimyasal stabilite ve toksik olmamaları nedenleriyle çevreye uyumlu ve temiz bir fotokatalist olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Özellikle TiO_2 NP'ler, cilt bakım ürünlerinde cildi UV ışınlarından korumada kullanılan en önemli materyallerinden biridir. Sonuç olarak bu çalışma, *P. arrhizus*- TiO_2 NP'lerin çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları üzerinde etkinliğinin yüksek olmadığını ancak antimikrobiyal aktivite testlerinin farklı konsantrasyonlarda ve yaygın diğer patojen mikroorganizma türlerinde daha detaylı bir şekilde uygulanması gerektiğini önermektedir.

Kaynaklar

1. Abdelrahim SI, Almagboul AZ, Omer ME, Elegami A. Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. Fitoterapia 2002; 73(7-8): 713-5.
2. Ahmad A, Mukherjee P, Senapati P, Mandal D, Islam Khan M, Kumar R, Sastry M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. Colloid Surf B 2003; 28

- (4): 313-8.
3. Arangasamy L, Munusamy V. Tapping the unexploited plant resources for the synthesis of silver nanoparticles. *Afr J Biotechnol* 2008; 7(17):3162-5.
 4. Boh B, Berovic M, Zhang J, Zhi-Bin L. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically Active compounds. *Biotechnol Annu Rev* 2007; 13: 265-301.
 5. Catauro M, Raucci MG, De Gaetano FD, Marotta A. Sol-gel processing of drug delivery materials and release kinetics. *J Mater Sci Mater Med* 2005; 16(3):26 1-5.
 6. Chandran SP, Chaudhary M, Pasricha R, Ahmad A, Sastry M. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloe vera* plant extract. *Biotechnol Prog* 2000; 22: 577-83.
 7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Tenth Edition. M02-A10, PA/USA: Wayne, 2009.
 8. Crabtree JH, Brruchette RJ, Siddiqi Ra, Huen IT, Handott LL, Fishman A. The efficacy of silver-ion implanted catheters in reducing peritoneal dialysis-related infections. *Perit Dial Int* 2003; 23(4): 368-74.
 9. Duran N, Marcato PD, Alves OL, De Souza GIH, Esposito E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J Nanobiotechnol* 2005; 3: 8-14.
 10. Foster AH, Sheel WD, Sheel P, Evans P, Varghese S, Rutschke N, et al. Antimicrobial activity of titania/silver and titania/copper films prepared by CVD. *J Photochem Photobiol A* 2010; 216: 283-9.
 11. Gerhardt L-C, Jell GMR, Boccaccini AR. Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles filled polyD, L-lactid acid (PDLLA) matrix composites for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18(7): 1287-98.
 12. Gong XQ, Selloni A. Reactivity of anatase TiO₂ nanoparticles: The role of the minority (001) surface. *J Phys Chem* 2005; 109(42): 19560-2.
 13. Howard A, Foster IB, Ditta S, Varghese AS. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *App Microbiol Biotechnol* 2011; 90: 1847-68.
 14. Huang J, Li Q, Sun D, Lu Y, Su Y, Yang X, Wang H, Wang Y, Shao W, He N, Hong J, Chen C. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology* 2007; 18: 105104-14.
 15. Jha AK, Prasad K, Kulkarni AR. Synthesis of TiO₂ nanoparticles using microorganisms. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009; 71(1): 226-9.
 16. Joerger R, Klaus T, Granqvist CG. Biologically produced silver-carbon composite materials for optically functional thin-film coating. *Adv Mater* 2001; 12: 407-9.
 17. Kirthi AV, Rahuman AA, Rajakumar G, Marimuthu S, Santhoshkumar T, Jayaseelan C, Elango C, Abduz Zahir A, Kamaraj C, Bagavan A. Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using bacterium *Bacillus subtilis*. *Mater Lett* 2011;65 (17): 2745-7.
 18. Krolkowska A, Kudelski A, Michota A, Bukowska J. SERS studies on the structure of thioglycolic acid monolayers on silver and gold. *Surf Sci* 2003; 532-535: 227-32.
 19. Li S, Shen Y, Xie A, Yu X, Qiu L, Zhang L, Zhang O. Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L.extract. *Green Chem* 2007; 9: 852-58.
 20. Maness PC, Smolinski S, Blake DM, Huang Z, Wolfrum EJ, Jacoby WA. Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: Toward an understanding of its killing mechanism. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4094-8.
 21. Manzi P, Gambelli L, Marconi S, Vivanti V, Pizzoferrato L. Nutrients in edible mushroom: an inter-species comparative study. *Food Chem*, 1999; 65: 477-82.
 22. Marx DH. Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Can J Microbiol* 1977; 23: 217-33.
 23. Maurya A, Chauhan P, Mishra A, Pandey AK. Surface functionalization of TiO₂ with plant extracts and their combined antimicrobial activities against *E. faecalis* and *E. coli*. *J Res Updates Polym Sci* 2012; 1(1): 43-51.
 24. Mboniyirivuze A, Omollo I, Ngom BD, Mwakikunga B, Dhlamini SM, Park E, Maaaza M. Natural dye sensitizer for Grätzel cells: *Sepia melanin*. *PMC* 2015; 3(1): 1-6.
 25. Nair B, Pradeep T. Coalescence of nanoclusters and the formation of sub-micron crystallites assisted by *Lactobacillus* strains. *Cryst Growth Des* 2002; 2: 293-8.
 26. Rajakumar G, Rahuman AA, Priyamvada B, Khanna VG, Kumar DK, Sujin PJ. *Eclipta prostrata* leaf aqueous extract mediated synthesis of titanium dioxide nanoparticles. *Mater Lett* 2012; 68: 115-7.

27. Salata O. Application of nanoparticles in biology and medicine. J Nanobiotechnol 2004; 2(3): 3-6.
28. Shankar SS, Rai A, Ahmad A, Sastry MJ. Rapid synthesis of Au, Ag and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. J Colloid Interf Sci 2004; 275(2): 496-502.
29. Singh N, Chatterjee A, Chakraborty K, Chatterjee S, Abraham J. Cytotoxic effect on MG-63 cell line and antimicrobial and antioxidant properties of silver nanoparticles synthesized with seed extracts of *Capsicum sp.* Rec Nat Prod; 2016: 10 (1): 47-57.
30. Singhal G, Bhavesh R, Kasariya K, Sharma AR, Singh RP. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum sanctum* (Tulsi) leaf extract and screening its antimicrobial activity. JNR 2011; 13 (7): 2981-8.
31. Solak MH, Kalmis E, Saglam H, Kalyoncu F. Antimicrobial activity of two wild mushrooms *Clitocybe alexandri* (Gill.) Konr. and *Rhizopogon roseolus* (Corda) T.M. fries collected from Turkey. Phytotherapy Research, 2006;20: 1085–87.
32. Thamima M. Karuppuchamy S. Biosynthesis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles from natural sources: A review. ASEM 2014; 6: 1-8.
33. Zhao G, Stevens JS. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. Biometals 1998; 11(1): 27-32.



Koç ve Boğa Abomazumunda Progesteron Reseptörünün İmmunlokalizasyonu

Narin LİMAN¹, Ergül ERGEN¹, Ural Kemal KAVRAAL¹, Zela KARAKOÇ²

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

²Siirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Siirt-TÜRKİYE

*Sorumlu yazar: Narin LİMAN; E-posta: narinliman@gmail.com; ORCID:0000-0001-5489-2719

Atif yapmak için: Liman N, Ergen E, Kavraal UK, Karakoç Z. Koç ve boğa abomazumunda progesteron reseptörünün immunlokalizasyonu. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(3): 162-169.

Özet: Progesteron (P4) memeli ovaryumunda korpus luteum tarafından üretilen, hem dişi ve erkek üreme sistemlerinde hem de reproduktif olmayan doku ve organlarda çeşitli fonksiyonlar üstlenir. P4 hedef dokulardaki etkilerini, progesteron reseptörü (PR) adı verilen spesifik hücre içi reseptörler aracılığıyla gerçekleştirir. Çeşitli çalışmalar PR'lerinin hem normal sağlıklı hem de kanserli mide dokularında ekspres edildiğini ve mide mukozasının progesteron eylemi için hedef doku olduğunu ortaya koymaktadır. PR ekspresyonu insan, fare, rat ve mongol gerbil midesinde rapor edilmesine rağmen koç ve boğa midelerinde bu reseptörün varlığına dair çalışma bulunmamaktadır. Sunulan çalışmanın amacı PR'ünün erişkin koç ve boğa abomazumlarının kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinde ekspres edilmediğini, PR ekspresyonunun mide bölümlerinin yapısal özelliklerine bağlı bir değişim gösterip göstermediğini immunohistokimyasal yöntemle belirlemek ve PR'ünün olası rolünü değerlendirmektir. Çalışmamızda her iki türün abomazum bölümlerinde yüzey epitel hücreleri hariç, foveola gastrika'yı örten epitel hücrelerinde ve lamina propriadaki bez epitel hücrelerinde PR'ünün çekirdekten ziyade sitoplazmik ve membransel yerleşim gösterdiği tespit edildi. Koç abomazumunun kardiya bölümünde de bulunduğu gözlenen pariyetal hücreler ile her iki türün fundus bölgesindeki pariyetal hücrelerde PR immunreaksiyonunun kuvvetli sitoplazmik olduğu gözlemlendi. Pylorus bölgesinde foveola gastrika epitel hücrelerinin ve müköz bez epitel hücrelerinin bazal sitoplazmalarının ve lateral membranlarının PR için pozitif boyanma sergiledikleri görüldü. Bunların yanı sıra koç ve boğa abomazumlarının her üç bölümünde tunika muskularisi oluşturan düz kas hücrelerinde, lamina propria ve tunika muskularisdeki kan damarlarının endotel ve düz kas hücrelerinde sitoplazmik PR immunreaksiyonu tespit edildi. Sonuç olarak bu bulgular progesteronun, koç ve boğa midelerinde çeşitli biyolojik süreçleri PR'leri aracılığıyla düzenlediğinin önemli bir kanıtı olabilir.

Anahtar kelimeler: Abomazum, boğa, immunohistokimya, koç, progesteron reseptörü

The Immunolocalization of Progesterone Receptor in the Abomasum of Ram and Bull

Summary: Progesterone (P4), which is produced by the corpus luteum in the mammalian ovary, undertakes various functions in both female and male reproductive systems as well as non-reproductive tissues and organs. P4 effects the effects of target tissues via specific intracellular receptors called progesterone receptor (PR). Several studies have demonstrated that PR is expressed in both healthy and cancerous stomach tissues and that the gastric mucosa is the target tissue for progesterone action. Although PR expression is reported in human, mouse, rat and mongol gerbil stomach, there is no study of the presence of this receptor in rams and bull abomasum. The purpose of the present study was to investigate whether PR is expressed in adult ram and bull abomasum, and whether the PR expression exhibits a change depending on the structural properties of the abomasum regions, i.e. the cardia, fundus and pylorus using immunohistochemistry, and to evaluate the possible function of PR. In both species, the epithelial cells lining the foveola gastrica and the epithelial gland cells in the lamina propria, except for surface epithelial cells, exhibited cytoplasmic and membranous immunostaining for PR. The parietal cells of the fundus region in the abomasum of both species and of the cardia region of ram abomasum displayed strongly cytoplasmic PR immunoreactivity. The basal cytoplasm and lateral membranes of the epithelial cells in the foveola gastrica and the epithelial cells of mucous gland in the pylorus region showed positive staining for PR. In addition, cytoplasmic PR immunoreactivity was detected in the smooth muscle cells of tunica muscularis and in the endothelial and smooth muscle cells of blood vessels in the abomasum wall. As a result, these findings may be an important proof that P4 regulates biologically distinct processes in abomasum of ram and bull through the action of the PRs.

Key words: Abomasum, bull, immunohistochemistry, progesterone receptor, ram

Giriş

Progesteron (P4) dişilerde ovaryumda korpus luteum tarafından üretilen ve hem dişi hem de erkek repro-

düktif sistemde merkezi rol oynayan steroid yapıda bir hormondur (30). Dişilerde ovulasyon, implantasyon, desidualizasyon, doğum ve meme gelişimi gibi temel olayları tetikler (11). Erkeklerde ise spermatogenez, akrozom reaksiyonu ve testosteron biyosentezini kontrol eder (19). Menstrual döngüde ve hamileli-

ğin erken evlerinin sürdürülmesinde önemlidir. Aynı zamanda bazı kanserlerin büyümesinde de rol oynayabilir. P4, reproduktif olmayan doku ve organlarda da çeşitli fonksiyonlar üstlenir. Karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması üzerinde önemli etkiye sahip olup (13), örneğin pankreasda Langerhans adacıklarına doğrudan etki ederek hiperinsülinemiye indüklerken, karaciğerde glikojen depolanmasını teşvik eder (13). P4 mineralokortikoid reseptörler (MR) için yüksek bağlanma afinitesi nedeniyle güçlü bir MR antagonistidir ve MR için doğal ligand olan aldosteron ile rekabet ederek böbrekte mineralokortikoidlerin fonksiyonunun düzenlenmesine katılır (23). P4 gastrointestinal sistemde besin ve minerallerin ara metabolizması ve emilimi ile ilişkilidir. (9). Bunların yanısıra belirli kanser türlerinin patolojisinde de önemli rol oynar (4,15,20).

P4 hedef dokulardaki etkilerini, progesteron reseptörü (PR) adı verilen nüklear reseptör ailesinin üyeleri olan spesifik hücre içi reseptörler aracılığıyla gerçekleştirir (3). PR, benzer genler tarafından kodlanan fakat farklı promotörler tarafından düzenlenen PR-A (72-94 kDa) ve PR-B (108-120 kDa) olmak üzere iki ana izoforma sahiptir (2). PR'nin uterus (2), ovaryum (10), meme (26), testis (1) beyin (5), kalp ve damarlar (12), endokrin pankreas (7) ve midede (6,25) eksprese edildiği çeşitli raporlarla ortaya konmuştur. PR'lerinin midedeki ekspresyonlarına ilişkin çalışmalar daha çok mide kanserleri üzerine odaklanmış olup, bu çalışmalar P4'ün ve PR'lerinin mide kanserinin patolojisinde önemli rol oynadığını göstermektedir (15,20). Ayrıca bu çalışmalar PR'lerinin hem normal sağlıklı hem de kanserli mide dokularında eksprese edildiğini bu nedenle de mide mukozasının progesteronun eylemi için hedef doku olduğunu ortaya koymaktadır. PR ekspresyonu sağlıklı insan, fare, rat ve mongol gerbil midesinde rapor edilmesine rağmen (25) ruminant türlerinden koç ve boğa midelerinde bu reseptörün varlığına dair bir herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ruminantlar 4 odacıklı mide yapısına sahip olup ilk 3 bölme "ön mide" olarak adlandırılan rumen, retikulum ve omazumdan oluşur. Son kısım ise "abomazum" olarak adlandırılan gerçek mide bölümü olup ruminant midelerinin %7'sini oluşturur. Abomazum diğer memeli hayvanların glanduler mide yapısına benzer olarak kardiya, fundus ve pilorus olmak üzere 3 bölüme ayrılır (21). Abomazum gıdaların kimyasal olarak parçalanmasından sorumlu olup hidroklorik asit, pepsin, müsin, rennin ve lipaz içeren mide özsuyunun salgılanmasından sorumludur. Ayrıca rumenden gelen bakterilerin hücre duvarlarının yıkımından sorumlu olan lizozim enzimini de salgılar (21).

Bu çalışmanın amacı PR'ünün erişkin koç ve boğa abomazumlarının kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinde eksprese edilip edilmediğini ve PR ekspresyonunun mide bölümlerinin yapısal özelliklerine bağlı bir değişim gösterip göstermediğini immunohistokim-

yasal yöntemle belirlemek ve bu bağlamda PR'ünün olası rolünü değerlendirmektedir.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada özel mezbahalarda kesilen 24 aylık boğa (n=10) ve 12 aylık koçların (n=10) herhangi bir lezyon veya parazit enfeksiyonu bulunmayan sağlıklı abomazumlarının kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinden alınan, formol-alkol solüsyonu ile tespit edilen ve takiben rutin histolojik işlemlerden geçirilerek parafine gömülen doku örnekleri kullanıldı. Farklı mide bölümlerine (kardiya, fundus ve pilorus) ait her bir örnekten, lam üzerinde en az iki adet kesit olacak şekilde 5'er µm kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitlerin bir serisi abomazum bölümlerinin yapısal özelliklerini incelemek için Mallory'nin modifiye üçlü boyaması ile, diğer serisi ise PR lokalizasyonunu belirlemek için immunohistokimyasal yöntemle boyandı. İmmünohistokimya (IHC), Thermo Scientific immün boyama kitinde bildirilen prosedüre uygun olarak gerçekleştirildi (Thermo Scientific, katalog no: TA-125-HL). Özetle; kesitler, 5'er dakika (iki kez) ksilen içerisinde deparafinize edildikten sonra dereceli etanol serilerinden geçirilerek distile suya kadar getirildi. Antikoron bağlanacağı antijenik bölgelerin açığa çıkarılması amacı ile kesitler, sitrat çözeltisi (pH: 6) içerisinde 95°C'de 30 dk tutuldu ve süre sonunda oda ısısına gelinceye kadar aynı solüsyon içinde bekletildi. Dokudaki endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak amacıyla kesitler metanolde hazırlanmış %3'lük H₂O₂ solüsyonu içerisinde 20 dk bekletildikten sonra 5'er dk (üç kez) PBS (phosphate buffer saline, pH: 7.4, 0.01 M) çözeltisinde yıkama yapıldı. Preparatlar daha sonra, primer antikoron spesifik olmayan bağlanmalarını önlemek amacı ile bloklayıcı solüsyona (Thermo Scientific, katalog no: TA-125-UB) 5 dk maruz bırakıldı ve takiben PBS'de üç kez yıkılarak solüsyonun uzaklaşması sağlandı. PR antikoru (SantaCruz, katalog no: sc-539, dilüsyon oranı: 1/100) her bir kesit üzerine damlatıldı ve +4°C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün kesitler 5'er dk (üç kez) PBS içerisinde yıkandıktan sonra oda ısısında 20 dk biyotin işaretli sekonder antikör (Thermo Scientific, katalog no: TA-125-BN) ile muamele edildi. Daha sonra 5'er dk (5 kez) PBS içerisinde yıkamayı takiben kesitlere oda ısısında 20 dk süreyle streptavidin peroksidaz (Thermo Scientific, katalog no: TA-125-HR) uygulandı. Son olarak kesitler üzerine 3.3 diaminobenzidin (DAB, ThermoScientific, katalog no: TA-125-HDX) damlatılarak 5 dk bekletildi. Takiben distile suda 5'er dk (üç kez) yıkanan kesitler Gill'in Hematoksilin solüsyonunda 5 dk bekletilerek çekirdeklerin boyanması sağlandı. Akan çeşme suyu altında 5 dk boyunca yıkanan kesitler artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidre edildi ve ksilen içerisinde parlatıldıktan sonra entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı.

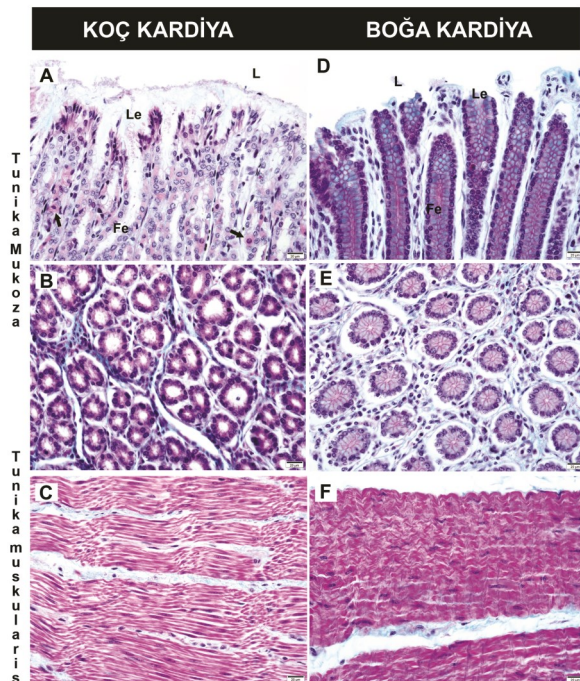
IHC prosedürlerinin özgünlüğü, negatif ve pozitif

kontrol dokuları kullanılarak test edildi. Pozitif kontrol olarak insan kolon ve meme bezi, sığır uterus örneklerine ait arşiv bloklardan alınan kesitler kullanıldı. Negatif kontroller için alınan abomazum örnekleri primer antikor yerine PBS veya normal rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-2027) ile inkube edildi. Tüm örnekler aynı protokol uygulandı. Abomazum bölümlerindeki PR immunreaksiyonu, ışık mikroskopunun farklı objektif büyütme (10X, 20X ve 40X) kullanılarak boyanma yoğunluğuna dayalı bir yarı-kantitatif skorlama yöntemi ile değerlendirildi. Negatif boyama için -, zayıf boyanma için +, orta derecede boyanma için ++ ve güçlü boyanma için +++ olmak üzere dört yoğunluk seviyesi belirlendi. Her abomazum bölümünün tamamı taranarak pozitif boyanmış doku ve hücreler iki bağımsız değerlendirici (NL ve EE) tarafından değerlendirildi ve iki değerlendiricinin ortalama skoru hesaplandı. Değerlendirmeler abomazumun her bir bölümünde tunika mukozanın bileşenlerinde (yüzey epiteli, foveola epiteli, pariyetal hücreler ile lamina muskularis) ve tunika muskularisinde yapıldı.

Bulgular

Koç ve boğa abomazumlarının yapısal özellikleri

Koç ve boğa abomazumlarının kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinin yapısal özellikleri şekil 1, 2 ve 3'de gösterilmiştir. Abomazumun her üç bölümünde de



Şekil 1. Koç ve boğa abomazumunda kardiya bölgesi. **A ve D:** Yüzey epiteli (**Le**) ve foveola gastrika (**Fe**), **B ve E:** Kardiya bezleri, **C ve F:** Tunika muskularis. **L:** Lümen, **kalın ok:** Pariyetal hücre. Mallory'nin modifiye trikrom boyaması. Bar: 20 µm

luminal epitelin (lamina epitelyalis) tek katlı prizmatik epitelten oluştuğu (Şekil 1-A, D, 2-A, D ve 3-A, D), lamina propriyanın kardiya, fundus ve pilorus bezleri ile dolu olduğu gözlemlendi (Şekil 1-B, E, 2-B, E ve 3-B, E). Kardiya bezlerinin seröz (Şekil 1-B, E), fundus (Şekil 2-B, E) ve pilorus bezlerinin (Şekil 3-B, E) ise müköz karakterde salgı yapan hücrelerden oluştuğu belirlendi. Boğada fundus bölgesindeki bezlerde ayrıca asidofilik sitoplazmalı pariyetal hücrelerinin bulunduğu görüldü (Şekil 2-B). Bununla birlikte koçta pariyetal hücrelerin hem kardiya hem de fundus bölgesindeki bezlerde ve ayrıca foveola gastrica epitellerinde gözlemlendiği ve bu hücrelerin kardiya bölgesinde az sayıda olduğu, fundus bölgesinde ise bez epitel hücrelerinin çoğunluğunu oluşturduğu tespit edildi (Şekil 2-E). Boğada fundus bezlerindeki pariyetal hücre sayısı koç abomazumunun fundus bölgesine kıyasla daha az sayıda bulundu. Bezlerin hemen altında longitudinal seyirli düz kas hücrelerinden yapılmış lamina muskularis ve onun altında da dar bir submukozanın varlığı belirlendi. Abomazumun bütün bölümlerinde tunika muskularisin de düz kas hücrelerinden oluştuğu ve içte sirküler, dışta da longitudinal seyirli olduğu gözlemlendi (Şekil 1-C, F, 2-C, F ve 3-C, F).

Koç ve boğa abomazumlarında PR'ünün lokalizasyonu

Koç ve boğa abomazumlarının kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinde PR lokalizasyonu immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmiş olup yarı kantitatif değerlendirme sonuçları tablo 1'de PR lokalizasyonuna ilişkin örnek gösterimler ise şekil 4, 5 ve 6'da sunulmuştur.

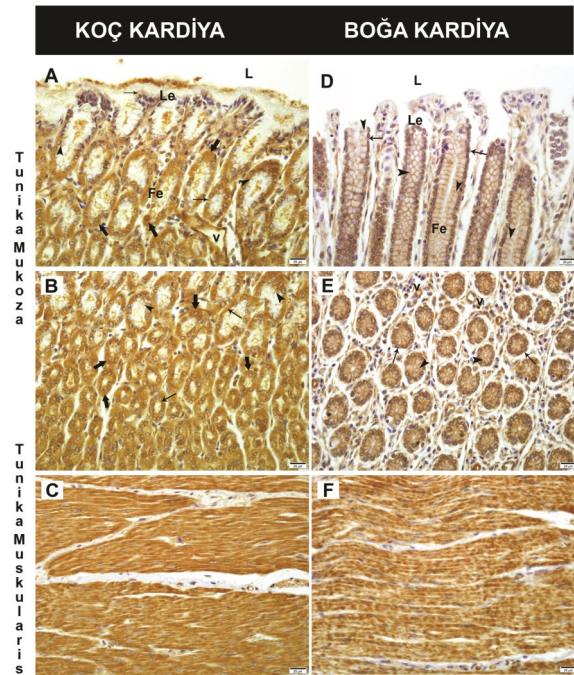
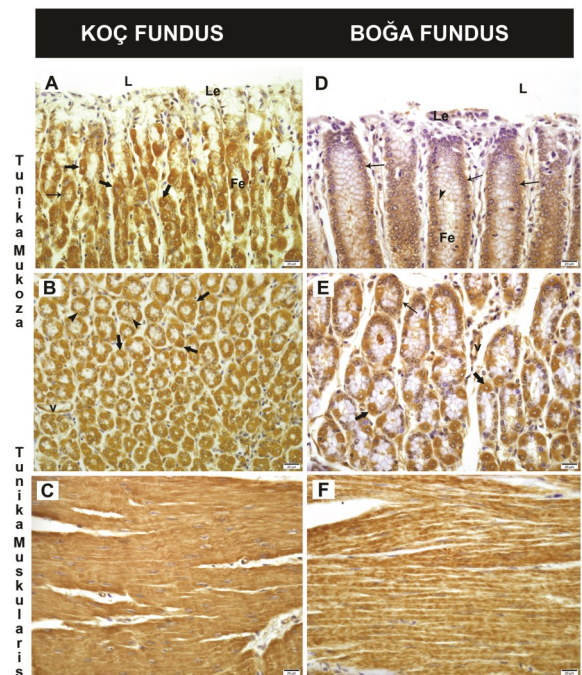
Hem boğa hem de koçta her üç abomazum bölümünde yüzey epitel hücrelerinde PR için boyanmanın negatif olduğu gözlemlendi (Şekil 4-A,D, 5-A,D ve 6-A,D). Boğada kardiya bölgesinde foveola gastrika'yı örten epitel hücrelerinde kuvvetli pozitif membransel, lamina propriyadaki bez epitel hücrelerinde ise kuvvetli pozitif membransel ve orta derecede pozitif sitoplazmik boyanma saptandı. PR pozitif membransel boyanma hücrelerin birbirlerine bakan lateral yüzlerinde yerleşmişti (Şekil 4-B). Koç abomazumunun kardiya bölgesinde ise foveola gastrika'yı örten epitel hücrelerinde ve bez epitel hücrelerinde kuvvetli pozitif membransel ve sitoplazmik boyanma ile pariyetal hücrelerde kuvvetli sitoplazmik boyanma dikkati çekti (Şekil 4-E).

Her iki türde fundus bölgesinde, kardiya bölgesindeki reaksiyona benzer olarak yüzey epitelinde boyanma saptanmazken (Şekil 5-A,D), boğada foveola gastrika epitel hücrelerinde, fundus bezlerinde bez epitel hücrelerinde orta derecede membransel ve sitoplazmik, pariyetal hücrelerde ise kuvvetli sitoplazmik boyanma gözlemlendi (Şekil 5-B). Koçta foveola gastrika epitel hücreleri ile bez epitelinde orta derecede pozitif membransel ve sitoplazmik bir boyanma gözlemlenirken,

Tablo1. Koç ve boğa abomazumlarının kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinde PR lokalizasyonu

| Abomazum bölümleri ve katmanları | | Koç | Boğa |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|----------------|
| Kardiya | Tunika mukoza | Yüzey epiteli | - |
| | | Foveala epiteli | m: +++; s: +++ |
| | | Pariyetal hücre | +++ |
| | | Bez epiteli | m: +++; s: +++ |
| | | Lamina muskularis | s: +++ |
| Fundus | Tunika mukoza | Yüzey epiteli | - |
| | | Foveala epiteli | m: ++; s: ++ |
| | | Pariyetal hücre | s: +++ |
| | | Bez epiteli | m: ++; s: ++ |
| | | Lamina muskularis | s: +++ |
| Pilorus | Tunika mukoza | Yüzey epiteli | - |
| | | Foveala epiteli | m: ++; s: +++ |
| | | Bez epiteli | m: ++; s: +++ |
| | | Lamina muskularis | s: +++ |
| Kardiya | Tunika muskularis | | |
| Fundus | | s: +++ | s: +++ |
| Pilorus | | | |

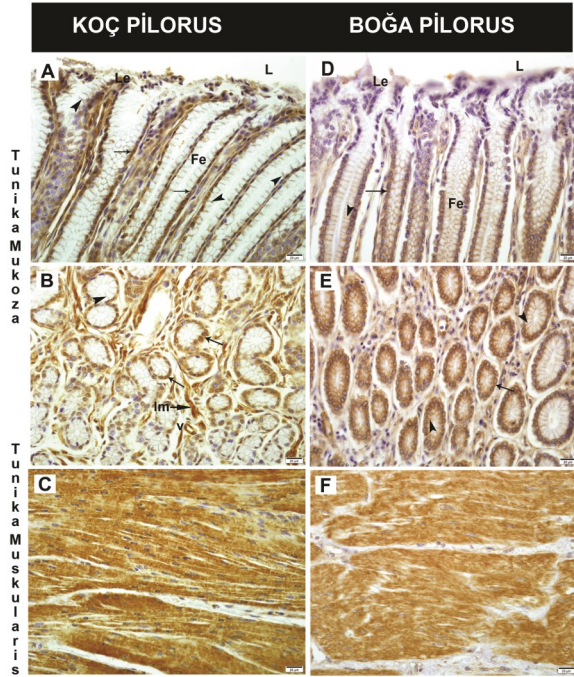
s: sitoplazmik boyanma, m: membransel boyanma

**Şekil 4.** Koç ve boğa abomazumunda kardiya bölgesinde PR immunlokalizasyonu. **A ve D:** Yüzey epiteli (**Le**) ve foveola gastrika (**Fe**), **B ve E:** Kardiya bezleri, **C ve F:** Tunika muskularis, **L:** Lümen, **kalin ok:** Pariyetal hücre, **ok başı:** PR'ünün membransel lokalizasyonu, **ince ok:** PR'ünün sitoplazmik lokalizasyonu, **v:** kan damarı. Strep-Avidin-Biotin Peroksidaz immunohistokimya boyaması. Bar: 20 µm**Şekil 5.** Koç ve boğa abomazumunda fundus bölgesinde PR immunlokalizasyonu. **A ve D:** Yüzey epiteli (**Le**) ve foveola gastrika (**Fe**), **B ve E:** Fundus bezleri, **C ve F:** Tunika muskularis, **L:** Lümen, **kalin ok:** Pariyetal hücre, **ok başı:** PR'ünün membransel lokalizasyonu, **ince ok:** PR'ünün sitoplazmik lokalizasyonu, **v:** kan damarı. Strep-avidin-Biotin Peroksidaz immunohistokimya boyaması. Bar: 20 µm

fundus bölgesinde, foveola gastrikalardan başlayarak bezlerde yoğun olarak bulunan pariyetal hücrelerde ise kuvvetli sitoplazmik reaksiyon tespit edildi (Şekil 5 -E).

Her iki türün pilorus bölgesinde foveola gastrika epitel hücrelerinin ve bezlerdeki müköz karakterde salgı yapan bez epitel hücrelerinin bazal sitoplazmalarının ve lateral membranlarının PR için pozitif boyanma

sergiledikleri ve sitoplazmik boyanmanın membransel boyanmadan daha yoğun olduğu tespit edildi (Şekil 6-A, B, D, E).



Şekil 6. Koç ve boğa abomazumunda pilorus bölgesinde PR immunlokalizasyonu. **A ve D:** Luminal epitel ve foveola gastrika, **B ve E:** Pylorus bezleri, **C ve F:** Tunika muskularis **L:** Lümen, **kalın ok:** Pariyetal hücre, **ok başı:** PR'ünün membransel lokalizasyonu, **ince ok:** PR'ünün sitoplazmik lokalizasyonu, **Im:** lamina muskularis. Strep-Avidin-Biotin Peroksidaz immunohistokimya boyaması. Bar: 20 µm

Abomazumun her üç bölümünde tunika muskularisi oluşturan düz kas hücrelerinin kuvvetli sitoplazmik PR immunreaksiyonu sergiledikleri gözlemlendi. Ayrıca gerek lamina propriyadaki ve gerekse tunika muskularisdeki kan damarlarının endotel ve düz kas hücreleri katmanlarında kuvvetli pozitif PR immunoreaksiyonu belirlendi (Şekil 4-C,F, 5-C,F ve 6-C,F).

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada koç ve boğa abomazumlarının kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinin morfolojik özellikleri ile bu bölgelerdeki PR'lerinin (PR-A ve PR-B) varlığı ve lokalizasyonları histolojik ve immunohistokimyasal olarak ilk kez incelendi.

Abomazum diğer memeli hayvanlardaki tek boşluklu basit midenin geviş getirenlerdeki karşılığı olup bezel mukozaya sahiptir ve basit midelerdekine benzer olarak kardiya, fundus ve pilorus olmak üzere üç bölüme ayrılır (21). Her bir bölümün mukozasında lamina propriya içine uzanan değişik uzunluklardaki foveola gastrika adı verilen girintiler bulunur. Lamina epi-

telyalis tek katlı prizmatik epitelten oluşur. Lamina propriyada mide bölümlerine özgü özelliklere sahip mide bezleri yer alır. Mide bezlerinin önemli yapısal bileşenlerinden biri, hidroklorik asit ve B12 vitamin bağlayıcı intrinsik faktör salgılamakla görevli olan pariyetal hücrelerdir (14). Sunulan çalışmada koç ve boğanın abomazumunun kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinin yapısal özellikleri karşılaştırmalı olarak incelenmiş olup bulgularımız hem koç hem de boğa abomazumlarının klasik literatür bilgiye paralel morfolojik özellikler sergilediğini göstermektedir. Ancak hem boğa hem de koç abomazumunun fundus bölgesinde lamina propriyada yer alan bezlerde pariyetal hücreler gözlenirken, koç fundusunda bu hücrelerin boğa fundusuna kıyasla sayıca daha fazla olduğu tespit edildi. Ayrıca koç abomazumunun kardiya bölgesinde yer alan bezlerde ve foveola gastrika epitel hücreleri arasında az sayıda pariyetal hücre varlığı göze çarptı. Bu bulgu bize gastrik asit sekresyonunun sadece fundus bezlerinde olmadığını kardiya bölgesinde de sekresyon yapıldığını, buna ek olarak koç fundusunda gastrik asit sekresyonunun boğa fundusuna oranla daha yoğun olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu bulgu iki ruminant türünde abomazumun yapısal özelliklerinin birbirlerinden az da olsa farklı olduğunu ortaya koymaktadır.

Gonadal steroid hormonlar, başta uterus, meme, ovaryum, testis, prostat ve kas dokuları olmak üzere çeşitli dokularda hücre büyümesini, hücre farklılaşmasını, protein birikimini ve karbonhidrat kullanımını düzenler. Sindirim sisteminde de besin ve minerallerin emilmesi ve ara metabolizmanın düzenlenmesi gibi fonksiyonlara sahip oldukları çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (9). Örneğin progesteron ve östrojen hormonlarının özofagusun alt sfinkter kaslarında gevşetici ve kolonda kolonik geçişi yavaşlatıcı etkisinin bulunduğu (9) ve ayrıca menstrüel siklus boyunca bu hormonların düzeylerinde oluşan değişimlerin dışkılama alışkanlıklarının değişmesine neden olduğu bilinmektedir (29). Bunların yanısıra kadınlarda menstrüel siklusun luteal fazında progesteron artışına bağlı olarak gastrointestinal geçiş süresinin yaklaşık %25 oranında uzadığı bildirilmiştir (29). Ratlarda yapılan bir çalışmada düşük doz progesteronun mide boşalmasını hızlandırdığı, yüksek dozların ise yavaşlattığı kanıtlanmıştır (17). Mongol gerbilde, erken *Helicobacter pylori* enfeksiyonuna yanıtta progesteron hormonunun gastrin salgılayan hücre sayısını azalttığı, proliferasyon indeksinde bir azalmaya neden olduğu ve apoptotik hızı artırarak gastrik hasara karşı koruyucu rol üstlendiği gösterilmiştir (24). Östrojen ya da progesteron hormonunun koç ve boğaların sindirim sistemleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak bu steroid hormonların koç ve boğaların midelerinde modüle edici bir etki göstermesi ve sindirim sisteminin fizyolojik aktivitesini etkilemesi olası görünmektedir.

Bilindiği üzere gonadal steroid hormonlar dokulardaki etkilerini spesifik hormon reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirirler. Bunlardan progesteron hormonunun etkilerine aracılık eden progesteron reseptörlerine ilişkin çalışmaların çoğu üreme sistemine odaklanmış olmakla birlikte, kardiyovasküler sistem (12) ve sinir sistemi (5) dahil olmak üzere çeşitli dokulardaki varlıkları bilinmektedir. Nitekim sindirim sisteminin de progesteron reseptörlerine sahip olduğu kavramı yeni değildir (6,25). Sindirim sisteminde steroid hormon reseptörlerinin kanserle ilişkisi hakkında birçok çalışma olsa da insanlarda progesteron reseptörlerinin normal midede ve kanserli midelerde ekspresyonlarının farklı olmadığı rapor edilmiştir (15). Bugüne değin sığırların sindirim sisteminde progesteron reseptörünün varlığını bildiren sadece bir araştırma bulunmakta olup, söz konusu çalışmada sığır sindirim sisteminde progesteron reseptörünün RT-PCR yöntemiyle ekspresyonu incelenmiş, progesteron reseptörü mRNA'sının mide ve bağırsaklarda çok düşük miktarlarda bulunduğu, rumen ve retikulumda eksprese edilemediği ancak omazum, abomazum ve duodenumda ekprese edildiği, duodenum haricindeki diğer bağırsak bölümlerindeki ekspresyonların farklılık göstermediği bildirilmiştir (22).

Yukarıda da belirtildiği gibi, PR'ünün mide dokularındaki ekspresyonuna ilişkin mevcut bilgi, esas olarak histolojik olmayan analiz yoluyla elde edilmiştir. Bu yöntemlerin başlıca dezavantajlarından biri, mRNA / protein ekspresyonu ve histolojik yapılar arasındaki karmaşık ilişkileri gözden kaçırmaları ve dolayısıyla reseptörün fonksiyonel analizini engellemeleridir. Sunulan çalışmada normal koşullar altındaki sığır ve koç abomazumlarında progesteron reseptörünün protein düzeyindeki ekspresyonu immünohistolojik olarak ilk kez incelendi ve reseptörün potansiyel fizyolojik fonksiyonları da elde edilen sonuçlara dayanarak tartışıldı. Pfaff ve ark. (2003) 'nın bildirdiğinin aksine, immünohistokimyasal bulgularımız, PR'lerinin koç ve boğa abomazumlarının mukoza ve kas katmanlarını oluşturan çeşitli yapısal bileşenler tarafından eksprese edildiğini göstermektedir. Çalışmamızda her iki türün abomazum bölümlerinde yüzey epitel hücreleri hariç, foveola gastrika'yı örten epitel hücrelerinde, lamina propriyadaki bez epitel hücrelerinde nükleer lokalizasyondan ziyade sitoplazmik ve membransel PR lokalizasyonu tespit edildi. PR'ünün, benzer genler tarafından kodlanan fakat farklı promotörler tarafından düzenlenen PR-A (72-94 kDa) ve PR-B (108-120 kDa) olmak üzere iki ana izoforma sahip olduğu bilinmektedir (2). PR-A genellikle hücre çekirdeğinde lokalize olmasına karşın, PR-B devamlı olarak nükleer ve sitoplazmik kompartımanlar arasında hareket halindedir. Bu karakteristiği nedeniyle PR-B doğrudan transkripsiyonel olaylara katılabilir veya nüklear olmayan sinyal yolları ile etkileşime girerek hızlı sitoplazmik değişimlere aracılık edebilir (4). Çalışmamızda kullandığımız PR primer antikoru (kat no:

sc-539, Santa Cruz Biotechnology) PR-A ve PR-B izoformlarının her ikisine karşı hazırlanmış olup sitoplazmik ve membransel immün boyanmalar boğa ve koç abomazumlarında PR-B izoformunun daha baskın şekilde eksprese edildiğinin bir göstergesi olarak yorumlanabilir.

Progesteronun nüklear olmayan etkinlikleri ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. Sitoplazmik protein kinazlarla doğrudan etkileşime girebilen ve aktive edebilen, genellikle steroid hormon reseptör süper ailesindeki bir ligand ile aktive edilmiş transkripsiyon faktörü, klasik progesteron reseptörünün ekstra nüklear veya membran ile ilişkili aktivitelerini gerçekleştirebilir. Bu reseptör yakın zamanda klasik PR ile ilgisi olmayan, membrana lokalize progesteron reseptörü (mPR) olarak tanımlanmıştır (8). Membrana lokalize progesteron reseptörünün üç alt tipi (mPR α , β ve γ) bulunmaktadır (8). Bunlardan mPR α ekspresyonu farede beyin, testis, uterus, kemik iliği, dalak, aksiller lenf düğümleri, karaciğer ve gastrointestinal kanalda (27,30), insanda, ovaryum, testis, uterus, meme, böbrek, adrenal bez, lenfoid dokular ile amniyon ve koryon keselerinde gösterilmiştir (8). Fare midesinde mPR α ekspresyonunun foveola epitelinde ve esas hücrelerde bulunmadığı, ancak pariyetal hücrelerde güçlü bir immunreaksiyonunun bulunduğu gösterilmiştir (30). Çalışmamızda fare midesinde bildirilenlerden farklı olarak her iki türün abomazum bölümlerinde foveola gastrikayı örten epitel hücrelerinde ve bez epitel hücrelerinde PR'ünün membransel lokalizasyonu bu reaksiyonun mPR'nden kaynaklanabileceği fikrini akla getirmektedir. Ancak kullandığımız primer antikoru yalnızca PR-A ve PR-B izoformlarını taşıdığından dolayı bu hipotezi kesin olarak kanıtlayabilmek için membransel progesteron reseptörüne spesifik mPR antikoru kullanılarak immünohistokimya analizinin yapılması gereklidir.

Genel olarak, gebelik sırasında peptik ülser hastalığı nadiren görülür. Bunun nedeninin gebelik süresince yüksek progesteron hormon düzeyi olduğuna inanılmaktadır. Yüksek progesteron düzeyinin gastrik asit çıkışını azaltabildiği ve koruyucu mukus üretimini artırdığı ileri sürülmektedir (18). Ayrıca midede pariyetal hücrelerin asit üretiminin yanı sıra steroidogenik aktiviteye de sahip oldukları, östrojen, progesteron ve testosteron metabolitlerini salgıladıkları (16), bu nedenle de seksüel hormonların hepatik-gastrik aksının düzenlenmesinde önemli rolleri olduğu bilinmektedir (28). Çalışmamızda ilginç bir şekilde, PR'ünün her iki türün pariyetal hücrelerinde yoğun bir şekilde eksprese edildiğinin saptanması, erkek hayvanlarda da progesteronunun PR sinyalleme yoluyla gastrik asit sekresyonunu kontrol etmede doğrudan bir role sahip olabileceğine ve ayrıca pariyetal hücrelerin steroidojenik aktivitelerini PR aracılığıyla sürdürebileceğine dair yeni kanıtlar sağlamaktadır.

Fare midesinde bildirilenlere (30) paralel olarak çalış-

mamızda da koç ve boğa abomazumlarının tüm bölümlerinde tunika mukozanın lamina muskularisindeki düz kas hücreleri ile tunika muskularisi oluşturan sirküler ve longitudinal seyirli düz kas hücrelerinde PR için kuvvetli sitoplazmik bir immun boyanmanın bulunduğu gözlemlendi. Bu bulgu, progesteronun PR'ü aracılığıyla ruminant abomazumunda düz kas hücrelerinin mide tonusu ve motilitesinin düzenlenmesi gibi işlevlerine katıldığını gösterebilir.

Sonuç olarak koç ve sığır abomazumunun kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinde foveola, bez epiteli ve pariyetal hücreler ile lamina muskularis ve tunika muskularisi oluşturan düz kas hücrelerindeki PR'ünün ifade edildiğinin belirlenmesi, koç ve boğa midelerinin fizyolojik aktivitesinde progesteronun PR'leri aracılığıyla rol oynadığının önemli bir kanıtı olabilir.

Kaynaklar

1. Abid S, Gokral J, Maita A, meharji P, Kadam S, Pires E, Modi D. Altered expression of progesterone receptors in testis of infertile men. *Reprod Biomed Online* 2008; 17(2): 175-84.
2. Anzaldúa SR, Camacho-Arroyo I, Reyna-Neyra A, Perez- Martinez M, Cerbon M. Regional differences in expression of progesterone receptor in oviduct and uterus of rabbit during early pregnancy. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007; 147(3): 685-90.
3. Beato M, Herrlich P, Schutz G. Steroid hormone receptors: Many actors in search of a plot. *Cell* 1995; 83(6): 851-7.
4. Bellance C, Khan JA, Meduri G, Guiochon-Mantel A, Lombès M, Loosfelt H. Progesterone receptor isoforms PRA and PRB differentially contribute to breast cancer cell migration through interaction with focal adhesion kinase complexes. *Mol Biol Cell* 2013; 24(9): 1363-74.
5. Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Morgan TE, Pike CJ, Mack WJ, Stanczyk FZ, Nilsen J. Progesterone receptors: Form and function in brain. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29(2): 313-9.
6. Bruce LA, Beshudi FM. Progesterone effects on three regional gastrointestinal tissues. *Life Science* 1979; 25(9): 729-34.
7. Doglioni C, Gambacorta M, Zamboni G, Coggi G, Viale G. Immunocytochemical localization of progesterone receptors in endocrine cells of the human pancreas. *Am J Pathol* 1990; 137(5): 999-1005.
8. Dressing GE, Goldberg JE, Charles NJ, Schwertfeger KL, Lange CA. Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues; a review of regulation and physiological implications. *Steroids* 2011; 76(1-2): 11-7.
9. Eliakim R, Abulafia O, Sherer DM. Estrogen, progesterone and the gastrointestinal tract. *J Reprod Med* 2000; 45(10): 781-8.
10. Gava N, Clarke CL, Byth K, Arnett-Mansfield RL, deFazio A. Expression of progesterone receptors A and B in the mouse ovary during the estrous cycle. *Endocrinology* 2004; 145(7): 3487-94.
11. Gellersen B, Fernandes MS, Brosens JJ. Nongenomic progesterone actions in female reproduction. *Hum Reprod Update* 2009; 15(1): 119-38.
12. Ingegno MD, Moner SR, Thelmo W, Greene GL, Davidian M, Jaffe BM, Pertschuk LP. Progesterone receptors in the human heart and great vessels. *Lab Invest* 1988; 59(3): 353-6.
13. Kalkhoff RK. Metabolic effects of progesterone. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 142(6): 735-8.
14. Karakoç Z, Sagsöz H, Ketani MA. Mucin profiles of the abomasum in bulls and rams: A comparative study. *Microsc Res Techniq* 2016; 79(9): 856-68.
15. Karat D, Brotherick I, Shenton BK, Scott D, Raimes SA, Griffin SM. Expression of estrogen and progesterone receptors in gastric cancer: A flow cytometric study. *Br J Cancer* 1999; 80(8): 1271-4.
16. Le Goascogne C, Sananès N, Eychenne B, Gouézou M, Baulieu EE, Robel P. Androgen biosynthesis in the stomach: Expression of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase messenger ribonucleic acid and protein, and metabolism of pregnenolone and progesterone by parietal cells of the rat gastric mucosa. *Endocrinology* 1995; 136(4): 1744-52.
17. Liu CY, Chen LB, Liu PY, Xie DP, Wang PS. Effects of progesterone on gastric emptying and intestinal transit in male rats. *World J Gastroenterol* 2002; 8(2): 338-41.
18. Michaletz-Onody PA. Peptic ulcer disease in pregnancy. *Gastroenterol Clin North Am* 1993; 21(4): 817-26.
19. Oettel M, Mukhopadhyay AK. Progesterone: The forgotten hormone in men? *Aging Male* 2002; 7(3): 236-57.
20. Oshima CT, Wonraht DR, Catarino RM, Mattos D, Forones NM. Estrogen and progesterone receptors in gastric and colorectal cancer. *Hepatogast-*

roenterology 1999; 46(30): 3155-8.

21. Ozfiliz N, Tutuncu Ş, Erdost H. Immunohistochemical distribution of ghrelin positive cells in the abomasum of sheep. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2011; 58(1): 61-4.
22. Pfaffl MW, Lange IG, Meyer HH. The gastrointestinal tract as target of steroid hormone action: Quantification of steroid receptor mRNA expression (AR, ER, ER and PR) in 10 bovine gastrointestinal tract compartments by kinetic RT-PCR. J Steroid Biochem Mol Biol 2003; 84(2-3): 159-66.
23. Quinkler M, Bumke-Vogt C, Meyer B, Bahr V, Oelkers W, Diederich S. The human kidney is a progesterone-metabolizing and androgen-producing organ. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88(6): 2803-9.
24. Saqui-Salces M, Rocha-Gutierrez BL, Barrios-Payan JA, Ruiz-Palacios G, Camacho-Arroyo I, Gamboa-Dominguez A. Effects of estradiol and progesterone on gastric mucosal response to early *Helicobacter pylori* infection in female gerbils. Helicobacter 2006; 11(2): 123-30.
25. Saqui-Salces M, Neri-Gomez T, Gamboa-Dominguez A, Ruiz-Palacios G, Camacho-Arroyo I. Estrogen and progesterone receptor isoforms expression in the stomach of Mongolian gerbils. World J Gastroenterol 2008; 14(37): 5701-6.
26. Shyamala G, Chou YC, Louie SG, Guzman RC, Smith GH, Nandi S. Cellular expression of estrogen and progesterone receptors in mammary glands: Regulation by hormones, development and aging. J Steroid Biochem Mol Biol 2002; 80(2): 137-48.
27. Thomas P. Discovery of a new family of membrane progesterone receptors in vertebrates and detection of the alpha and beta subtypes in mouse brain, testis and uterus. Med Chem Res 2004; 13(3-4): 202-9.
28. Ueyama T, Shirasawa N, Numazawa M, Yamada K, Shelangouski M, Ito T, Tsuruo Y. Gastric parietal cells: Potent endocrine role in secreting estrogen as a possible regulator of gastro-hepatic axis. Endocrinology 2002; 143(8): 3162-70.
29. Wald A, Van Thiel DH, Hoechstetter L, Gavalier JS, Egler KM, Verm R, Scott L, Lester R. Gastrointestinal transit: The effect of the menstrual cycle. Gastroenterology 1981; 80(6): 1497-1500.
30. You S, Zuo L, Varma V. Broad tissue expression of membrane progesterone receptor alpha in normal mice. J Mol Hist 2010; 41(2-3): 101-10.



The Effects of Using Oregano and L-Carnitine on Second Phase Laying Performance Parameters of Force Molting Programs in Laying Hens

Abdil Burhaneddin AKKAYA¹, İsmail BAYRAM²

¹CB-İdeal Tarım Hayvancılık Ltd.Şt. Afyonkarahisar-TURKEY

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

*Corresponding author: İsmail BAYRAM; E-mail: ibayram1965@gmail.com; ORCID: 0000-0002-9993-7092

How to cite: Akkaya AB, Bayram İ. The effects of using oregano and L-carnitine on second phase laying performance parameters of force molting programs in laying hens. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(3): 170-177.

Summary: This study was carried out to use Oregano leaf and L-carnitine as an alternative feed additives in alfalfa flour or low Sodium-Calcium (Na-Ca) diet and to determine their effect on second phase laying period after force molting in commercial laying hens. A total of 1170 birds were divided into 13 groups which were further subdivided into 6 replicates having 15 birds in each. A negative control group (K) which was neither forced molted nor provided with any feed additive substances in their diets. Moreover, other three treatment groups (M: Marbel powder, A: Alfalfa, F: Low Ca -Na diet), were forced molted and one withhold feeding group was used for the study; the forced molted groups were supplied L-carnitine (C) (100 ppm) and Oregano leaves (O) (5%) as a feed additive in designed individual diets (MC, AC, FC, MO, AO, FO) alone and in combination (50 ppm; 2.5%) in groups (MCO, ACO, FCO). All hens were feeding with commercial feeds during the second laying phase. The trial was 98 days after 22 days of forcing stage. Performance parameters (except egg quality) were measured during 14 days periods. In the results, eggs yield values were found significantly higher (P<0.01) among the treatment groups over control group. It was concluded that supplementing L-carnitine and Oregano leaves could be used as an alternative feed additives in alfalfa meal during feed withdrawal period and their combination also showed a positive impact on laying performance in laying hens.

Key words: Egg yield, L-carnitine, laying hen, force molting, oregano

Zorlamalı Tüy Dökümü programlarında Kekik ve L-Karnitin Kullanılmasının Yumurta Tavuklarında İkinci Yumurtlama Periyodu Verim Parametreleri Üzerine Etkisi

Özet: Bu çalışma, ticari yumurta tavuklarının kekik yaprakları ve L-karnitin katkılı yonca unu veya düşük sodyum-kalsiyum (Na-Ca) içeriğine sahip rasyonlarla tüy dökümüne sokulması ve tüy dökümü sonrasında ikinci yumurtlama dönemi verim parametreleri üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Deneme, zorlanım uygulanmayan ve yem katkı maddeleri kullanılmayan bir negatif kontrol grubu (K); biri yem çekmeli olmak üzere 3 adet zorlamalı tüy dökümü metodu uygulanan deneme grupları (M: Mermer tozu, A: Yonca, F: Düşük Na-Ca içerikli yem), zorlanım uygulanan gruplara yem ilavesi olarak L-karnitin (C) (100 ppm) ve kurutulmuş kekik (O) (%5) yapraklarının belirlenen oranlarda ayrı ayrı (MC, AC, FC, MO, AO, FO) ve birlikte kullanıldığı (50 ppm; %2,5) gruplar (MCO, ACO, FCO,) olmak üzere, her grupta 6 tekrerrür ve tekrerrür gruplarında 15 adet hayvan olacak şekilde toplam 1170 adet yumurta tavuğunda ve 13 grupta yürütülmüştür. Denemede kullanılan tüm tavuklar ikinci verim döneminde ticari yumurta tavuğu yemiyle beslenmişlerdir. Araştırma, 22 günlük zorlanım süresi sonrasında 98 gün boyunca sürdürülmüştür. Performans parametreleri (yumurta kalite parametreleri dışında) 14 günlük periyotlar halinde ölçülmüştür. Gruplar arasındaki ortalama yumurta verimleri değerlendirildiğinde, FCO grubu haricinde tüm deneme gruplarının verimleri kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Araştırmada ölçülen tüm parametreler esas alındığında, sonuç olarak, yonca ununun, geleneksel yem çekme metoduna alternatif olabileceği, yonca unuyla yapılan tüy dökümü yöntemi sonrası verim döneminde rasyona ilave olarak L-karnitin ve kurutulmuş kekik yapraklarının bir arada katılmasının performans üzerine olumlu etkiler gösterebileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kekik, L-karnitin, yumurta tavuğu, yumurta verimi, zorlamalı tüy dökümü

Introduction

Forced molting is a method used to prolong the productive life of broiler and laying hens or to interrupt egg yield temporarily when egg prices are very low. Various methods are used for molting such as re-

stricting feed, restricting water and light, providing feed with inadequate calcium or sodium, adding elements such as aluminum, zinc and iodine, feeding only grain or cassava and administering various drugs and hormones (4,12,25). The traditional method of removing feed and water together or alone is the most commonly used method of short-term forced molting. Following the forced molting, a number of

Table 1. Composition of the experimental diets, kg/ton

| Feedstuffs | Negative control group (K)& second laying period ration of all groups | Low Na-Ca Diets (F groups) |
|--------------------------------|---|----------------------------|
| Corn grain | 371.81 | 381.33 |
| Wheat grain | 174.00 | 220.00 |
| Sunflower meal CP 36 % | 140.00 | 0.00 |
| Sunflower meal CP 28% | 0.00 | 150.00 |
| Barley grain | 0.00 | 30.00 |
| Rasmol | 30.00 | 90.00 |
| Soybean meal CP 48% | 34.00 | 94.00 |
| Full fat soy | 44.00 | 0.00 |
| Canola meal | 30.00 | 0.00 |
| Corn bran | 30.00 | 0.00 |
| DDGS (Corn) | 30.00 | 0.00 |
| Sunflower oil | 10.00 | 0.00 |
| Dicalcium phosphate | 6.74 | 7.50 |
| Marbel powder | 89.00 | 20.00 |
| Salt | 3.50 | 0.00 |
| L-Lysine HCl | 1.10 | 1.15 |
| DL-Methionine | 0.70 | 0.92 |
| Safizyme XP 20 [†] | 1.00 | 1.00 |
| Karzime P 500 ^{**} | 0.65 | 0.60 |
| Kavimix 23 15/5 ^{***} | 2.50 | 2.50 |
| Kavimix M 1 ^{****} | 1.00 | 1.00 |
| Analysed values | | |
| Crude protein% | 16.47 | 16.88 |
| Crude cellulose % | 5.01 | 6.06 |
| Crude ash % | 12.54 | 6.93 |
| Crude fat % | 4.27 | 3.14 |
| Dry Matter % | 88.58 | 88.53 |

* Endo-1,4-beta-xylanase, Kartal Kimya, Turkey: 1.400.000 U

** Phytase, Kartal Kimya, Turkey: 500.000 FTU/g

***Vitamin Premix, Kartal Kimya, Turkey: Each 2,5 kg Vitamin A: 12.000.000 IU, Vitamin D₃: 2.400.000 IU, Vitamin E: 30.000 mg, Vitamin K₃: 2.500 mg, Vitamin B₁: 3.000 mg, Vitamin B₂: 7.000 mg, Vitamin B₆: 4.000 mg, Vitamin B₁₂: 15 mg, Niacin: 40.000 mg, Ca-D-Pantothenate: 8.000 mg, Folic Acid: 1.000 mg, D-Biotine: 45 mg, Vitamin C :50.000 mg, Choline Cl. : 125.000 mg, Canthaxantin: 1.500 mg, Apo-Carotenoic acid ester: 500 mg include.

****Mineral Premix, Kartal Kimya, Turkey: Each 1 kg Manganese: 80.000 mg, Iron: 40.000 mg, Zinc: 60.000 mg, Copper: 5000 mg, Iodine: 400 mg, Cobalt: 100 mg Selenium: 150 mg include.

researchers have reported that eggs obtained in the second yield stage are heavier than those obtained in the first yield, an increase in shell breaking strength, an improvement in egg quality, especially in the Haugh unit (2,11,16). However, in forced-molted chickens, there are also studies of similar egg weight, yellow index and egg yolk color as well as non-molted chickens (27). It has been reported that alternative forced-molting methods can provide better living conditions for the birds and these chickens can go through the production period more comfortably during the rest period (19). Minoura et al. (21) reported that force molting made with wheat or rice bran improves egg production. In a study using forced molting methods, it has been shown that giving vitamin E to laying hens positively affects the immunity system (13). The number of studies dealing with the applicability of the oregano and L-carnitine and their products for forced molting are limited. In view of this in-

formation, due to the fact that conventional withdrawal forced molting method is not suitable for animal welfare. Therefore, this study has been carried out to comparison of alternative non feed withdrawal molting methods and withdrawal (fasting) methods in laying hens.

Material and Methods

A total of 1170 white laying hens (Lohmann LSL), 72 weeks old were used in this study. The study was carried out in the poultry unit of Kocatepe University Livestock Research Center (KUHAM). The experimental protocols were approved by the Animal Care and Ethical Committee at Afyon Kocatepe University (147-2008). The experimental rations (standard commercial laying hen feeds) was used during the adaptation and egg laying periods and also fed to the negative control group during the trial (molting phase) period. The feed was formulated according to NRC

Table 2. Experimental groups in force molting period

| Groups | Group Name | Molting Method | | Feed Additives | | Method&Water | |
|--------|------------|------------------|----------------------|-----------------|---------|---------------|------------|
| | | 0-11 day | 12-22 day | L-Carnitine HCl | Oregano | Method | Water |
| 01 | K | Negative Control | | No | No | No | Ad-libitum |
| 02 | M | | | No | No | | |
| 03 | MC | | | 100 ppm | No | | |
| 04 | MO | Marbel powder | Limited Barley grain | No | 5% | withdrawal | Ad-libitum |
| 05 | MCO | | | 50 ppm | 2.5% | | |
| 06 | A | | | No | No | | |
| 07 | AC | | | 100 ppm | No | | |
| 08 | AO | Alfalfa powder | Alfalfa powder | No | 5% | No withdrawal | Ad-libitum |
| 09 | ACO | | | 50 ppm | 2.5% | | |
| 10 | F | | | No | No | | |
| 11 | FC | | | 100 ppm | No | | |
| 12 | FO | Low Na, Ca Feed | Low Na, Ca Feed | No | 5% | No withdrawal | Ad-libitum |
| 13 | FCO | | | 50 ppm | 2.5% | | |

K:Negative control group, M: Marbel powder, MC: Marbel powder +Carnitine, MO: Marbel powder +Oregano, MCO: Marbel powder +Carnitine+Oregano A:Alfalfa, AC: Alfalfa+Carnitine, AO: Alfalfa+Oregano, ACO: Alfalfa+Oregano+ Carnitine F:Low Na-Ca, FC: Low Na-Ca+ Carnitine, FO: Low Na-Ca+Oregano, FCO: Low Na-Ca+ Oregano+ Carnitine

(23) (Table 1) and all experimental groups are shown in Table 2. The alfalfa and dried Oregano leaf (*Oreganum onites*) were used as powder form in the study. The alfalfa was obtained from Afyonkarahisar-Turkey as mixture of 1. 2. and 3. cuttings. Oregano leaf was purchased from Herba Gıda Ltd, İzmir-Turkey. L-carnitine was used as a premix with 50.000 mg L-carnitine HCL per one kilogram. There were 13 groups in the study. One was negative control group (K) and the others were trial groups (M, MC, MO, MCO, A, AC, AO, ACO, F, FC, FO, FCO). There were three main groups; 1-Marbel powder (M), 2-Alfalfa (A), 3-Low Na and Ca (F) respectively in the study. While feed withdrawal method applied to the marbel groups (M, MC, MO, MCO), it was not applied to the other groups (A, AC, AO, ACO, F, FC, FO, FCO). The groups were named according to whether they had received feed additives or not. The groups subjected to force molting were given L-carnitine (C) and Oregano leaf powder (O) as a feed additive separately (MC, AC, FC, MO, AO, FO) and together (MCO, ACO, FCO) to 6 replicas in each group having 15 animals in the replica groups (Table 2). The hens were distributed randomly into an apartment type cage system (50 cm length x 60 cm width x 56 cm high) with 5 animals in each cage. The study was performed in three different stages. The first 2 weeks was adaptation period, then 22 days was forced molting and the second laying period contained 14 weeks egg-laying period. During the forced molting period the molting trial groups were subjected to light restriction (there was no used artificial light) while the negative control group was kept under the same environmental conditions with no light restriction and

ensured 16 hours of light in their cages within the unit. All hens were provided ad libitum feed and water throughout the last period. The molting groups were given 100 ppm of L-carnitine HCl and 5% dried Oregano separately and 50 ppm of L-carnitine HCl and 2.5% dried Oregano together. During the study, deaths were recorded on a daily basis while molting period viability and yield period viability were calculated as percentage. Egg yields were recorded daily throughout the yield period for fourteen weeks while feed consumption and egg weights were recorded once every 14 days. At the beginning and end of the yield period, 3 eggs were collected from each subgroup (total 18 eggs) which were examined for egg shape index, egg weight, Haugh units, eggshell thickness and yolk color as an egg quality parameters (11,27). The feed used in the trial was analyzed according to AOAC procedures (3) (Table 1). Statistical analyses of the collected data were performed using one-way analysis of variance in the SAS statistical program (26) package program. Tukey test was applied on the data to assess importance.

Results

It was found that egg yield mean values showed a difference between the groups in whole yield period including the second yield period and the yields of all the experimental groups except FCO group were found significantly ($P<0.05$) higher than the control group (Table 3). When the study is assessed as a whole, it was observed that the egg weight varied significantly ($P<0.05$) between groups. Regarding feed consumption, it is observed that group ACO

Table 3. Egg production and egg weights of groups in the second laying cycle (0-98 days)

| Groups | Egg production % Molting stage 11-22.day Mean±SEM | Egg production % After molting 0-98.day Mean±SEM | Feed consumption (g/day) Mean±SE M | Feed conversion ratio (kg feed/kg egg mass) Mean±SEM | Egg weight(g) Mean±SE M | Mortality rate Molting stage (0-22 days) Mean±SEM | Mortality rate Second production cycle (0-98 days) Mean±SEM |
|----------|--|---|---|--|-------------------------------|--|---|
| K | 65.98 ^a ±1.47 | 64.38 ^e ±0.45 | 132.53 ^{abc} ±2.23 | 1.98 ^{cd} ±0.03 | 66.97 ^a ±0.27 | 2.22 ^{bc} ±1.41 | 1.05±0.40 |
| M | 0.00 ^d ±0.00 | 83.18 ^a ±0.48 | 135.55 ^{ab} ±1.87 | 2.09 ^{abc} ±0.03 | 64.90 ^{bcd} ±0.29 | 14.39 ^{ab} ±3.62 | 1.45±0.47 |
| MC | 0.00 ^d ±0.00 | 84.24 ^a ±0.50 | 132.14 ^{abc} ±2.26 | 2.03 ^{bcd} ±0.03 | 65.07 ^{bcd} ±0.34 | 12.22 ^{abc} ±2.05 | 0.98±0.42 |
| MO | 0.00 ^d ±0.00 | 83.77 ^a ±0.48 | 134.93 ^{ab} ±1.64 | 2.07 ^{abc} ±0.03 | 65.09 ^{bcd} ±0.38 | 8.89 ^{abc} ±2.81 | 0.38±0.27 |
| MCO | 0.00 ^d ±0.00 | 80.44 ^{bc} ±0.43 | 134.99 ^{ab} ±2.44 | 2.09 ^{abc} ±0.04 | 64.47 ^{cde} ±0.41 | 10.00 ^{abc} ±5.64 | 0.46±0.33 |
| A | 0.00 ^d ±0.00 | 80.37 ^c ±0.57 | 133.65 ^{abc} ±2.06 | 2.09 ^{abc} ±0.03 | 63.99 ^{cde} ±0.40 | 10.00 ^{abc} ±1.49 | 2.71±0.97 |
| AC | 0.00 ^d ±0.00 | 82.86 ^{ab} ±0.66 | 134.47 ^{abc} ±1.53 | 2.07 ^{abc} ±0.02 | 65.01 ^{bcd} ±0.27 | 12.22 ^{abc} ±1.11 | 1.23±0.68 |
| AO | 0.00 ^d ±0.00 | 82.77 ^{abc} ±0.56 | 135.60 ^{ab} ±2.41 | 2.13 ^{ab} ±0.04 | 63.61 ^{de} ±0.42 | 12.22 ^{abc} ±2.05 | 1.41±0.70 |
| ACO | 0.00 ^d ±0.00 | 85.19 ^a ±0.58 | 139.98 ^a ±2.13 | 2.21 ^a ±0.03 | 63.43 ^e ±0.36 | 15.56 ^a ±4.44 | 1.78±0.73 |
| F | 34.06 ^{bc} ±1.52 | 71.45 ^d ±0.51 | 124.99 ^c ±1.76 | 1.91 ^d ±0.03 | 65.37 ^{bc} ±0.26 | 3.34 ^{abc} ±1.49 | 1.41±0.52 |
| FC | 32.81 ^c ±1.56 | 70.29 ^d ±0.51 | 130.02 ^{bc} ±2.06 | 1.96 ^{cd} ±0.03 | 66.38 ^{ab} ±0.27 | 1.11 ^c ±1.11 | 1.39±0.51 |
| FO | 37.68 ^b ±1.97 | 71.05 ^d ±0.46 | 130.85 ^{abc} ±1.55 | 1.95 ^{cd} ±0.02 | 67.03 ^a ±0.27 | 0.00 ^c ±0.00 | 1.37±0.50 |
| FCO | 34.08 ^{bc} ±1.71 | 69.90 ^{de} ±0.59 | 128.61 ^{bc} ±2.04 | 1.95 ^{cd} ±0.03 | 66.02 ^{ab} ±0.27 | 2.22 ^{bc} ±1.41 | 1.23±0.43 |
| <i>P</i> | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.007 | 0.001 | 0.451 |

a,b,c,d,e: Means with different superscripts in each row are significantly different

consume feed significantly ($P<0.05$) higher however, group *F* consume significantly ($P<0.05$) lower feed consumption as compared with other treatment and control group (Table 3). Feed conversion ratio (FCR) vary between 1.91 and 2.21 and significant ($P<0.05$) differences were found between the mean values of the groups (Table 3). Mortality rate remained non-significant ($P>0.05$) (Table 3) between the groups in the study period between 0-98 days. For egg quality parameters, no significant ($P>0.05$) difference was observed between the groups in the first and last analysis except for egg yolk color ($P>0.05$) (Table 4).

Discussion

The findings of our study coincide with the statements made that forced molting has a positive impact on egg yield (6,7,14). An assessment of the egg yield during the yield period reveals that group *ACO* (85.19%) showed significantly high egg yields while the lowest yields were manifested by group *FCO*

(69.90%). Aygun and Yetisir (5) found the same results in their work, that their results were similar between the groups during 40 weeks period. It is concluded that the egg yield obtained in present study was much higher than the values reported by Kucukyilmaz et al. (20) for poultry subjected to different molting periods and the egg yield values reported by Keshavarz and Quimby (15) for a group molted with the application of the feed withdrawal method. Koelkebek and Anderson (18) reported a similar egg yield performance during a 10-day feed withdrawal method and withdrawal feed contained maize-soya shells and maize-wheat chips. An examination of the egg yields of groups provided alfalfa flour during 0-98 days of the study reveals that alfalfa flour supplemented groups have similar yields as *M*, *MC*, and *MO* whereas the yield of the alfalfa flour group without supplements was lower but similar to group *MCO*. Therefore, it can be asserted that alfalfa flour supplemented with L-carnitine and/or Oregano can be used

Table 4. Egg quality parameters (Initial and end of experiment)

| Groups | Initial of experiment | | | | End of experiment | | | |
|----------|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|----------------------------|
| | Egg shape Index (%) Mean±SEM | Egg Shell Thickness mm Mean±SEM | Haugh Units Mean±SEM | Egg Yolk Color Mean±SEM | Egg shape index (%) Mean±SEM | Egg Shell Thickness, mm Mean±SEM | Haugh Units Mean±SEM | Egg Yolk Color Mean±SEM |
| K | 72.78±0.48 | 0.35±0.006 | 67.01±0.28 | 10.61 ^{ab} ±0.24 | 72.06 ^b ±0.73 | 0.34±0.006 | 67.44±0.31 | 11.78 ^a ±0.13 |
| M | 74.94±0.37 | 0.35±0.004 | 67.21±0.20 | 11.67 ^a ±0.21 | 74.89 ^a ±0.61 | 0.34±0.006 | 68.50±0.29 | 11.17 ^{ab} ±0.19 |
| MC | 74.67±0.68 | 0.35±0.004 | 67.40±0.17 | 11.50 ^{ab} ±0.22 | 73.67 ^{ab} ±0.59 | 0.34±0.006 | 68.55±0.26 | 11.67 ^{ab} ±0.20 |
| MO | 74.39±0.44 | 0.34±0.005 | 67.80±0.16 | 10.78 ^{ab} ±0.19 | 73.50 ^{ab} ±0.62 | 0.34±0.006 | 68.62±0.25 | 11.44 ^{ab} ±0.17 |
| MC | 74.33±0.61 | 0.35±0.006 | 67.60±0.25 | 10.78 ^{ab} ±0.24 | 74.06 ^{ab} ±0.57 | 0.34±0.006 | 68.24±0.22 | 11.22 ^{ab} ±0.19 |
| O | 74.61±0.24 | 0.35±0.007 | 66.88±0.23 | 11.50 ^{ab} ±0.33 | 74.33 ^{ab} ±0.54 | 0.35±0.006 | 68.78±0.46 | 11.78 ^a ±0.19 |
| A | 73.22±0.50 | 0.35±0.006 | 67.03±0.24 | 11.56 ^{ab} ±0.18 | 74.39 ^{ab} ±0.54 | 0.34±0.006 | 68.71±0.25 | 11.00 ^{ab} ±0.23 |
| AC | 73.83±0.56 | 0.33±0.003 | 66.70±0.31 | 11.06 ^a ±0.15 | 74.22 ^{ab} ±0.48 | 0.34±0.006 | 67.76±0.30 | 11.33 ^{ab} ±0.18 |
| AO | 74.06±0.69 | 0.35±0.004 | 67.32±0.24 | 10.67 ^b ±0.30 | 74.17 ^{ab} ±0.60 | 0.34±0.006 | 68.59±0.26 | 10.89 ^b ±0.20 |
| ACO | 73.17±0.96 | 0.34±0.003 | 67.36±0.30 | 10.83 ^{ab} ±0.25 | 72.94 ^{ab} ±0.56 | 0.34±0.006 | 67.99±0.29 | 11.33 ^{ab} ±0.16 |
| F | 73.56±0.59 | 0.34±0.004 | 66.83±0.28 | 11.72 ^a ±0.23 | 74.28 ^{ab} ±0.51 | 0.35±0.006 | 67.54±0.29 | 11.28 ^{ab} ±0.18 |
| FC | 73.61±0.36 | 0.33±0.004 | 66.92±0.32 | 10.44 ^b ±0.20 | 72.33 ^{ab} ±0.63 | 0.35±0.006 | 67.44±0.36 | 11.11 ^{ab} ±0.14 |
| FO | 75.22±0.74 | 0.33±0.005 | 66.74±0.36 | 11.28 ^{ab} ±0.25 | 73.11 ^{ab} ±0.53 | 0.35±0.006 | 67.87±0.32 | 11.39 ^{ab} ±0.18 |
| FCO | | | | | | | | |
| <i>P</i> | 0.088 | 0.060 | 0.073 | 0.001 | 0.014 | 0.868 | 0.088 | 0.007 |

a,b: Means with different superscripts in each row are significantly different

an alternative molting material during feed withdrawal method and the yield impact is similar with the mixtures presented by the researchers as an alternative.

Wu et al. (28) carried out a study with two white laying hybrids to determine the impact of two different forced-molting methods on the egg yield as well as on egg quality. It was observed that the molting method did not have an impact on egg yield and egg weight. The present trial findings showed that at the start of the study (14-28 days), group *M* egg yield was almost similar to group *F* while at the mid of study, the egg yield of group *M* was higher as compared to group *F*. Kuçukyılmaz et al. (20). Yılmaz and Sahar (29) study showed that 50% egg yield with 62.05 g average egg weight were produced from brown layers hens which were subjected to force molting with full grain and zinc oxide application. In terms of significance, the lowest egg shape index form at the end of the study was manifested by group

K (72.06) while the highest values were displayed by group *M* (74.89) which coincided with the results reported by Kucukyılmaz et al. (20) that molting had an impact on index form. The findings by the same researchers that shell thickness and Haugh unit are affected by molting. In contrast, the results of our study asserted that eggshell thickness and Haugh unit were not affected by molting and feed supplements were not commensurate. In a study carried by Bell and Kuney (8) the Haugh unit values obtained from feed withdrawal groups (74.7-75.7) are less than the values calculated for feed withdrawal groups in the trial. Regarding egg shape index, in groups *M*; there was no difference between egg shape indexes and eggshell thickness in the present study. These results were correlated to another study which observed no differences in shape index and eggshell thickness of brown layer hens during 12 days of forced molting with feed withdrawal (1). Molino et al. (22) and Bell and Kuney (8) reported that the egg-

shell thickness is 37mm after feed withdrawal as a force molting and this value was found proximal to eggshell thicknesses measured in groups *M* (0.35 mm). However, other researchers observed that forced molting improves eggshell thickness but our trial results were different (6). Khoshoei and Khalali (17) reported no difference in the eggshell thicknesses in the 3rd and 4th months after peak yield with different force molting methods such as feed withdrawal method, different grain applications, cottonseed bran and molting feed applications after fasting. At the end of the 22 days of the molting period, about 0% and 15.56% mortality were observed in the groups. When a comparison is made with the mortality rates reported by Biggs et al. (10) in a program without feed withdrawal (0-2.4%), it is observed that such range of mortality is commensurate with the results of groups *FC*, *FO* and *FCO*. Moreover, it is much less than the figures for group *F* and the alfalfa flour groups. When a comparison is made with the 2.60% mortality value observed by Petek (24) in groups without feed withdrawal, the results for groups *FC*, *FO* and *FCO* were found low while the values of group *F* and the alfalfa flour groups were found higher than this value. The results of the study were not similar to those of Aygun and Yetisir (5) who also reported no difference between the mortality rates of the groups without feed withdrawal. This suggests that feed consumption in the groups may have been inadequate during the molting period. The conclusion made in the study that *M* groups feed consumptions were similar to those of group *K*. However, various studies reported that molting white layer hens subjected with the application of different fasting periods increased feed consumption (20). Molino et al. (22) carried out a study in which the activities of feed withdrawal programs and feed restricted programs were compared and reported that the group averages were similar in terms of feed consumption. When the feed consumption of the 0-98 day period in the study is assessed, the results do not coincide because there are differences between the groups. However, the feed consumption value reported from the feed withdrawal group in the study is less than the values acquired in the study. Researchers report that the feed conversion ratio of 2.27 for poultry which has been observed during feed withdrawal molting period and this value is higher than the feed conversion ratios reported for groups *M* (2.03-2.09). These differences are attributed to the difference found between groups in which raw nutrients were used in the feed during the yield period. Keshavarz (15) reports a feed consumption of 109.2g during yield period for Babcock B300 layer hens subjected to 10 days of feed withdrawal and a feed conversion ratio were found 2.55 while Bell and Kuney (8) reported that animals subjected to feed withdrawal had a feed consumption of 102.9g-104.2g and a feed conversion ratio was found 2.59-2.60. When our study findings are compared

with these values, it is observed that the feed consumptions of group *M* are higher and the feed conversion ratios are lower. A farm-based study was conducted in which feed withdrawal method were used as a force molting and molting feed contained maize without salt which is further supplemented with P and Vitamins (9). The feed conversion ratios of this farm study were compared with the feed conversion ratio of our study, and it was observed that the values of groups *F* and *M* are less than the values reported by the researchers.

Conclusion

It is concluded from our study, that there were significant differences were observed between the groups in terms of egg production mean except *FCO* group and the yields of all treatment groups were found significantly higher than the control groups. It was observed that supplementing groups *M* with L-carnitine and Oregano individually had a positive impact on egg yield whereas using them together had a negative impact. Moreover, all feed supplements had also shown a positive impact on the egg yields of groups *A*. As a result, it can be concluded that alfalfa flour supplemented with various feed additives could be used as an alternative during feed withdrawal method. Further, the adding of L-carnitine and Oregano together into alfalfa flour has a positive impact on performance in terms of animal welfare.

Acknowledgements: This research was supported by BAPK of Afyon Kocatepe University. Project Number: 07.VF.002. The authors thank to AKÜ BAPK.

References

1. Akşit M, Yalçın S, Karul AB. Physiological stress parameters during food withdrawal period in force moulted hen. Arch Geflügelkd 2003; 67: 212-216.
2. Alodan MA, Mashaly MM. Effect of Induced Molting in Laying Hens on Production and Immune Parameters. Poult Sci 1999; 78: 171- 177.
3. AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 1984; 14th ed., Inc., Arlington, Virginia.
4. Aygun A. The investigation of response of different hybrid laying hen to withdrawal molting according to egg production and quality, PhD Thesis, Selçuk Univ Fen Bil Ens, Konya 2007.
5. Aygun A, Yetisir R. Researches on the responses of different hybrid layers with respect to egg production performances to forced molting programs with and without feed withdrawal. J Anim Vet Adv 2009; 8(12): 2680-86.
6. Bar A, Razaphkovsky V, Shinder D, Vax E. Alter-

- native procedures for molt induction. Practical aspects. *Poult Sci* 2003; 82:543-550.
7. Bar A, Razaphkovsky V, Wax E, Malka Y. Effect of age at molting on postmolting performance. *Poult Sci* 2001; 80: 874–878.
 8. Bell DD, Kuney DR. Effect of fasting and post-fast diets on performance in molted flocks. *J Appl Poult Res* 1992; 1: 200-206.
 9. Bell DD. An alternative molting procedure. UC research for Non-feed-removal molting. (A supplement to "Farm Evaluation of Alternative Molting Procedures": Bell, D.D., and D.R. Kuney, *J Appl Poult Res* 2004; 13: 673-679). [web: [http : // animalscience. ucdavis. edu/avian / pip41. Pdf](http://animalscience.ucdavis.edu/avian/pip41.Pdf)]. Access: 08/2011.
 10. Biggs PE, Persia ME, Koelkebeck KW, Parsons CM. Further evaluation of nonfeed removal methods for molting programs. *Poult Sci* 2004; 83: 745-752.
 11. Card LE, Nesheim MC *Poultry Production* . 11. ed., Lea and Febiger,1972, Philadelphia.
 12. Carey JB, Brake JT. *Induced Molting of Commercial Layers*. *Poult Sci and Technology Guide*, 1989, No:10, NC State University, Raleigh, NC.
 13. Gongruttananun N, Saengkudrua K. Responses of laying hens to induce molting procedures using cassava meal of variable length with or without recovery period. *Agric Nat Res* 2016; 50: 400-407
 14. Gulhan T, Oztabak K, Hasret D, Toker N, Matur E. The effect of vitamin E on cellular immune responses in laying hens forced-molted by different methods. *Arch Geflügelk* 2006; 70 (1): 28–34.
 15. Hurwitz S, Wax E, Nisenbaum Y, Ben Moshe M, Plavnik I. The response of laying hens to induced molt as affected by strain and age. *Poult Sci* 1998; 77: 22–31.
 16. Keshavarz K, Quimby FW. An investigation of different molting techniques with an emphasis on animal welfare. *J Appl Poult Res* 2002; 11: 54-67.
 17. Khan RU, Zia-ur Rahman, Javed I, Muhammad F. Effect of vitamins, probiotics and protein on semen traits in post-molt male broiler breeders. *Anim Reproduct Sci* 2012; 135: 85–90.
 18. Khoshoei EA, Khajali F. Alternative Induced-Molting Methods for continuous Feed withdrawal and their Influence on postmolt performance of laying Hens. *Int J Poult Sci* 2006; 5(1): 47-50.
 19. Koelkebeck KW, Anderson KE. Molting layers- Alternative methods and their effectiveness. *Poult Sci* 2007; 86: 1260-1264.
 20. Koelkebeck KW, Anderson KE. Molting layers- Alternative methods and their effectiveness. *Poultry Sci* 2007; 86: 1260-1264
 21. Kuçukyilmaz K, Erensayin C, Orhan H. The effects of different fasting time on egg production and egg internal and external quality post molted laying hen. *Akdeniz Üniv Ziraat Fak Derg* 2003; 16(2): 199-210.
 22. Minoura M, Ohguchi H, Ito H, Noda K, Kato Y. Investigation on induced molting without fasting by feeding the diets which were mainly composed of the wheat bran or the defatted rice bran in hens. *Res Bulletin of the Aichi-ken Agric Res Center*, 2005; 31: 173-179 (sum.)
 23. Molino AB, Garcia EA, Berto DA, Pelícia K, Silva AP, Vercese F. The effects of alternative forced-molting methods on the performance and egg quality of commercial layers. *Brazilian J Poult Sci* 2009;11,2: 109-113.
 24. National Research Council (NRC). *Nutrient requirement of poultry*. 1994; 9th Revised Edition, National Academy Press, Washington, DC.
 25. Petek M. The effect of different molting programmes on main yields in the commercial laying hen. *UÜ Vet Fak Derg* 2001;20: 39-44.
 26. Rafeeq MI, Rashid NI, Awan MAI, Tariq MMI, Abbas FI, Ahmed ZI, Taj I. Effect of Forced Molting on Body Characteristics and Post-Molting Egg Production Performance of Layers in Quetta, Pakistan. *Brazilian J Poult Sci* 2013; v.15 / n.4 / 347-352.
 27. Rauch W Die elastische Verformung von Hühne- reiem als Maßstab für die Beurteilung der Scha- lenstabilität. *Arch Geflügelk* 1965; 29: 467-477.
 28. SAS JMP™5.0.1a Statistical and Graphic Guide. 2002;A Business Unit of SAS 1989-2002. Cary, NC, USA.
 29. Thirunavukkarasu P, Moorthy M, Viswanathan K. Body Weight Changes of Single Comb White Leghorn Layers at Different Ages During Induced Molt. *Int J Poult Sci* 2007; 6,12: 858-859.
 30. Wu, G, Gunawardana P, Bryant MM, Voitle RA, Roland DA. Effect of molting methods and dietary energy on postmolt performance, egg components, egg solid, and egg quality in Bovans White and Dekalb White hens during second cycle phases two and three. *Poult Sci* 2007; 86 (5): 69-876.

31. Yılmaz B, Sahan U. The Effects of Different Forced Molting Methods on Egg Production and Egg Quality in Egg Layers. 11th European Poultry Conference, 2002; 06-10 September 2002, Bremen Germany.



Diyarbakır Yöresindeki Çiğ Koyun Sütlerinin Mikrobiyolojik, Fiziko-Kimyasal ve Organoleptik Özelliklerinin Araştırılması*

Mehmet Nesip ÇELİK¹, Aydın VURAL², Mehmet Emin ERKAN³

¹Bingöl Adaklı İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Bingöl, TÜRKİYE

²Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi ABD, Diyarbakır, TÜRKİYE

³Şırnak Üniversitesi Rektörlüğü, Mehmet Emin Acar Kampüsü, Şırnak, TÜRKİYE

*Sorumlu Yazar: Aydın VURAL; E-posta: avural@dicle.edu.tr; ORCID: 0000-0002-6232-2131

Atıf yapmak için: Çelik MN, Vural A, Erkan ME. Diyarbakır yöresindeki çiğ koyun sütlerinin mikrobiyolojik, fiziko-kimyasal ve organoleptik özelliklerinin araştırılması. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(3): 178-183.

Özet: Bu çalışmada Diyarbakır ilinde 100 farklı çiftlikten toplanan koyun sütlerinin bileşimi ve kalite özellikleri ile muhtemel halk sağlığı risklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Koyun sütü örneklerindeki ortalama toplam mezofilik aerob bakteri, toplam psikrofilik aerob bakteri, koliform, *Escherichia coli*, *Staphylococcus-Micrococcus* spp., laktobasil, laktik streptokok, küf-maya ile sülfid redükte eden anaerob bakteri sayıları sırası ile 7.83, 6.92, 4.55, 3.61, 4.50, 6.23, 7.95, 4.27 ve 2.71 log₁₀ kob/ml olarak saptanmıştır. Analiz edilen koyun sütlerinde ortalama yağ, yağsız kuru madde, protein, laktoz ve mineral madde miktarları ile yoğunluk, donma noktası ve pH değerleri ise sırası ile %7.93, %11.88, %4.96, %5.99, %0.77, 1.035, -0.615 °C ve 6.55'tir. Koyun sütü örneklerindeki ortalama somatik hücre sayısı 5.77 log₁₀ hücre/ml; kıvam, görünüm-renk, tat ve koku puanları ise sırasıyla 5.0, 4.0, 5.0 ve 4.5 olarak tespit edilmiştir (5'li skala). Diyarbakır'dan temin edilen koyun sütlerinin beslenme ve endüstriyel açıdan önemli bir potansiyel oluşturduğu, ancak hijyenik kalitelerinin düşük olduğu saptanmıştır. Koyun yetiştiricilerinin sağım hijyeni ve sütün muhafazası hakkında eğitilmesine ihtiyaç bulunduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Halk sağlığı, hijyen, hücre sayısı, koyun sütü, somatik hücre sayısı

The Study of the Microbiological, Physico-Chemical and Organoleptic Properties of the Raw Ewe's Milk in Diyarbakır Province

Summary: In this study, it is aimed to determine the nutrition compounds, its quality features and the probable risks for community health of milk samples from 100 different farms in Diyarbakır Province. The average total mesophilic aerobic bacteria, total psychrophilic aerobic bacteria, coliform, *Escherichia coli*, *Staphylococcus-Micrococcus* spp., lactobacillus, lactic streptococci, mould-yeast and sulfide reducing anaerobe bacteria in ewe's milk were determined as 7.83, 6.92, 4.55, 3.61, 4.50, 6.23, 7.95, 4.27 and 2.71 log₁₀ cfu/ml, respectively. The average values of fat, non-fat dry matters, protein, lactose, quantity of mineral matters and density, freezing point and pH value are 7.93%, 11.88%, 4.96%, 5.99%, 0.77%, 1.035, -0.615 °C and 6.55 in order. The average number of somatic cells in ewe's milk samples was recorded as 5.77 log₁₀ cell/ml; consistence, color&appearance, taste and smell scores are 5.0, 4.0, 5.0 and 4.5 in order (five point scale). It was concluded that the ewe's milk produced in Diyarbakır Province constitutes an important potential in terms of industry but the hygienic quality is low. It was agreed that the sheep breeders need to be trained on milking hygiene and storage conditions.

Key words: Ewe's milk, hygiene, public health, somatic cell count

Giriş

Koyun sütünde ortalama yağ %7.4, protein %5.5, mineral madde %1.0 ve kurumadde miktarı % 19.3 düzeyindedir (17). Kazein oranının yüksek olması peynir ve yoğurt üretiminde; yağ oranının yüksek oluşu ise tereyağı üretiminde koyun sütünün tercih edilmesini sağlamaktadır (17,28). Koyun sütünün doğal asitliği diğer türlere nazaran daha yüksek olup sonradan oluşan asitlik yavaş gelişmektedir (17). İnek

ve keçi sütüne göre daha beyazımsı renkte (26) olan koyun sütünün kendine özgü olan biraz ağır tadı ve kokusu bulunmaktadır. İçme sütü olarak kullanımı sınırlıdır (28). Koyun sütleri B₁, B₂, niasin, biotin ve C vitaminleri yönünden inek sütlerine oranla daha zengindir (26).

Bu çalışmada, özellikle kırsal alanlarda büyük bir ekonomik değer olan koyunculüğün en önemli çıktılarından olan koyun sütünün kalite özellikleri incelenmiştir. Diyarbakır'da koyunculuk yapan 100 farklı işletmenin sütlerinin mikrobiyolojik özellikleri ve somatik hücre sayıları (SHS) incelenerek sütlerin hijyenik durumu ve muhtemel sağlık risklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Fiziko-kimyasal özelliklerinin incelenmesiyle sütün bileşimi, besleyici değeri ve endüstride

Geliş Tarihi/Submission Date : 11.12.2018

Kabul Tarihi/Accepted Date : 28.02.2019

*Bu çalışma "2. Uluslararası Hayvansal Gıdalar Kongresi'nde" poster olarak sunulmuştur.

Bu çalışma Veteriner-16.001 kodlu Tez Projesinden özetlenmiştir.

kullanılma açısından kalite durumunun belirlenmesi hedeflenmiştir. Organoleptik özelliklerin incelenmesi ise tüketicinin koyun sütüne yaklaşımını ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada analiz edilen çiğ koyun sütleri Diyarbakır'da koyunculğun yüksek oranda yapıldığı Karacadağ yöresindeki işletmelerden temin edilmiştir. Materyal olarak kullanılan 100 (yüz) adet çiğ koyun sütü farklı koyunculuk işletmelerinin akşam ve sabah sütlerini birlikte içeren süt tanklarından veya süt muhafaza-

leştirilmiştir. Mikrobiyolojik analizler için aseptik koşullarda alınan 1 ml koyun sütü içerisinde 9 ml steril fizyolojik tuzlu su (%0.85 NaCl) bulunan steril deney tüplerine eklenerek 1:10'luk ardışık dilüsyonları yapılmıştır. Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan besiyerleri ve inkübasyon koşulları Tablo 1'de gösterilmiştir. Analizi yapılacak mikroorganizmalar için uygun besiyerlerine yayma ve dökme plak yöntemi ile ekimler gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda tabloda belirtilen üretici firmalar tarafından besiyerleri için belirtilen tipik koloniler sayılmıştır (Tablo 1).

Koyun sütlerinin yağ, yağsız kuru madde (YKM), pro-

Tablo 1. Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan besiyerleri ve inkübasyon koşulları

| Mikroorganizma | Besiyeri | İnkübasyon koşulları |
|---|--------------------------|--|
| TMAB | PCA (Merck 1.05463) | 37 °C'de 24-48 saat |
| TPAB | PCA (Merck 1.05463) | 4 °C'de 7 gün |
| Koliform | VRB (Merck 1.01406) | 37 °C'de 24 saat |
| <i>E. coli</i> sayımı | TBX Medium (Oxoid CM945) | 30 °C'de 4 saat ve 44 °C'de 18 saat |
| <i>Staphylococcus-Micrococcus</i> spp. | BPA (Merck 1.05406) | 37 °C'de 24 saat |
| Laktobasil | MRSA (Merck 1.010660) | 37°C'de 48-72 saat |
| Laktik streptokok | M17 Agar (Merck 1.15108) | 37 °C'de 24 saat |
| Küf-maya | PDA (Merck 1.010130) | 22-25 °C'de 4-5 gün |
| SRAB | SPSA (Merck 1.10235) | 37 °C'de 24-48 |

za kaplarından alınmıştır. Her bir işletmeden tek bir örnek alınmıştır. Sütler en az 300 ml olacak şekilde steril numune alma poşetlerinde ve soğuk muhafaza altında (+4°C) laboratuvara getirilerek geciktirilmeksizin analizleri yapılmıştır. Koyun sütü örneklerinde mikrobiyolojik analizler, fiziko-kimyasal analizler, so-

tein, laktoz ve mineral madde miktarı ile donma noktası ölçümleri Funke Gerber Lactostar 3510 süt analiz cihazı (Almanya), pH değerlerinin ölçümü İnoLab WTW730 laboratuvar tipi pH metre ve SHS Milkana Somatic Scan cihazı ile üretici firmanın ölçüm prosedürüne uygun olarak ölçülmüştür.

Tablo 2. Koyun sütü örneklerinde saptanan minimum, maksimum ve ortalama mikroorganizma sayısı (log₁₀ kob/ml) ile kontaminasyon düzeyi (n: 100)

| Mikroorganizma türü | Pozitif örnek oranı (yüzde) | Mikroorganizma sayısı | | |
|---|-----------------------------|-----------------------|-------|--------------------|
| | | Min | Maks | Ortalama±Std Sapma |
| TMAB | 100 | 3.30 | 10.58 | 7.83±1.39 |
| TPAB | 75 | 1.00 | 9.74 | 6.92±1.70 |
| Koliform | 91 | 1.78 | 6.72 | 4.55±1.33 |
| <i>E. coli</i> | 75 | 1.00 | 6.91 | 3.61±1.18 |
| <i>Staphylococcus-Micrococcus</i> spp. | 80 | 2.00 | 7.08 | 4.50±1.36 |
| Laktobasil | 67 | 1.48 | 10.00 | 6.23±1.21 |
| Laktik streptokok | 71 | 4.48 | 10.00 | 7.95±1.24 |
| Küf-maya | 56 | 2.00 | 7.32 | 4.27±1.67 |
| SRAB | 20 | 2.00 | 5.30 | 2.71±0.70 |

matik hücre sayısı (SHS) ve organoleptik analizler gerçekleştirilmiştir.

Koyun sütü örneklerinde toplam mezofilik aerob bakteri (TMAB), toplam psikrofilik aerob bakteri (TPAB), koliform bakteri, *E. coli*, *Staphylococcus-Micrococcus* spp., laktobasil, laktik streptokok, küf-maya ile sülfid redükte eden anaerob bakteri (SRAB) sayılarının saptanması amacıyla mikrobiyolojik analizler gerçek-

Koyun sütlerinin organoleptik özellikleri kıvam, görünüm-renk, tat ve koku yönünden incelenmiştir. Eğitimli yedi panelistten oluşturulan panellerde 5'li puanlama sistemi ile değerlendirme yapılmıştır. Sütler çiğ olarak kıvam, görünüm-renk ve koku yönünden; kaynatıldıktan (2 dk) sonra ise tat yönünden incelenmiştir.

Tablo 3. Koyun sütü örneklerinin fiziko-kimyasal özellikleri

| Özellik türü | Koyun sütünün bileşenleri ve özellikleri | | |
|-----------------------|--|--------|--------------------|
| | Min. | Maks. | Ortalama±Std Sapma |
| Yağ (%) | 4.42 | 15.93 | 7.93±2.01 |
| Yağsız kuru madde (%) | 9.49 | 16.29 | 11.88±0.99 |
| Protein (%) | 3.66 | 7.11 | 4.96±0.90 |
| Laktoz (%) | 3.47 | 8.92 | 5.99±1.24 |
| Mineral madde (%) | 0.51 | 1.17 | 0.77±0.15 |
| Yoğunluk | 1.026 | 1.077 | 1.035±0.007 |
| Donma noktası (°C) | -0.521 | -0.763 | -0.615±0.040 |
| pH | 6.30 | 6.90 | 6.55±0.12 |

Tablo 4. Koyun sütü örneklerinde SHS sonuçları (log₁₀ hücre/ml) ve SHS dağılımı

| Pozitif örnek (yüzdesi) | SHS sonuçları (log ₁₀ hücre/ml) | | | SHS dağılımı (örnek sayısı ve yüzdesi) | | | |
|-------------------------|--|-------|--------------------|--|-------------------------|--------------------------|-----------------------|
| | Min. | Maks. | Ortalama±Std Sapma | 90-250x10 ³ | 250-500x10 ³ | 500-1000x10 ³ | >1000x10 ³ |
| 38 (%38) | 4.97 | 7.18 | 5.77±0.37 | 29 (%29) | 7 (%7) | 1 (%1) | 1 (%1) |

Tablo 5. Koyun sütü örneklerinde organoleptik puanlama sonuçları (n:100)

| | Kıvam | Görünüm-Renk | Tat | Koku |
|--------------------|-------|--------------|-----|------|
| Çok iyi-5 puan | 51 | 49 | 53 | 50 |
| İyi-4 puan | 32 | 42 | 38 | 35 |
| Az kusurlu-3 puan | 17 | 9 | 9 | 15 |
| Kusurlu-2 puan | - | - | - | - |
| Tüketilemez-1 puan | - | - | - | - |
| %25'lik dilim | 4 | 4 | 4 | 4 |
| %75'lik dilim | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Medyan | 5 | 4 | 5 | 4.5 |

Bulgular

Bu çalışmada koyun sütü örneklerinde mikrobiyolojik, fiziko-kimyasal ve organoleptik kalite parametreleri ile SHS incelenmiştir. Analiz edilen koyun sütü örneklerinin mikrobiyolojik analiz sonuçları Tablo 2'de; fiziko-kimyasal analiz sonuçları Tablo 3'te, somatik hücre sayıları ve dağılımı Tablo 4'te ve organoleptik analiz bulguları ise Tablo 5'te verilmiştir. Organoleptik analizlerin yorumlanmasında 5 puan çok iyi, 4 puan iyi, 3 puan az kusurlu, 2 puan kusurlu ve 1 puan tüketilemez (kabul edilemez) olarak kullanılmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Koyun sütlerindeki TMAB sayısı Merlin Junior ve ark. (16) tarafından 16x10⁶ kob/ml olarak bulunmuştur. Sevi ve ark. (22) TMAB sayısının laktasyon yılına göre farklılık gösterebildiğini, 1., 2. ve 3. laktasyonda sırasıyla 5.29, 4.99 ve 4.83 log₁₀ kob/ml düzeylerinde olduğunu saptamıştır. Talevski ve ark. (24) ise Makedonya'da üç farklı süt toplama bölgesindeki ortalama TMAB sayısını 1.5x10⁷ kob/ml olarak bildirmiştir. Koyun sütlerindeki TPAB sayısı 5.8x10⁶ kob/ml (16) ile 4.83-517 log₁₀ kob/ml (22) düzeylerinde tespit edilmiştir. Sevi ve ark. (22) 1., 2. ve 3. laktasyonda sırasıyla koyun sütlerinde koliform sayısını 3.81, 3.57 ve

3.40 log₁₀ kob/ml; fekal koliform bakteri sayısını ise 1.28, 1.12 ve 0.94 log₁₀ kob/ml olarak saptamıştır. Talevski ve ark. (24) süt toplama bölgelerindeki koliform sayısını 7.2x10⁵ kob/ml olarak bildirmiştir. Brezilya'da yapılan bir çalışmada koyun sütlerinde koliform ve *E. coli* kontaminasyon oranları ise sırası ile %100 ve %45 olarak bulunmuştur (16). Sanjuan ve ark. (21) koyun sütlerindeki laktobasil sayısını 3.68 log₁₀ kob/ml; Kondyli ve ark. (13) ise boutsiko ırkı koyunlarda 5.04-5.87 log₁₀ kob/ml, karamaniko ırkı koyunlarda 5.06-55 log₁₀ kob/ml olarak tespit etmiştir. Koyun sütlerinde laktokok sayısı ise 5.26 log₁₀ kob/ml olarak bulunmuştur (21). Koyun sütlerinde küf-maya sayısı boutsiko ırkı koyunlarda 2.59-3.09 log₁₀ kob/ml, karamaniko ırkı koyunlarda 2.57-3.18 log₁₀ kob/ml olarak bildirilmiştir. Merlin Junior ve ark. (16) inceledikleri koyun sütlerinin tamamında *S. aureus* kontaminasyonu bildirmiştir. Bu çalışmada saptanan bakteri sayıları Talevski ve ark.'nın (24) bulunduğu koliform sayısı ile Merlin Junior ve ark. (16) bildirdikleri *S. aureus* kontaminasyon düzeyleri haricinde diğer araştırma sonuçlarından daha yüksektir. Araştırma materyalimizi tank sütlerinin oluşturması bulduğumuz yüksek kontaminasyon düzeylerinin nedeni olarak görülmektedir. Tank sütleri farklı hayvanların sütlerinden olduğundan memeden elde edilen sütlerden daha fazla bakteri yükü içerdikleri düşünülmektedir. Sağım hijyeni;

sağımda kullanılan alet, ekipman ve/veya sütün konulduğu kapların hijyenik durumu, memenin dış yüzeyinin kirlilik durumu, sağım sonrası ile sütün muhafaza zaya alınması arasında geçen süre, sütlerin taşınma koşulları, sütlerin muhafaza edildiği sıcaklık dereceleri, süte koruyucu bir maddenin konulup konulmaması, sağılan hayvanların sağlık durumu, hayvanların mastitisli (özellikle subklinik ve kronik mastitislerde) olup olmadıkları, sağım zamanı, mevsim ve lokasyon bakterileri yükünün fazla olması araştırma sonuçları arasındaki farklılıkların nedeni olarak düşünülmektedir.

Koyun sütündeki yağ oranını Ocak ve ark. (18) %4, Kondyli ve ark. (13) %6.76-7.71, Bencini ve Purvis (4) %8.48 olarak bildirilmiştir. Bizim sonuçlarımız Simos ve ark. (23) tarafından bildirilen ortalama değer (% 7.85) ile uyumludur. Bu çalışmada analiz edilen sütler koyunların laktasyon sonu dönemlerine aittir. Karaca ve ark. (11) süt veriminin laktasyon döneminin sonlarında azalmasının yüksek yağ oranına neden olduğunu bildirmiştir. Yılmaz ve ark. (30) akkaraman ırkı koyunlarda YKM miktarını %9.8, Ocak ve ark. (18) norduz ırkı koyunlarda YKM miktarını %10.6, Akça ve Bakır (1) ise zom ırkı koyunlarda YKM miktarını % 12.4 olarak bildirmiştir. Bizim sonuçlarımız Akça ve Bakır'ın (1) bildirdiği değerlerden düşük iken diğer iki araştırmacının sonuçlarından daha yüksektir. Çelik ve Özdemir'in (7) Morkaraman ırkı koyunlarda bildirdiği %11.41 ile Karaca ve ark.'ın (11) Karakaş koyunlarında bulunduğu %11.66 değerler ise sonuçlarımız ile benzerlik göstermektedir. Koyun sütündeki protein oranını Casoli ve ark. (6) %4.7, Bencini ve Purvis (4) ise %4.8 olarak bulmuştur. Bizim çalışmamızdaki ortalama protein oranı bu çalışmalardan daha yüksek iken diğer araştırmacıların bulunduğu değerlerden ise (%5.2-7.4) daha düşüktür (9,18,29,30). Koyun sütlerinde protein miktarının nispeten düşük bulunması meraya dayalı beslenme yapılması ve meraların zayıf olması ile ilişkilendirilmektedir. Koyun sütlerinde bulunan laktoz miktarları %4.28 (12) ile %6.8 (1) arasında değişmektedir. Bizim çalışmamızda bulunan ortalama laktoz değerleri de bu aralıkta (%5.99) olmasına rağmen nispeten birçok çalışmadan daha yüksektir (3,7,9,29,30). Laktoz miktarının yüksek olması memenin sekretuar epitel hücrelerinin sentez kapasitesinin iyi çalıştığını ve subklinik mastitis olmadığının göstergesi olarak yorumlanmaktadır. Koyun sütlerinde yapılan çeşitli araştırmalarda çoğunlukla kül miktarı ölçümleri yapılmıştır ve kül miktarının %0.81 ile %1 arasında bulunduğu görülmektedir (9,11,25,27,30). Koyun sütü bileşimi açısından yüksek besleyici değere sahip ve kaliteli süt ürünleri üretimine uygun bir süttür. Ancak yapılan birçok araştırmada koyun sütlerinin bileşimlerinde farklılıklar görülmektedir (1,4,6,9,18,30). Bu farklılıkların koyun ırkı, coğrafya, beslenme, mevsim, laktasyon dönemi, sağım zamanı ve analiz yöntemlerinden kaynaklanması muhtemeldir.

Bu çalışmada incelenen koyun sütlerinde ortalama

yoğunluk 1.035 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar Akça ve Bakır'ın (1) Zom ırkı koyunları için bulunduğu ortalama değerlerden (1.039) daha düşüktür. Sütün bileşenleri sütün yoğunluğunu etkilemektedir. Yüksek yağ oranı yoğunluğun düşük olmasına neden olursa, yağsız kuru madde oranının artması yoğunluğu da artırmaktadır. Analiz edilen koyun sütlerindeki ortalama donma noktası -0.615 °C olarak bulunmuştur. Koyun sütündeki donma noktası Konar (12) tarafından yapılan bir çalışmada -0.56 °C olarak bildirilmiştir. Sütün su dışındaki bileşenleri arttıkça donma noktası düşmektedir. Laktasyon döneminin sonundaki sütlerde kuru madde miktarının artmasına bağlı olarak da donma noktası düşmektedir. Analiz edilen koyun sütü örneklerinde ortalama pH değeri 6.55 olarak saptanmıştır. Kondyli ve ark. (13) Boutsiko ve Karamaniko ırkı koyun sütlerinde bahar ve yaz aylarında pH değerlerini 6.75-6.82 arasında bulmuştur. Sütün tazeligi, sütteki mikroorganizma miktarı veya memedeki mastitis durumu sütün pH değeri üzerine etkilidir. Düşük pH değeri sütün kötü hijyenik kalitede olduğunu veya uygun olmayan muhafaza koşullarında tutulduğunu göstermektedir.

Memede subklinik mastitis olduğunu saptamak için sınır SHS birçok çalışmada farklılıklar göstermektedir. Araştırmacılar SHS için sınır değer olarak 250.000 hücre/ml (2,8) ile 500.000 hücre/ml arasında değerler bildirmiştir (5). Berthelot ve ark. (5) subklinik mastitis olduğunu söylemek için memedeki SHS'nin 1.000.000 hücre/ml üzerinde olması gerektiğini bildirmiştir. Antunac ve ark. (2) travnik ırkı koyunlarda laktasyonun başında SHS'nin en yüksek değerde olduğunu (1.57×10^9 /ml); laktasyon sonunda ise en düşük SHS'nin (0.26×10^9 /ml) ve en düşük günlük süt veriminin tespit edildiğini bildirmiştir. Leitner ve ark. (15) koyun sütlerinde yaptıkları çalışmalarında enfekte olmayan memelerdeki SHS'yi fossomatik cihaz ile ortalama 5.15 log₁₀ ve enfekte memelerde ise ortalama 6.32 log olarak tespit etmişlerdir. Koyunlarda tank sütündeki SHS ile ilgili çalışmalar ise daha azdır. Araştırmalar koyun tank sütlerinde ortalama SHS sayısının 400.000-500.000 ile 1.000.000-1.200.000 hücre/ml arasında değiştiğini göstermektedir (14). Bu çalışmada saptanan ortalama SHS 5.77 log₁₀ hücre/ml düzeyindedir. Bizim bulduğumuz değerler Lagriffoul ve ark. (14) ile Leitner ve ark.'nın (15) bildirdiği değerlerle uyumlu iken, Paape ve ark. (19) tarafından bildirilen sonuçlardan ise daha yüksektir. Bu çalışmada SHS sonuçları koyunlarda subklinik mastitis için bildirilen değerlerin altında iken TMAB, TPAB, koliform, *E. coli* ve *Staphylococcus-Micrococcus* spp. gibi bakteri sayıları nispeten yüksek düzeydedir. Somatik hücre sayısı sınır değerinin altında olmasına rağmen sütte bakteri varlığının yüksekliğinin muhtemel enfeksiyonun ilk aşamalarından veya daha önce meydana gelen enfeksiyonlardan kaynaklanmış olabileceği bildirilmiştir (10). Bu durum sağım sırasında veya sonrasındaki kontaminasyonlardan da kaynak-

lanmış olabilir. Diğer taraftan bizim çalışmamızda süt örnekleri akşam ve sabah sütlerinin bulunduğu tanklardan alınmıştır. Somatik hücre sayısı yüksek olsa bile süt içerisinde dilüsyona uğramış ve dolayısıyla düşük sayıda saptanmış olması muhtemeldir. Mastitis problemi çok yoğun ve SHS çok yüksek düzeyde ise tank sütleri bizim için önemli bir uyarıcı olabilir. Koyunlarda SHS gerçek anlamda mastitis ile ilişkilendirmek için her hayvandan ve her bir meme lobundan ölçüm yapılması daha doğrudur. Kullanılan analiz yöntemi, kullanılan cihazların koyunlar için ölçüme ayarlanması, kalibrasyon durumu, süte koruyucu katılıp katılmaması, sütün muhafaza sıcaklığı ve analiz sıcaklığı da SHS değerlerini etkilemektedir (20).

Bu çalışmada analiz edilen koyun sütü örneklerinin organoleptik özelliklerinin medyan değerleri kıvam, görünüm-renk, tat ve koku için sırasıyla 5, 4, 5 ve 4.5 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre kıvam ve tat açısından koyun sütlerinin panelistler tarafından çok iyi olarak, görünüm-renk açısından ise iyi olarak değerlendirildiği görülmektedir. Koku açısından sonuçlar ise iyi ve çok iyi aralığındadır. İncelenen koyun sütlerinin kıvam, görünüm-renk, tat ve koku için sırasıyla %83, %91, %91 ve %85'i kabul edilebilir değerlerin üzerinde puan ile değerlendirilmiştir. Düşük hijyenik kalite, ağıl koşullarının kötü olması, uygun olmayan şartlarda muhafaza, panelistlerin tüketim alışkanlıkları ve eğitim durumları da organoleptik sonuçlar üzerine etki etmiş olabilir.

Koyun sütü, inek sütünden sonra en fazla tüketilen süt olarak özel damak tadına sahip tüketici kitlesi tarafından özellikle tercih edilmektedir. Yüksek kuru madde içeriğine sahip koyun sütünün besin değeri ve süt ürünlerine işlenme potansiyeli de yüksektir. Koyun sütünden genellikle yüksek randımana sahip, lezzetli ve tekstürü beğenilen yoğurt ve peynir gibi ürünler üretilmektedir. Koyun sütü ile ilgili gerek mikrobiyolojik ve gerekse SHS yönünden mevzuatta düzenlemeler yapılmasına ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada çiğ koyun sütlerinin hijyenik kalitesinin oldukça düşük olduğu görülmüştür. Yüksek mikroorganizma yüküne sahip bu sütlerin halk sağlığı açısından risk teşkil edebileceği düşünülmektedir. Meme, altlık, ağıl, sağım ve ekipman hijyeni ile sütlerin muhafaza koşullarında eksiklikler olduğu kanaatine varılmıştır. Koyun sütünün besleyici değeri ve bileşimi konusunda toplumun bilgilendirilmesi, koyun sütünün ekonomik bir getiri olan koyun sütüne yönelik sektör yapılanmasının artırılması, hijyenik sağım yöntemleri ile sütün muhafazası konularında yetiştiricilerin eğitilmesi ve sağım sonrası tüm aşamalarda soğuk zincirin korunması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Teşekkür

Veteriner-16.001 kodlu proje ile bu yüksek lisans tez çalışmasının yapılmasındaki katkılarından dolayı Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Bir-

mi'ne (DÜBAP) teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Akça N, Bakır G. Karacadağ Zom koyununun süt bileşimi. Dicle Üniv Vet Fak Derg 2017; 10(1): 19-23.
2. Antunac N, Mioc B, Pavic V, Havranek JI, Samaržija D. The effect of stage of lactation on milk quantity and number of somatic cells in sheep milk. *Milchwissenschaft* 2002; 57(6): 310-1.
3. Barłowska J, Sz wajkowska M, Litwinczuk Z, Krol J. Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Compr Rev Food Sci F* 2011; 10(6): 291-9.
4. Bencini R, Purvis IW. The yield and composition of milk from Merino sheep. *Proc Aust Soc Anim Prod* 1990; 18: 144-7.
5. Berthelot X, Lagriffoul G, Concordet D, Barillet F, Bergonier D. Physiological and pathological thresholds of somatic cell counts in ewe milk. *Small Ruminant Res* 2006; 62(1-2): 27-31.
6. Casoli C, Duranti E, Morbidini L, Panella F, Vizioli V. Quantitative and compositional variations of massese sheep milk by parity and stage of lactation. *Small Ruminant Res* 1989; 2(1): 47-62.
7. Çelik Ş, Özdemir S. Morkaraman ırkı koyun sütlerinin bazı kimyasal ve fizikokimyasal parametrelerinin laktasyon boyunca değişimi. *Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg* 2003; 34(3): 263-8.
8. De la Cruz M, Serrano E, Montoro V, Marco J, Romeo M, Baselga R, Albizu I, Amorena B. Etiology and prevalence of subclinical mastitis in the Manchega sheep at mid-late lactation. *Small Ruminant Res* 1994; 14(2): 175-80.
9. Doğan Ş, Aytekin İ, Boztepe S. Anadolu Merinosu koyunlarında meme tipleri ile meme özellikleri, süt verimi ve bileşenleri arasındaki ilişkiler. *Namık Kemal Üniv Tekirdağ Ziraat Fak Derg* 2013; 10(2): 58-69.
10. Fthenakis GC. Somatic cell counts in milk of Welsh-Mountain, Dorset-Horn and Chios ewes throughout lactation. *Small Ruminant Res* 1996; 20(2): 155-62.
11. Karaca O, Akyüz N, Andiç S, Altın T. Karakaş koyunlarının süt verim özellikleri. *Turk J Vet Anim Sci* 2003; 27(3): 589-94.
12. Konar A. İnek, keçi ve koyun sütlerinin donma noktası depresyonu ve süte su katılarak yapılan hilenin saptanması. *Gıda* 1982; 7(2): 56-61.

13. Kondyli E, Svarnas C, Samelis J, Katsiari MC. Chemical composition and microbiological quality of ewe and goat milk of native Greek breeds. *Small Ruminant Res* 2012; 103(2-3): 194-9.
14. Lagriffoul G, Barillet F, Rupp R, Berthelot X, Bergonier D. Somatic cell counts in dairy sheep milk. *Great Lakes Dairy Sheep Symposium*. 38-56. 2006; Wisconsin-USA.
15. Leitner G, Chaffer M, Caraso Y, Ezra E, Kababea D, Winkler M, Glickman A, Saran A. Udder infection and milk somatic cell count, NAGase activity and milk composition-fat, protein and lactose-in Israeli-Assaf and Awassi sheep. *Small Ruminant Res* 2003; 49(2): 157-64.
16. Merlin Junior IA, Santos JS, Costa LG, Costa RG, Ludovico A, Rego FC, Santana EH. Sheep milk: physical-chemical characteristics and microbiological quality. *Arch Latinoam Nutr* 2015; 65(3): 193-8.
17. Metin M. Süt Teknolojisi Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. 4. Baskı, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi 2001; ss. 1-483.
18. Ocak E, Bingöl M, Gökdal Ö. Van yöresinde yetiştirilen Norduz koyunlarının süt bileşimi ve süt verim özellikleri. *YYÜ Tar Bil Derg* 2009; 19(2): 85-9.
19. Paape MJ, Bernard P, Contreras A, Marco CJ, Capuco AV. Milk somatic cells and lactation in small ruminants. *J Dairy Sci* 2001; 84: 237-44.
20. Raynal-Ljutovac K, Pirisi A, De Crémoux R, Gonzalo C. Somatic Cells of goat and sheep milk: analytical, sanitary, productive and technological aspects. *Small Ruminant Res* 2007; 168(1-2): 126-44.
21. Sanjuan S, Rúa J, García-Armesto MR. Microbial flora of technological interest in raw ovine milk during 6°C storage. *Int J Dairy Technol* 2003; 56(3): 143-8.
22. Sevi A, Taibi L, Albenzio M, Muscio A, Annicchiarico G. Effect of parity on milk yield, composition, somatic cell count, renneting parameters and bacteria counts of Comisana ewes. *Small Ruminant Res* 2000; 37(1-2): 99-07.
23. Simos EN, Nikolaou EM, Zoiopoulos PE. Yield, composition and certain physicochemical characteristics of milk of the Epirus Mountain sheep breed. *Small Ruminant Res* 1996; 20(1): 67-74.
24. Talevski G, Čobanova-Vasilevska R, Srbinovska S, Sireta Z. Quality of the sheep milk as a raw material in dairy industry of Macedonia. *Biotechnol Anim Husband* 2009; 25(5-6): 971-77.
25. Tekin ME, Kadak R, Gürkan M, Nazlı M, Kurtoğlu V. Merinos, Akkaraman ve İvesi koyunlarının bazı etçi ırklar ile melezlenmesinden elde edilen f1 koyunların süt verimi ve süt kompozisyonu. *Hayvancılık Araş Derg* 1994; 4(1): 13-8.
26. Üçüncü M. Süt Mamulleri Teknolojisi. Birinci Baskı. İzmir: Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri; 2013, s. 5-6.
27. Verdalet GI, Pedraza VP, Peralta LM, Perezgrovas R, Silva HE. Estudio Sobrela Caracterización Físicoquímica de la Leche de Ovejas Criolla de Chiapas. Part II. Teller Internacional Sobre la Calidad de la Leche (Study on Physicochemical Milk Characterization of Criolla de Chiapas Ewes. Part II. Internacional Workshop on Milk Quality), 4-8, 1993; Mexico DF.
28. Yerlikaya O, Karagözlü C. Koyun sütünün beslenmedeki önemi ve teknolojik özellikleri. *Süt Dünyası Dergisi* 2008; 14(3): 58-61.
29. Yılmaz O, Çak B, Bolacalı M. Effects of lactation stage, age, birth type and body weight on chemical composition of Red Karaman sheep milk. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2011; 17(3): 383-386.
30. Yılmaz O, Denk H, Nursoy H. Milk yield characteristics of Norduz sheep. *YYÜ Vet Fak Derg* 2004; 15(1-2): 27-31.



Laktasyondaki Keçilerde Lökosit CaSR Gen Ekspresyon Seviyesi İle Plazma Kalsiyum Seviyesinin Belirlenmesi*

Sevda DALKIRAN¹, Akın YAKAN²

¹Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyokimya ve Genetik Anabilim Dalı, Hatay-TÜRKİYE
²Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Genetiği Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

*Sorumlu yazar: Akın YAKAN; E-mail: yakan@mku.edu.tr; ORCID: 0000-0002-9248-828X
Atıf yapmak için: Dalkıran S, Yakan A. Laktasyondaki keçilerde lökosit CaSR gen ekspresyon seviyesi ile plazma kalsiyum seviyesinin belirlenmesi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(3): 184-189.

Özet: Süt verimi keçi yetiştiriciliğinde büyük öneme sahiptir. Sütün içeriğinde bulunan kalsiyum insan sağlığı için önemlidir. Kalsiyum hücre membran geçirgenliği, hormonların salınımı, enzim aktivitesi gibi birçok fizyolojik olayda görev almaktadır. Metabolizma bakımından değerlendirildiğinde laktasyon döneminde süt verimine bağlı olarak kalsiyum ihtiyacı artmaktadır. Kalsiyum düzeyi ise önemli oranda Kalsiyuma Duyarlı Reseptör (CaSR) geni aracılığıyla düzenlenmektedir. Bu çalışmada laktasyondaki Damascus keçilerinde CaSR geni ekspresyon seviyesi ile kan kalsiyum seviyesi ölçülerek laktasyon ile aralarındaki ilişki araştırılmıştır. CaSR geni ekspresyon seviyesi RT-qPCR ile ölçülürken plazma kalsiyum seviyesi mikrop plazma atomik emisyon spektrofotometresi (MP-AES) ile ölçülmüştür. Laktasyonun 1. ayına göre 3., 5. ve 7. aylarında CaSR genine ait ekspresyon seviyesinin önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Laktasyonun 1. ve 3. aylarına göre diğer aylarda kalsiyum seviyelerinde önemli derecede azalma tespit edilmiştir. Plazma kalsiyum miktarındaki azalma CaSR geninin ekspresyon seviyesindeki azalma ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Böylece laktasyon ile kaybolan kalsiyumun plazmadaki düşüşünü engellemek için metabolizmanın koruma refleksi oluşturarak CaSR ekspresyonunu azalttığı görülmüştür. Yapılan bu çalışmayla laktasyon dönemindeki keçilerde süt ile birlikte ortaya çıkan kalsiyum kaybının kandaki regülasyonunu CaSR geni ile sağlandığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: CaSR, Damascus, gen ekspresyonu, laktasyon

Determination of Leucocyte CaSR Gene Expression Level and Plasma Calcium Level in Lactated Goats

Summary: Milk efficiency has a big importance in goat breeding. Calcium exist in milk's ingredient is significant for human health. Calcium takes part in many physiological processes such as cell membrane permeability, oscillation of hormones, enzyme activity. The need for calcium also rises according to milk efficiency in lactation period for metabolism. Calcium is primarily organized by means of the Calcium Sensitive Receptor (CaSR) gene. In this study the relationship between the lactation and expression level of CaSR gene eith blood calcium level were evaluated in lactating Damascus goats. While CaSR expression gene was measured with RT-qPCR, plasma calcium level was measured with micro plasm atomic emission spectrophotometer (MP-AES). An important level of decline in calcium levels was found in the other months except for 1st and 3rd months. It has been found that the decline in the level of plasm calcium quantity was coherent with the decline of the expression level of CaSR. By this way it has been observed that metabolism lessens the CaSR expression by forming a protection reflex in order to prevent the falling of calcium lost with lactation. In this study, it has been found that regulation of calcium loss in blood which appears with milk of goats in lactation period is provided with CaSR gene.

Key words: CaSR, Damascus, gene expression, lactation

Giriş

Günümüzde keçi yetiştiriciliği genellikle süt ihtiyacını karşılamak amacıyla yapılmaktadır. Türkiye'de Suriye sınır boyundaki illerde (Hatay, Kilis, Gaziantep ve Şanlıurfa) genellikle sütçü verim özelliğine sahip Damascus keçisi yetiştirilmektedir (10). Damascus keçileri, genellikle yılda 1 defa doğum yaparlar ve laktasyon süreleri 7- 8 ay arasında değişim gösterir. Lak-

tasyonun ilk zamanlarında süt verimi oldukça yüksektir. Ancak laktasyonun ilerleyen dönemlerinde bu eğri azalır ve sifıra kadar düşer (27).

Keçi sütünün içeriğinde laktoz, protein, yağ ve mineral madde gibi birçok besleyici unsurlar bulunmaktadır. Mineral maddelerden kalsiyum metabolizmada oldukça önemli bir role sahiptir (6). İnsan sağlığı açısından da oldukça önemli olan keçi sütü içeriğindeki kalsiyum ile birlikte neonatal dönemde iskelet sistemi için gerekli olan tüm besin maddelerini içermektedir (14,20). Kandaki kalsiyum miktarı metabolizmada özellikle de laktasyon gibi metabolik olaylar içinde büyük bir yere sahiptir (6).

Geliş Tarihi/Submission Date : 08.01.2019
Kabul Tarihi/Accepted Date : 01.04.2019

*Bu çalışma ilk isim yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir ve VII. Ulusal Veteriner Zootekni Kongresinde sunulmuştur.

Kalsiyum; kas kasılması, kanın pıhtılaşması, sinirsel uyarım ile hormonların salınması, enzim aktivitesi ile hücre membranlarının geçirgenliği gibi vücutta birçok biyolojik mekanizmada görev almaktadır (24). Vücutta kalsiyum dengesi paratiroid hormon, kalsitonin ve vitamin D tarafından sağlanmaktadır. Özellikle laktasyon döneminde salgılanan sütte dolaylı kalsiyum ihtiyacı artmaktadır. Zira günlük sekrete edilen süt içerisinde 300 ile 400 mg arasında kalsiyum bulunmaktadır (14,20).

Kalsiyuma duyarlı reseptör (CaSR); kalsiyumun ekstrasellüler sıvılardaki değişimine bağlı olarak, kalsiyumun G proteinine bağlanarak 7-transmembranlı geçişini sağlayan bir yüzey reseptörüdür (4). CaSR geni bu nedenle vücutta kalsiyum homeostazisini sağlayan esas faktörlerden birisidir (11). CaSR'nin en önemli görevi kalsiyum homeostazisini düzenlemesi olmasına rağmen, kalsiyotropik olmayan dokularda da CaSR eksprese edilmektedir. Bu dokularda CaSR çok sayıda hücreli faaliyeti düzenlemektedir (5). Bu sebeple kan kalsiyum seviyesine CaSR geninin ne

samanı ile beslenmişlerdir. Keçiler 4m²/baş kapalı ve 8m²/baş açık zemin alanlı ağılda barındırılmışlardır.

Çalışma, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onay alınarak yürütülmüştür (Karar no:2014-07/10). Laktasyonun 1, 3, 5 ve 7. aylarında her keçiden V. jugularis'den EDTA'lı 5 ml kan alınmıştır. Alınan kan örneklerinin plazma ve lökositleri ayrılmış ve elde edilen plazma ile lökosit örnekleri analizler yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır.

Gen ekspresyonu

Analizler için - 80°C'den çıkarılan lökosit hücre pelletinin üzerine 1 ml trizol ilave edilmiş daha sonra lökositlerin parçalanması için 30 sn sonikasyon 30 sn soğutma protokolüne göre 3 siklus sonikasyon uygulanmıştır. TRI-Reagent kit protokolüne göre (Protokol no: T9424, Sigma- Aldrich, USA) RNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen RNA'nın konstantrasyon ve saflık ölçümü yapılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. RNA konsantrasyon ve saflık miktarları (Ort ± Ss)

| Özellik | Laktasyonun 1. ayı | Laktasyonun 3. ayı | Laktasyonun 5. ayı | Laktasyonun 7. ayı |
|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Konsantrasyon (ng/ µl) | 448.28±227.76 | 652.62±193.12 | 722.29±247.43 | 504.80±142.83 |
| Saflık (A260/280) | 1.99 ± 0.23 | 1.87 ± 0.16 | 1.85 ± 0.09 | 1.84 ± 03 |

derecede etkilediğini bilmek tüm sistem bakımından oldukça önemlidir.

Kalsiyumun meme bezinden süte geçişi sırasında transport yolu kan plazmasıdır (2). Laktasyonun erken ya da geç dönemlerinde kanda bu geçişe bağlı olarak hipokalsemi şekillenebilmektedir. Özellikle Damascus keçisi gibi sütçü özelliği ile tanınan ırklarda böyle sorunlara sıklıkla rastlanabilmektedir. Laktasyon süresince kaybolan kalsiyumun kandaki değişimi ve özellikle laktasyon süresince kandaki kalsiyum seviyesindeki değişimin gen ekspresyonu ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada laktasyon dönemindeki keçilerde plazma kalsiyum seviyesi ve buna CaSR geninin etkisi araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Tablo 2. CaSR ve RPLP0 genlerinin çoğaltılması için kullanılan primer dizileri

| Gen | Sekans | Accession no | Kaynak |
|-------|---------|------------------------|----------------|
| CaSR | Forward | CGAGACGCCTTACATGGATTAT | - |
| | Reverse | TTGTAGGGCATGGGCAATAG | |
| RPLP0 | Forward | CAACCCTGAAGTGCTTGACAT | NM_001012682.1 |
| | Reverse | AGGCAGATGGATCAGCCA | |

Konsantrasyon bakımından uygun olan örnekler cDNA'ya dönüştürülmüştür. Yeterli konsantrasyona ulaşılamayan örneklerde tekrar izolasyon yapılarak bu durum ortadan kaldırılmıştır. cDNA sentezi için; total RNA'dan 5µl, oligo (dT) Primerden 1µl, 4 µl 5x Reaction Buffer, 1 µl RiboLock RNase Inhibito, 2µl 10 mM dNTP Mix, 1 µl Revert Aid M-MuLVRT ve 6 µl Nuclease free su ilave edilen tüpler 60°C'de 42 dk, 25°C'de 5 dk, 42°C'de 60 dk ve 70°C'de 5 dk inkübe edilen protokolü uygulanmıştır. Elde edilen cDNA örnekleri 100 µl'ye ulaşacak şekilde DEPC'li su ile sulandırarak RT- qPCR uygulamaları için -20°C'de muhafaza edilmiştir.

CaSR geninin ekspresyon seviyesini belirlemek için RPLP0 (Ribosomal Protein Large Subunit P0) house-

Hayvan materyali

Araştırmanın hayvan materyalini 2. ya da 3. doğumunu yapmış 10 baş Damascus ırkı keçi oluşturmuştur. Keçiler ikiz doğum yapmış olup çalışma boyunca 1,2 kg/baş/gün konsantre yem ve 1 kg/baş/gün buğday

keping gen olarak kullanılmıştır (8). Her örnek duplike olarak amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon için 5µl cDNA, 10 µl SYBR Green Master Mix (Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix, Bio- Rad, USA), 4 µl Primer (Forward- Reverse) ve 1 µl Nuclease free su ile hazırlanan 20 µl'lik örnekler RT-qPCR'da

(Rotor Gene, Qiagen) amplifiye edilmişlerdir. RT-qPCR protokolü; 10 dk 95°C'de, 15 sn 95°C'de, 60 sn 60°C'de (40 siklus) ve 30 sn 72°C olarak ayarlanmıştır.

CaSR geninin primer dizisi Primer3 Input (Version 0.4.0) programında proje ekibi tarafından tasarlanmış NCBI, ENSEMBL ve BLAST kontrolleri yapılarak sadece ilgili bölgeyi çoğalttıkları teyit edilmiştir. Kullanılan primer dizileri Tablo 2'de verilmiştir.

Plazma kalsiyum ölçümü

Plazma kalsiyum seviyesini belirlemek için; 0.5 ml plazma örneklerinin üzerine 10 ml Nitrik Asit ilave edilerek 6 saat süreyle kapalı devre yaş yakma uygulanmıştır. Geri soğutucu ile toplanan nitrik asitten sonra örneklerin üzerine 10 ml ultra saf su ilave edilerek soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan örnekler 1 numara Watmann filtresinden geçirilerek 50 ml'lik falkon tüplere alınmıştır. Falkon tüplerdeki örnekler 25 ml hacme ulaşana kadar ultra saf su ile tamamlanmıştır. İlgili örneklerde kalsiyum ölçümü için MP-AES (AgilentTech, USA) cihazından yararlanılmıştır. Cihaz çalışma koşulları; alıkonma süresi 30 sn, durulama süresi 15 sn, sabitleme süresi 25 sn, pompa hızı 15 rpm, dalga boyu 393 nm, nebulizer basıncı 120 kPa olarak ayarlanmıştır.

İstatistiksel analiz

İstatistik analizlerde IBM SPSS 20 (SPSS Inc. ABD) paket program kullanılmıştır. Plazma kalsiyum değeri için laktasyon aylarına göre değişimin istatistik önem kontrolü Friedman testi ile belirlenmiştir. İkili gruplar (laktasyonun 1. ayı- 3. ayı; laktasyonun 1. ayı- 5. ayı; laktasyonun 1. ayı- 7. ayı) arasındaki farklılığın karşılaştırması Wilcoxon testi ile yapılmıştır. Gen ekspresyonu verileri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (19) yöntemine göre değerlendirilerek Fold Change ve Fold Regulation olarak verilmiştir.

Bulgular

Laktasyon boyunca (1., 3., 5. ve 7. aylarda) alınan plazma örneklerinin kalsiyum seviyesi Tablo 3' de verilmiştir.

Tablo 3. Damascus keçilerinde laktasyon döneminde plazma kalsiyum düzeyleri [Ortanca (Yüzdellik dilim %25-75) (n=10)]

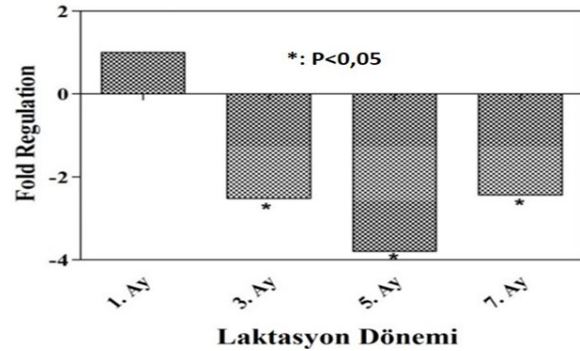
| Özellik | Laktasyonun 1. ayı | Laktasyonun 3. ayı | Laktasyonun 5. ayı | Laktasyonun 7. ayı | P değeri |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------|
| Plazma Kalsiyum seviyesi (mg/dl) | 9.63 ^a (8.49-10.07) | 9.57 ^a (8.58-10.73) | 8.64 ^b (8.09-9.31) | 8.32 ^b (7.32-8.81) | 0.021 |

^{a, b}: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar birbirinden farklıdır (P<0.05).

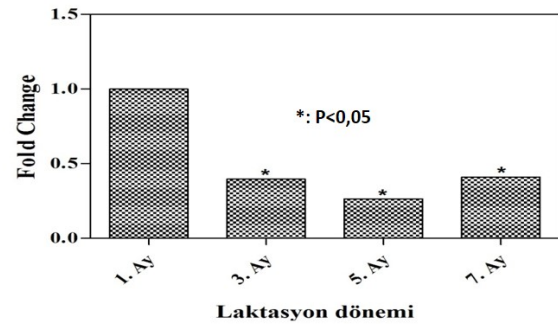
Plazma kalsiyum seviyesi bakımından laktasyonun 1. ve 3. ayına göre diğer aylarda anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (P<0.05).

RT- qPCR da analizleri gerçekleştirilen CaSR genine ait ekspresyon seviyesi Fold Change ve Fold Regulation olarak gösterilmiştir (Şekil 1 ve 2). Laktasyonun

1. ayı kontrol olarak kabul edildiği zaman diğer aylarda CaSR geninin ekspresyon seviyesinde önemli düzeyde down-regülasyon olduğu belirlenmiştir (P<0.05).



Şekil 1. Laktasyon dönemindeki CaSR geninin ekspresyon seviyesi (Fold Regulation)



Şekil 2. CaSR geninin laktasyon dönemindeki ekspresyon seviyesi (Fold Change)

Tartışma ve Sonuç

Keçi sütü içeriğinde mineral maddeler (Ca, Mg, P vs.) başta olmak üzere besleyici birçok unsur bulunmaktadır (6). Bu nedenle de iskelet gelişimi için gerekli olan tüm kalsiyumu içermektedir. Sütteki kalsiyum oranı %13 olup laktasyon süresince bu oran değişkenlik göstermektedir. Zira sütle atılan kalsiyumun, CaSR gen regülasyon mekanizmaları ile kompanse edilmeye çalışıldığı düşünülmektedir.

Keçilerde gebelik döneminde kalsiyum ihtiyacı günde 10.5 g iken laktasyon döneminde bu miktar 30 g'a kadar yükselmektedir (15). Doğumla birlikte laktasyonun başlamasıyla da kalsiyum ihtiyacı artmaktadır. Her litre süt ile 1-1.5 g kalsiyum atılmaktadır (1). Doğum sonrası erken dönemde kalsiyum mobilizasyonundaki yetersizlik, ruminantlar için önemli bir sorun

teşkil etmektedir. Bu kritik süre boyunca kana kalsiyum sağlamak için kemikten kalsiyum mobilizasyonunun arttığı yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır (17,18). Yapılan çeşitli çalışmalar ile, laktasyon dönemindeki keçilerin sütle birlikte sürekli kalsiyum kaybettiklerini bildirmişlerdir (3,9). Liesegang ve ark. (16), laktasyon dönemindeki *Saanen* keçileri ile yaptıkları çalışmada süttteki total kalsiyum miktarını laktasyonun 1., 2., 3. ve 4. aylarda sırasıyla 8.1; 4.8; 4.0 ve 3.8 (g/gün) olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmaların tamamında sütle eksrete edilen kalsiyumun genetik regülasyonu hakkında bir fikir bulunmamaktadır. Ancak CaSR geninin vücutta kalsiyum homeostazında primer etkili gen olması sebebi ile laktasyondaki kalsiyum kaybını düzenlediği düşünülmektedir. Yakan ve ark. (28), laktasyondaki *Damascus* keçilerinde yaptıkları çalışmada laktasyonun 1., 3., 5. ve 7. aylarında süt kalsiyum seviyesini sırasıyla 1156, 594, 485 ve 629 µg/lt olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada laktasyon süresince tespit edilen kan kalsiyum seviyesindeki azalma (laktasyonun 1., 3., 5. ve 7. aylarında sırasıyla 9.63; 9.57; 8.64 ve 8.32 mg/dl), Yakan ve ark. (28)'nin laktasyonun 5. ve 7. aylarında belirttikleri süt kalsiyum seviyesindeki azalma ile uyum göstermektedir. Laktasyonun 3. ayında 1. aya göre sütte kalsiyum seviyesi önemli düzeyde (1156 µg/lt'den 594 µg/lt'ye) azalır iken benzer bir etki kanda olmamıştır (9.63 mg/dl'ye karşı 9.57 mg/dl). Bu durum sütle ekstrete olan kalsiyumun kan tablosunda bir müddet regüle olabildiğini ancak laktasyon ile meydana gelen kalsiyum kaybının devam etmesi halinde (laktasyonun 5. ve 7. ayı) benzer tablonun kana da yansıtıldığını göstermiştir.

Yapılan çalışmalarda (23, 26) laktasyon döneminde özellikle kalsiyum depolarında azalma meydana geleceğinden diyetle kalsiyum alınması önerilmektedir. Laktasyondan sonra kemik yoğunluğundaki kazancın yine yemle alınacak kalsiyum ile artacağı düşünülmektedir. Thomas ve Weisman (26) yaptıkları çalışmada, maternal kalsiyum depoları tükendiği takdirde, kemik sağlığı üzerinde olumsuz etkilerini belirterek gebelik ve laktasyon sırasında özellikle önemli olduğunu vurgulamışlardır. Ntailianas ve Whitney (23), yapmış oldukları çalışmada süt ile atılan kalsiyumun laktasyon sonrasında tekrar vücutta biriktiğini bildirmişlerdir. Laktasyon süresince azalan kalsiyum rezervlerinin CaSR ile korunmaya çalışıldığı düşünülmektedir. Yapılan bu çalışmada laktasyonun 1. ayına göre laktasyonun 3, 5 ve 7. aylarında CaSR geni önemli seviyede down-regüle olmuştur ($P<0.05$). Böylece kalsiyum mobilizasyonunu azaltarak rezervler korunmaya çalışılmıştır. Başka bir ifade ile, laktasyon ile meydana gelen kalsiyum kaybının CaSR geninin homeostaz yeteneği ile düzenlenmeye çalışıldığı ortaya konulmuştur.

Kohler ve ark. (13), tarafından yapılan bir çalışmada, laktasyondaki keçilerde serum kalsiyum miktarı ölçülmüş, laktasyonun ilerlemesiyle birlikte kalsiyum sevi-

yesinin azaldığı bildirilmiştir. Bu bulgular mevcut çalışmaya ait bulgular ile uyumludur. Samardžija ve ark. (25), puerperium dönemdeki *Boer* keçilerinde yaptıkları çalışmada serum kalsiyum miktarının 2.29- 2.39 (mmol/L) olarak bildirmişler ve laktasyonun ilk 40 gününde plazma kalsiyum seviyesi takip edilmiş ve laktasyon ile birlikte sabit bir seviye tespit edilmiştir. Bu bulgular mevcut çalışmanın bulguları ile uyum göstermektedir. Zira bu çalışmada da plazma kalsiyum seviyesinde laktasyonun 1 ve 3. aylarında benzer olarak anlamlı bir azalma görülmemiş ve sabit kalmıştır.

Farklı keçi ırklarında yapılan çalışmalarda serum kalsiyum seviyeleri 2.11-2.90 (mmol/lt) olarak bildirilmiştir (7,12). Mbassa ve Poulsen (21), laktasyon döneminde bulunan Danimarka keçi ırkında yaptıkları çalışmada serum kalsiyum seviyesinin laktasyonun ilerlemesi ile düşüş gösterdiğini bildirmişlerdir. *Damascus* keçilerinde yapılan bu çalışmada plazma kalsiyum seviyesi bakımından tespit edilen bulgular Danimarka keçi ırkı ile benzerlik göstermiştir.

Milewskil ve ark. (22), koyunlarda serum kalsiyum miktarını laktasyonun ilk döneminde 2.53 (mmol/lt) olarak bildirirken, laktasyonun ilerleyen zamanlarında bu seviyenin düzenli olarak azaldığını bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada *Damascus* keçilerinden laktasyonun 1, 3, 5 ve 7. aylarında alınan plazma örnekleri üzerinde yapılan kalsiyum ölçümü sonuçlarına göre laktasyonun 1 ve 3. aylarında tespit edilen değerler (9.63 ve 9.57 mg/dl) birbirlerine benzer olurken, 5. ve 7. aylarda ise bu değerlerde azalma (8.64 ve 8.32 mg/dl) tespit edilmiştir. Laktasyondaki koyunlarda serum kalsiyum seviyesi için tespit edilen düzenli azalmanın keçilerde meydana gelmediği gözlenmiştir. Bu durumun koyun ve keçiler için hem tür hem de beslenme farkından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ardeshirpour ve ark. (24) yaptıkları çalışma ile paratiroid ve renal CaSR arasındaki sinyalleşmelerin normal kalsiyum homeostazında kritik olduğunu bildirmişlerdir. Böbrek ve tiroid bezi üzerinde yapılan çalışmalara destek olarak bu çalışma ile CaSR geninin kanda da kalsiyum salınımını regüle ettiği ortaya konulmuştur. Zira, süte kalsiyum geçişinin kaynağı olan kanda CaSR geni laktasyon ilerledikçe laktasyonun başına göre down-regüle olmaktadır ($P<0.05$). Bu nedenle CaSR geninin down-regülasyonuna bağlı olarak kana dolayısıyla süte kalsiyum geçişinin azaldığı düşünülmektedir. Bir başka ifade ile; laktasyon döneminde artan kalsiyum talebini karşılamak için kemikten kana kalsiyum geçişi de artmaktadır. Fakat laktasyonun ilerleyen dönemlerinde artan kemik kaybını önlemek için CaSR' nin ekspresyon seviyesinde de azalma olduğu belirlenmiştir.

Laktasyonun 1., 3., 5. ve 7. aylarında kan örneklerinden izole edilen RNA ile CaSR ekspresyon seviyesi ölçülmüştür. CaSR'nin ekspresyon seviyesi laktasyon

dönemi başlarına göre daha sonraki süreçte down-regüle olduğu gözlemlenmiştir ($P < 0.05$). Keçilerde CaSR gen ekspresyonunun laktasyon sırasında zamanla down-regüle olması ile bireyin hipokalsemi riskinin azaltıldığı düşüncesi oluşmaktadır. Bu çalışma sırasında yapılan literatür tarama bilgileri ve çalışma bulguları beraber değerlendirildiğinde; tür, ırk, yaş, doğum tipi ve beslenme gibi faktörlerin CaSR gen ekspresyonu ve plazma kalsiyum seviyelerini etkileyebileceği düşünülmektedir. Bu sebeple ilgili özelliklerin CaSR gen ekspresyonu ile ilişkisi hakkında yeni çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Kaynaklar

- Allen WM, Samson BF. Milk fever and calcium metabolism. *J Vet Pharma Therap* 1985; 8(1): 19-29.
- Ardeshirpour L, Dann P, Pollak M, Wysolmerski J, VanHouten J. The calcium-sensing receptor regulates PTHrP production and calcium transport in the lactating mammary gland. *Bone* 2006; 38(6): 787-93.
- Brendehaug J, Abrahamsen RK. Chemical composition of milk from a herd of Norwegian goats. *J Dairy Res* 1986; 53(2): 211-21.
- Brennan SC, Conigrave AD. Regulation of cellular signal transduction pathways by the extracellular calcium-sensing receptor. *Current Pharma Biotech* 2009; 10(3): 270-81.
- Brown EM, MacLeod RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 2001; 81(1): 239-97.
- Coşkun H, Öndül E. Keçi sütü ve insan beslenmesindeki önemi. Sekizinci Gıda Kongresi. Mayıs, 26-28, 2004; Bursa- Türkiye.
- Erdoğan S, Ergün Y, Erdoğan Z, Konaş T. Hatay bölgesinde merada yetiştirilen koyun ve keçi serumlarında bazı mineral madde düzeyleri. *Turk J Vet Anim Sci* 2002; 26: 177-82.
- Finot L, Marnet PG, Dessauge F. Reference gene selection for quantitative realtimePCR normalization: application in the caprine mammary gland. *Small Rumin Res*, 2011; 95: 20-6.
- Fleet IR, Peaker M. Mammary function and its control at the cessation of lactation in the goat. *J Physiol* 1978; 279(1): 491-507.
- Günlü A, Alaşahan S. Türkiye'de keçi yetiştiriciliği ve geleceği üzerine bazı değerlendirmeler. *Vet Hek Der Derg* 2010; 81 (2): 15-20.
- Harpio R, Einarsson R. S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. *Clin Biochem* 2004; 37 (7): 512-8.
- Hoffmann WE, Solter PF. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Kaneko JJ, Harvey W, Bruss ML eds. Diagnostic enzymology of domestic animals. Sixth edition. San Diego: Elsevier Academic Press. 2008; pp. 351-78.
- Kohler M, Leiber F, Willems H, Merbold L, Liesegang A. Influence of altitude on vitamin D and bone metabolism of lactating sheep and goats. *J Anim Sci* 2013; 91(11): 5259-68.
- Kirby BJ. Ardeshirpour L, Woodrow JP, Wysolmerski JJ, Sims NA, Karaplis AC, Kovacs CS. Skeletal recovery after weaning does not require PTHrP. *J Bone & Mineral Res* 2011; 26(6): 1242-51.
- Liesegang A, Riner K, Boosb A. Effects of gestation and lactation on Vitamin D receptor amounts in goats and sheep. *Domestic Anim Endocrin* 2007; 33(2):190-202.
- Liesegang A, Risteli J, Wanner M. Bone metabolism of milk goats and sheep during second pregnancy and lactation in comparison to first lactation. *J Anim Physiol Anim Nutri* 2007; 91(5-6): 217-25.
- Liesegang A, Risteli J, Wanner M. The effects of first gestation and lactation on bone metabolism in dairy goats and milk sheep. *Bone* 2006; 38(6): 792-802.
- Liesegang A, Sassi ML, Risteli J, Eicher R, Riond JL, Wanner M. Comparison of bone resorption markers during hypocalcemia in dairy cows. *J Dairy Sci* 1998; 81(10): 2614-22.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001; 25 (4): 402-08.
- Mamillapalli R, Wysolmerski J. The calcium-sensing receptor couples to Gas and regulates PTHrP and ACTH secretion in pituitary cells. *J Endocrin* 2010; 204 (3): 287-97.
- Mbassa GK, Poulsen JSD. Influence of pregnancy, lactation and environment of haematological profiles in danish landrace dairy goats (*capra hircus*) of different party. In *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comp Biochem* 1991; 100(2): 403-12.
- Milewskil S, Sobiech P, Zqbekl K, Zarczyrska K, Antoszkiewicz Z, Wielgosz-Groth Z. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast on milk protein content and composition and serum mineral concentrations in sheep. *J Element* 2012; 17(1): 79-

86.

23. Ntalianas HA, Whitney RM. Calcein as an indicator for the determination of total calcium and magnesium and calcium alone in the same aliquot of milk. *J Dairy Sci* 1964; 47(1): 19-27.
24. Pineda MH, Dooley, MP. eds. Mc Donald's Veterinary Endocrinology and Reproduction. In: The calcium regulation hormones: Parathyroid hormone, calcitonin and cholecalciferol. 5th Revised edition. Ames, AI: Iowa State University Press, 2003; pp. 71-140.
25. Samardzija M, Dobranic T, Lipar M, Harapin I, Prvanovic N, Grizelj J, Gracner GG, Dobranic V, Radisic B, Duricic D. Comparison of blood serum macromineral concentrations in meat and dairy goats during puerperium. *Veterinarski Arhiv* 2011; 81(1): 1-11.
26. Thomas M, Weisman SM. Calcium supplementation during pregnancy and lactation: Effects on the mother and the fetus. *American J Obst Gynecol* 2006; 194(4): 937- 45.
27. Yakan A. Koyun ve keçilerde süt verim kontrol yöntemleri ve laktasyon süt veriminin hesaplanması. *AVKAE Dergisi* 2012; 18-23.
28. Yakan A, Ozkan H, Eraslan Şakar A, Ateş C T, Ünal N, Koçak Ö, Doğruer G, Özbeyaz C. Milk yield and quality traits in different lactation stages of Domascus goats: Concentrate and pasture based feeding systems. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 2019; 66 117-129.



Kayseri İlinde Satışa Sunulan Sokak Sütlerinde *Mycobacterium paratuberculosis* Varlığının Konvansiyonel ve Serolojik Yöntemlerle Araştırılması*

Meral ÖZTÜRK KALIN¹, K. Semih GÜMÜŞSOY², Harun HIZLISOY³

¹Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Servisi, Kayseri, TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE

³Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE

*Sorumlu yazar: Prof. Dr. Kadir Semih GÜMÜŞSOY; E-posta: ksemih38@gmail.com; ORCID: 0000-0001-6326-0377
Atıf yapmak için: Öztürk Kalın M, Gümüşsoy KS, Hızlısoy H. Kayseri ilinde satışa sunulan sokak sütlerinde *Mycobacterium paratuberculosis* varlığının konvansiyonel ve serolojik yöntemlerle araştırılması. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(3): 190-197.

Özet: Bu çalışmada Kayseri ilinde satışa sunulan sokak sütlerinde *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)'in varlığı konvansiyonel ve serolojik yöntemlerle araştırılması amaçlandı. Araştırmada Mayıs 2010 – Ekim 2011 yılları arasında Kayseri'nin ilçelerinden farklı satıcılardan 200 çiğ inek süt örneği toplandı. Her bir süt numunesi direkt mikroskopi, kültür ve serolojik yöntem olmak üzere üç aşamada değerlendirildi. Direkt mikroskopide süt örneklerinden hazırlanan preparatlar Ziehl-Neelsen boyama metodu ile boyandı. Ayrıca besiyerlerinden izole edilen şüpheli kolonilerin boyamasında da aynı yöntem kullanıldı. Etken izolasyonu amacıyla süt numunelerinin bakteriyolojik ekimleri gliserinli ve gliserinsiz Löwenstein-Jensen ve Watson-Reid agara yapıldı. İdentifikasyon için katalaz, niacin, nitrat redüksiyon, pirazinamidaz ve üreaz testleri kullanıldı. Sütteki antikorların araştırılmasında *Mycobacterium paratuberculosis* Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) kitinden yararlanıldı. İncelenen örneklerde üç yönteminin kullanılması sonucu sadece 1 numunede (% 0.5) MAP tespit edildi. Sonuç olarak, Kayseri ilinde satışa sunulan sokak sütlerinde paratüberkülozun yüksek oranda bulunmadığı belirlendi. Ancak bir örnekte etkenin tespiti enfeksiyonun önemi göz önünde bulundurulduğunda halk sağlığı açısından önemli risk oluşturabileceği kanaatini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: ELISA, identifikasyon, izolasyon, *Mycobacterium paratuberculosis*, sokak sütü

The Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* by Serological and Cultural Methods in Raw Milks Retailed in Kayseri

Summary: In this study, it was aimed to investigate the presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in raw milk sold in Kayseri province by conventional and serological methods. Between May 2010 and October 2011, 200 raw cow milk samples were collected from various sellers of the Kayseri provinces. Each milk sample was evaluated in three steps including direct microscopy, culture and serological method. Preparations from milk samples were stained with Ziehl-Neelsen staining method in direct microscopy method. In addition, the same method was used for the staining of suspicious colonies isolated from the media. For the purpose of isolation, the bacteriological inoculation of milk samples was carried out onto Watson-Reid agar and Löwenstein-Jensen supplemented with and without glycerin. Catalase, niacin, nitrate reduction, pyrazinamidase and urease tests were performed for the identification. *Mycobacterium paratuberculosis* Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) kit was used for the detection of antibodies in milk samples. MAP was detected in only one sample (0.5%) with the using of three identification methods. As a result, it has been understood that paratuberculosis was not found at high rate in raw milk sold in Kayseri province. However, it has been concluded that the presence of an agent in one sample may pose a significant risk for public health when considering the importance of infection.

Key words: ELISA, identification, isolation, *Mycobacterium paratuberculosis*, raw milk

Giriş

Paratüberkülozis (Johne's Disease) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) tarafından sığır, koyun ve keçi başta olmak üzere deve, manda, antilop ve geyikler gibi birçok evcil ve vahşi hayvanda gözlenen infeksiyöz ve bulaşıcı bir hastalıktır (7,17).

Paratüberküloz veya Johne hastalığı tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde sığırlarda önemli ekonomik kayıplara yol açan enfeksiyon olma özelliğini hala korumaktadır. Ruminantlarda başlıca sindirim sistemi etkilenmekte ve kontagiyöz, kronik ve ölümcül bir seyir görülmektedir. İnfekte hayvanların özellikle dışkıları ile çevreyi sürekli kontamine etmeleri önemli bir sorundur. Bu bakımdan infekte sığırların kısa süre içerisinde tespit edilmesi önem arz etmektedir. İnfeksiyonun zoonotik bir boyutu şu an için olmamasına rağmen sığırlarda hastalığı meydana getiren *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) ile

Geliş Tarihi/Submission Date : 25.12.2018

Kabul Tarihi/Accepted Date : 01.04.2019

*Bu araştırma ilk isimli araştırmacının Yüksek Lisans tezinden üretilmiş olup, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından TSY-10-1089 kodlu proje ile desteklenmiştir.

insanlarda Crohn hastalığı arasında bir ilişkinin bulunduğu bildirilmekte ve son yıllarda güncel olarak bu konu üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır (18,22).

Türkiye'de yıl boyunca elde edilen sütün yüzde %40'ı pazarlanmakta, pazarlanan kısmın ise %60'ı işlem göreyerek tüketici ile buluşmaktadır. İşlem gören sütün %20'si direk tüketilmekte geriye kalan kısımda peynir, tereyağ gibi dayanıklı ürün olarak değerlendirilmektedir. Sütün kalitesi, büyük ölçüde, hayvanın temizliği yanı sıra ahır ve görevlilerin hijyeni ile yakından ilgilidir. Zira çiğ sütün dayanıklılığı, büyük ölçüde içerdiği bakteri sayısına, bakterilerin çoğalma hızlarına ve bakterilerin büyüme ve çoğalmaları için geçen süreye bağlı olarak farklılık gösterir. Sütün sağıldığı andaki sıcaklık yaklaşık 35-37 °C'dir. Bu sıcaklık dereceleri birçok bakterinin üremesi için elverişlidir. Ayrıca süt üretim yerlerinden işletmeye gelinceye kadar da bir süre geçmektedir. Bu bakımdan bakteriyolojik yönden iyi kalitede sütün elde edilmesi süt üretim yerlerinde başlıca; sütün bakterilerle kontaminasyonunun önlenmesi ve sütte normal olarak bulunan ve/veya sonradan bulaşan bakterilerin gelişmelerinin sınırlandırılması için gerekli önlemlerin alınmasına bağlıdır (28). Paratüberkülozun süt sığırlarında, süt üretiminde ve kalitesinde meydana getirdiği ekonomik kayıplar önemli bir yer tutmaktadır (21). Yüksek süt verimli hayvanlarda infeksiyonun görülme sıklığı diğerlerine oranla daha yüksektir (26). Özellikle yaşamın ilk haftalarında kolostrum veya kontamine sütlerin buzağların tarafından tüketilmesi bulaşmada en önemli kaynak olarak gösterilmiştir (26). Doğal olarak infekte sığırların periparturient döneminde sütlerde MAP'nin düşük miktarlarda bulunduğu, buzağılamadan sonraki 1-2, günlerde kolostrumda en yüksek (50 CFU/ml), 5. günden sonra bu miktarın (1 CFU/ml) düştüğü ortaya konulmuştur (25). Sütün endojen yolla mı yoksa eksojen yolla mı daha yoğun bulaştığına yönelik bilgiler kıyaslandığında özellikle infekte sığırların dışkıları ile çıkartıkları etkenlerin (10^8 CFU/gr) sütü kontamine ettiği tespit edilmiştir (25). MAP ile infekte bir sürüde bazı hayvanlar infekte olmamasına rağmen çoğu hayvan infekte ve subklinik olarak kabul edilmekte ve bir süre sonra bunlar klinik belirtiler gösterebilmektedir. Prepatent dönemdeki hayvanlarda hastalık belirtisi görülmez ve etkenlerin dışkı saçılımı söz konusu değildir. Klinik olarak hayvanlarda kilo kaybı ve ishal başlıca belirtiler olarak görülmekte ve serolojik olarak kanlarında antikor tespit edilmektedir. Genellikle bu dönemde yoğun miktarda dışkı ile bakteri etrafa saçılmaktadır (8). Bu hayvanlardan günde yaklaşık olarak 5×10^{12} etkenin çıkartıldığı tespit edilmiştir (26). Yapılan birçok çalışmada MAP'ler gıda, süt, su ve etten izole edilmişlerdir (23,26).

Paratüberkülozda ilk tanı klinik verilerle yapılmış olsa bile kesin tanı için etkenin direkt tespiti ve kültürde üretilerek tanımlanması esastır. Bu nedenle tanıda "gold standart" kültür ve klinik tanı birlikteliğidir. Kültür

yönteminin spesifitesi yüksek olmasına rağmen sensitivitesi düşüktür (29). Ancak MAP için kültür analizlerinde kısa sürede sonuç elde edilememesi; testin sonuçlanmasının 3 aya kadar uzaması önemli bir dezavantaj olarak görülmektedir. Mikroskopik incelemede aside dirençli basilin görülebilmesi için numune 5×10^3 - 5×10^4 ml basil bulunması gerekmektedir. Kültürde üreyen mikroorganizmaların saptama sınırı 5-100 CFU arasında değişirken, klinik örneklerde duyarlılık çok daha düşüktür (2).

Paratüberküloz ihbarı mecburi bir hastalık olmadığı için ve gerçek prevalansı ortaya koyacak bir teşhis metodu mevcut olmadığından, hastalığın prevalansı ile ilgili tahminler çoğunlukla kesimhanelerde toplanan materyallerin incelenmesi neticesinde elde edilmiştir. Paratüberkülozlu sürülerde kontrol programlarının gerçekleştirilmesinde en önemli konu sürü içerisinde özellikle subklinik hayvanlar başta olmak üzere dışkı ile saçılım yapan infektif hayvanların tespitidir. Tarama testlerinden istenilen infeksiyonun tanımlanmasında sensitivite ve spesifitesinin yüksek olması, kısa sürede sonuç vermesi ve ekonomik olması başlıca kriterlerdir. Serolojik testler bu kriterlerin çoğuna sahip olmasına rağmen sensitivite ve spesifiteleri yönünden dezavantajlarının bulunduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (8, 11, 29). Serolojik testlerden elde edilecek sonuçlar üzerine infeksiyonun aşaması bizzat etkili olmaktadır. Genellikle subklinik ve az miktarda dışkı ile etken çıkarımının söz konusu olduğu durumlarda serolojik testlerden negatif sonuç alınmaktadır. Bu aşamadaki birçok sığırdada humoral antikor yanıtı tanımlanabileceği sınırların altındadır. Hayvanda infeksiyon olmasına rağmen serolojik testlerden negatif sonuçlar alınmaktadır (1,29).

Bu çalışmada MAP'in insanlardaki Chron hastalığının da etkeni olabileceği göz önünde bulundurulduğunda Kayseri ilinde satışa sunulan sokak sütlerinde MAP'in görülme sıklığı ve halk sağlığı açısından risk oluşturma potansiyeli konvansiyonel ve serolojik yöntemlerle araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Süt numuneleri

Kayseri merkez ve çevre ilçelerinde, mahalle aralarında satışa sunulan toplam 200 sokak süt numunesi Mayıs 2010 – Ekim 2011 yılları arasında toplandı. Süt numuneleri steril poşetler içerisine 0,5 lt olacak şekilde bizzat aseptik şartlarda alınarak soğuk zincirde laboratuara getirildi. Laboratuvarda yapılacak analiz yöntemlerine göre herbir süt numunesi 3 adet 50 ml'lik steril falkon içerisine direkt mikroskopi, kültür ve serolojik analizleri yapılmak üzere taksim edildi. Numunelerin direkt mikroskopi ve kültür analizleri aynı gün gerçekleştirildi. Serolojik analizler için sütler soğutmalı santrifüjde 4000 devirde 30 dakika santrifüj edildi. Falkon tüplerin üst kısmında bulunan krema

kısmı uzaklaştırıldıktan sonra orta kısmındaki plazma kısmı, alt kısımdaki hücresel kısma dokunulmadan bir pipet yardımıyla steril 2 ml'lik ependorflara alındı. Plazmalar serolojik analiz yapılmaya kadar -20°C'de saklandı.

Standart suş

Araştırmada fenotipik analizlerde kullanılan pozitif kontrol suş Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Tüberküloz Paratüberküloz Ruam Teşhis Laboratuvarı'ndan temin edildi.

Dekontaminasyon

Süt numuneleri direkt mikroskopi ve kültürel analize tabi tutulmadan önce dekontaminasyon işlemi uygulandı. Bu amaçla Dundee ve ark. (7)'nin bildirdiği yöntemle göre 50 ml'lik steril burgulu kapaklı tüplere (Falkon tüpü) alınan süt numuneleri 2500 devirde 15 dk santrifüj edildi. Daha sonra pellet kısmına %0.75 hexadecylpyridinium chloride (HPC) (Sigma C9002)'den 10 ml ilave edilerek oda ısısında 5 saat bekletildi. Süre sonunda numuneler tekrar 2500 devirde 15 dakika santrifüj edildi. Kalan sediment 0,067 M fosfat tamponu (pH 6.8)'nden 1 ml ilave edilerek nötralizasyonu gerçekleştirildi.

Lowenstein-Jensen (L-J) medium base

Dehidre besiyerinden (Merck 1.05400, Germany) 37.5 gr hassas terazide tartılarak 600 ml distile su içinde çözündürüldü. Gliserol içerecek tüpler için hazırlanacak besiyerine 12 ml gliserol (Merck 1.04094, Germany) ilave edildi. Besiyerine 4 ml etil alkol içerisinde süspanse edilen 2 mg Mycobactin J (ID.Vet, France) katılarak besiyerinin pH'sı 4.8 ± 0.2 olarak ayarlandı. Hazırlanan besiyerlerini içeren duran bottle şişeleri otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edildi ve 50 °C'a soğutuldu. Hazırlanan yumurta (sarı ve beyaz karışık) homojenizatından gliserollü ve gliserolsüz besiyerlerine 1000 ml ilave edildi. Ayrıca kontaminasyonları önlemek amacıyla besiyerine 100,000 U Penicillin G Potassium (Sigma P7794), 50 mg Amphoterisin B (Sigma A4888) ve 50 mg Chloramphenicol (Sigma C0378) katıldı. Kültürün yapılacağı ağız vida kapaklı steril tüplere 7'şer ml olacak şekilde besiyeri taksim edildi. Tüpler yatık olarak pasteur fırınında 85 °C'da 45 dakika tutularak koagülasyona tabi tutuldu. Aynı işlem 24 saat sonra bir kez daha tekrarlandı (6).

Watson-Reid agar

Merkal ve Curran (17)'in, bildirdiği yöntemle göre hazırlandı. Bu amaçla karışım 1000 ml distile su içinde çözündürüldü. Besiyerine 4 ml etil alkol içerisinde süspanse edilen 2 mg Mycobactin J (ID.Vet, France) katılarak besiyerinin pH'sı 5.5 ± 0.2 'e ayarlandı. Hazırlanan besiyerini içeren duran bottle şişesi otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edildi ve 50 °C ye soğutuldu. Kültürün yapılacağı ağız vida kapaklı steril

tüplere 7'şer ml olacak şekilde besiyeri taksim edildi. Besiyerleri gliserol ve gliserolsüz olarak işaretlendikten sonra kullanılmaya kadar buzdolabında 4 °C'da saklandı.

Dubos broth base

Dehidre besiyerinden (Himedia M067, India) 1.3 g hassas terazide tartılarak 180 ml distile su içinde çözündürüldü. Gliserol içerecek tüpler için hazırlanacak besiyerine 10 ml gliserol (Merck 1.04094, Germany) ilave edildi. Besiyerine 4 ml etil alkol içerisinde süspanse edilen 2 mg Mycobactin J (ID.Vet, France) katılarak besiyerinin pH'sı 6.6 ± 0.2 'ye ayarlandı. Hazırlanan besiyerlerini içeren duran bottle şişeleri otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edildi ve 50 °C'ye soğutuldu. Ayrıca kontaminasyonları önlemek amacıyla besiyerine 100.000 U Penicillin G Potassium (Sigma P7794), 50 mg Amphoterisin B (Sigma A4888) ve 50 mg Chloramphenicol (Sigma C0378) taksim edildi. Aseptik olarak hazırlanan sığır serum albumin V (Fluka 05488, UK)'den duran bottle şişelerine 20 ml ilave edildi. Kültürün yapılacağı ağız vida kapaklı steril tüplere 10'ar ml olacak şekilde besiyeri taksim edildi. Besiyerleri gliserol ve gliserolsüz olarak işaretlendikten sonra kullanılmaya kadar buzdolabında 4 °C'da saklandı (6).

Mikroskopik muayene

Hem süt numunelerinden direkt hazırlanan preparatların hem de kültürlerden izole edilen kolonilerin boyanması amacıyla Ziehl Neelsen Boyama Seti (GBL 5017) kullanıldı. Boyama prosedürü üretici firmanın bildirdiği yöntemle yapıldı. Boyama yapılan preparatlar mikroskopta immersiyon objektifi (100x) ile incelendi.

Katı besiyeri kültür yöntemi

Dekontaminasyon işlemi uygulanan süt örneklerinden bir öze dolusu ekim materyali alınarak gliserinli ve gliserinsiz hazırlanan Lowenstein-Jensen (L-J) Medium Base (Merck, 1.05400, Germany) besiyeri ile aynı şekilde gliserinli ve gliserinsiz hazırlanan Watson-Reid agara ekimleri yapıldı. Kültürler aerobik koşullarda 37 °C'de inkubasyona bırakılarak 2-8 hafta üreme yönünden incelendi (6). Besiyerlerinin kontrolü amacıyla Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Tüberküloz Paratüberküloz Ruam Teşhis Laboratuvarı'ndan temin edilen pozitif suş kullanıldı.

Sıvı besiyeri kültür yöntemi

Katı besi yerlerindeki izolatlar identifikasyon amacıyla sıvı besiyerine pasajlandı. Kültürden bir öze yardımıyla alınan şüpheli suşlar gliserinli ve gliserinsiz hazırlanan Dubos Broth Base (Himedia, M067, India)'ye ekimleri yapıldı. Kültürler %5-10 CO₂ içeren ortamlarda 37 °C'de inkubasyona bırakılarak 2-6 hafta süresince üreme yönünden takip edildi (6). Aynı şekilde sıvı besiyerlerinin kontrolü amacıyla pozitif

kontrol suşun da sıvı besiyerine ekimleri gerçekleştirildi.

İdentifikasyon testleri

Elde edilen izolatların identifikasyonu amacıyla katalaz, niasin, nitrat, redüksiyon, pirazinamidaz ve üreaz testleri yapıldı (6).

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Süt numunelerinin plazmasında mevcut antikorların tespiti amacıyla *Mycobacterium paratuberculosis*

Mikroskopik muayene sonuçları

Örneklerin direkt mikroskopik muayenesi sonucu 1 (%0.5) preparatta asido-rezistans bakteriler görüldü.

İzolasyon analiz sonuçları

Kültür yöntemleri sonucu 1 (%0.5) numunenin gliserinli L-J Medium'unda 6. haftada sarımsı renkte yaygın koloniler tespit edilirken aynı süt numunesinin gliserinli Watson-Reid agarında da 7. haftada beya-

Tablo 1. Araştırma materyalinin toplandığı bölgeler ve *M. paratuberculosis* izolasyon oranı

| Alındığı İlçeler | Numune Sayısı | Pozitif Numune Sayısı (%) |
|------------------|---------------|-----------------------------|
| Kocasinan | 20 | 0 |
| Melikgazi | 20 | 0 |
| Talas | 20 | 1 (0.5) |
| Akkışla | 15 | 0 |
| Sarız | 15 | 0 |
| İncesu | 15 | 0 |
| Yahyalı | 15 | 0 |
| Pınarbaşı | 15 | 0 |
| Hacılar | 20 | 0 |
| Felahiye | 10 | 0 |
| Develi | 15 | 0 |
| Özvatan | 20 | 0 |
| Toplam | 200 | 1 (0.5) |

antikor test kiti (ID Screen® Paratuberculosis Indirect, IDVet, France)'nden kullanıldı. Testin yapılışı kiti üreten firmanın bildirdiği prosedüre göre gerçekleştirildi. Sonuçların değerlendirilmesinde KCjunior™ software (BioTek® Instruments, Inc., United States) programı kullanıldı.

Bulgular

Analiz örneklerinin alındığı yerler ve izole edilen suş sayıları

Sokak sütlerinin mikroskopik muayene, kültür ve ELISA'dan oluşan konvansiyonel yöntemler ile incelenmeleri sonucunda, 11 ilçeden toplanan sütler MAP yönünden negatif bulundu. Sadece bir ilçeden alınan 1 (% 0.5) sokak sütünde her üç yöntemden de pozitif sonuç elde edildi. Süt örneklerinin toplandığı yerler, numune sayıları ve izolasyonun yapıldığı ilçe Tablo 1'de gösterildi.

zımsı renkte koloniler görüldü. Bu numuneye ait gliserinsiz heriki besiyerinde ise üreme görülmedi.

İdentifikasyon test sonuçları

Gliserinli L-J besiyeri ve Watson-Reid agardan izole edilen 1 (%0.5) izolatın fenotipik özelliklerinin ortaya konulması amacıyla direkt mikroskopi, katalaz, niasin, nitrat, pirazinamidaz ve üreaz testlerine ait sonuçlar Tablo 2'de gösterildi.

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) sonuçları

Serolojik incelemeler ile 1 (% 0.5) örnek pozitif olarak bulunurken 199 (% 99.5)'u negatif olarak tespit edildi.

Tartışma ve Sonuç

Endemik hastalıklar, hayvancılık sektöründe üretimin her aşamasında büyük kayıplara yol açmakta ve kaynak israfı oluşturmaktadır. Paratüberkülozis (Johne's disease) ruminantlarda başlıca bağırsaklarda kronik

Tablo 2. İzole edilen suşun fenotipik özelliklerin saptanmasında kullanılan testler ve sonuçları

| Testler | L-J Medium (Gliserinli) | Watson-Reid Agar (Gliserinli) |
|---------------|-------------------------|-------------------------------|
| Mikroskopi | + | + |
| Katalaz | + | + |
| Niasin | - | - |
| Nitrat | - | - |
| Pirazinamidaz | - | - |
| Üreaz | - | - |

dejeneratif granulomatöz enteritis ile karakterize enfeksiyonlar meydana getirmektedir. Bunun dışında MAP'in klinik mastitis riskini artırdığı da düşünülmektedir. Bu durum süt üretimini etkilediği için doğrudan ekonomik kayıplara neden olmakta ve başta hayvansal ürünlerin tüketimine bağlı olarak insan sağlığını da tehdit etmektedir. İnfeksiyöz etkenin morfolojik yapısına bağlı olarak bölgesel epidemilerin yaygınlık gösterdiği ve birçok işletmenin enfeksiyondan etkilendiği bildirilmektedir (21).

Ülkemizde enfeksiyonun varlığının ortaya konulmasında çalışmaların seroprevalans ağırlıklı olduğu kültürel ve moleküler çalışmaların ise sınırlı olduğu görülmektedir. Makav ve Gökçe (16), Kars yöresinde subklinik paratüberkülozun seroprevalansını %3.5 bulurken, Öztürk ve ark. (19) Burdur bölgesinde %6.2 olarak bildirmişlerdir. Gümüüşsoy ve ark. (11) Kayseri bölgesinde % 12.24 oranında sero pozitiflik tespit etmişlerdir. İkiz ve ark. (14) ile Özpınar ve ark. (20), Trakya bölgesinde sero pozitiflik tespit edememişlerdir. Yıldırım (30) Uşak bölgesinde % 4 ve Çetinkaya ve ark. (4) Elazığ yöresinde % 3.4 sero pozitiflik bildirmişlerdir. Mevcut çalışmalarda incelenen numune ve laboratuvar yöntemi farklılıklarına bağlı değişik sonuçlar alınmıştır. Özpınar ve ark. (20) enfeksiyonu tespit edemezken Gümüüşsoy ve ark. (11) %12.24'lük bir oranla en yüksek seroprevalansı saptamışlardır. Genel olarak değerlendirildiğinde ülkemizde Avrupa ülkeleri ile karşılaştırıldığında paratüberkülozun seroprevalansının düşük olduğu görülmektedir. Çetinkaya ve ark. (4)'larının ülkemizde en fazla numune olarak 500 sığırdan yaptığı çalışma göz önünde bulundurulduğunda seroprevalansın düşüklüğünün başlıca nedeni olarak düşünülmektedir. Trakyada enfeksiyon saptanamamış olup Burdur dışında batı bölgelerinde enfeksiyon ile ilgili bir bilgiye rastlanılmamıştır.

Paratüberkülozlu sürüler insan sağlığı açısından büyük risk oluşturmaktadır. Çiğ sütün ısıtılması ve bu sütün özellikle genç ve yaşlı insanlar tarafından tüketilmesi süt ile bulaşmanın en önemli unsurudur. Paratüberküloza bağlı mastitislerin değerlendirilmesine yönelik çok az sayıda araştırma bulunmaktadır (11). Mevcut çalışmalar daha çok enfeksiyonun süt verimi üzerindeki etkilerinin ortaya konulduğu çalışmalardır (13). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*'in süt numunelerinden ilk izolasyonu diğer patojenik mikroorganizmalara göre çok uzun zaman almaktadır. Bu süre yaklaşık 20 haftadır. MAP için kullanılan çok selektif bir besi yerinin bulunması ve var olan besiyerlerindeki kontaminasyon olasılıkları ilk izolasyonu güçleştirmektedir (5). Sweeney ve ark. (27), %12 oranında subklinik enfekte sığırların 50 ml sütünün içerisinde yaklaşık 2-8 CFU miktarında etkenin bulunduğunu ve bu enfeksiyöz etkenlerin süt ile çevreyi bulaştırabileceklerini ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar laboratuvarında enfekte sütlerden etkenlerin izole edilememesinin bir sebebinin de süt içerisindeki bakteri yükü olduğunu belirtmişlerdir.

Isıl işlem görmesi sonucu sütlerden etkenlerin izolasyonu ile ilgili farklı çalışma sonuçları bulunmaktadır. Pastörizasyon işlemi uygulanan çiğ sütlerde MAP'nin canlı kaldığı tespit edilmiştir (1,3).

Ayele ve ark. (2), üç işletmeden topladıkları 200 pastörize süt ile perakende satışa sunulan 244 pastörize sütü ZN boyama, kültür ve PCR ile incelemişlerdir. Araştırmacılar iki işletme tarafından pastörize edilen iki sütte kültür haricinde pozitiflik elde ederken ticari olarak pastörizasyonu yapılan perakende satışa sunulan sütlerden dördünde hem boyamada hem de PCR'da pozitiflik elde etmişlerdir. Ancak bu dört sütün sadece ikisinde kültürde pozitiflik görmüşlerdir. Pastörize edilen sütlerde de MAP'in bulunabileceğini ve böyle sütün insan sağlığı açısından risk oluşturabileceğini bildirmişlerdir. Araştırmamızda da ZN boyama, kültür ve serolojik yöntem kullanılarak MAP'in varlığının tespitine gidilmiştir. Ayele ve ark. (2) analize alınacak sütün dekontaminasyon aşaması da dahil izolasyonda hemen hemen aynı metodları kullanmışlardır. Araştırmacılar sütün analiz öncesi santrifüj edilerek pelet kısmının analize alındığını krema kısmının ise atılmasının bir handikap oluşturabileceğini vurgulamışlardır. Krema kısmında da bakteri bulunabileceğini göz önünde bulundurduğumuzda aynı görüşü paylaşmaktayız. Laboratuvar çalışmalarında MAP ile enfekte makrofağların sütün yağ tabakasındaki yağ damlacıklarında buldukları tespit edilmiştir (15). İnfeksiyöz etkenlerinin süt içerisinde yayılmasına yönelik açıklayıcı bilgiler şu an için yeterli değildir. Muhtelemen hematogen ve lenfatik yolla süte ulaştıkları düşünülmektedir. Birçok araştırmacı süt sığırlarının MAP ile enfekte olduklarını ve etkenlerin süte bulaştıklarını göstermişlerdir (9,10).

Paratüberkülozun serolojik olarak teşhisinde kan serumları üzerine yapılan çalışmaların yoğunluğu dikkat çekmektedir. Hendrick ve ark. (12), laktasyondaki 689 sığırdan kan, süt ve dışkı numuneleri toplamışlar ve paratüberkülozun süt üretimi ve süt kalitesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar dışkı örneklerine kültür, kan ve süt numunelerine serolojik analiz yapmışlardır. Yapılan ELISA testleri sonucu 130 (% 18,9) serum ve 77 (%11.2) süt numunesinin pozitif olduğu bulunurken kültürleri yapılan dışkı örneklerinden 72 (% 10,4)'sinden etken izole edilmiştir. Kültür sonuçlarını baz alarak süt ELISA testinin sensitivite ve spesifitesini sırasıyla %21.2 ve %98.6 olarak belirlemişler ve süt ELISA testinin serum ELISA testine oranla kültür testine alternatif olabileceğini vurgulamışlardır. Ross ve ark. (24) MAP ile enfekte olan ineklerin, klinik mastitise yakalanma olasılığının yüksek olduğunu ve MAP yönünden sürü bazında tüm hayvanların kontrolünün yapılmasının göz ardı edilemez faydalı etkilerinin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Hendrick ve ark. (12), paratüberkülozun serolojik teşhisi amacıyla ELISA testini kullanmışlar ve test materyali olarak süt ve serumdan elde edilen sonuç

ların kıyaslamasını yapmışlardır. Araştırmacılar süt ELISA sonuçları pozitif olan hayvanların daha yüksek yüzde de dışkıları ile etkenleri dışarı çıkarttıklarını ifade etmişlerdir. Süt ve serum ELISA uygulamaları sonucu testlerin sensitivite ve spesifitesini sırasıyla en az bir sığıra ait numunelerin analizi yapılmış ise % 91.9 ve %65.5 ile %88.9 ve %42.8 en az iki sığırın numuneleri incelenmesi sonucu %86.9 ve %93.4 ile %82.8 ve %79.5 olarak tespit etmişlerdir. Numune seçiminde sütün seruma oranla tercih edilebileceğini ve tek bir sığır yerine sürü içerisinde birden fazla hayvanın numunesinin incelenmesinin uygun olacağını bildirmişlerdir.

İnfeksiyonun doğal döngüsü ile birlikte subklinik infekte hayvanları tanımlayacak duyarlı ve spesifik bir testin bulunmaması kontrol programlarını yetersiz kılmaktadır. Hali hazırda infeksiyonun teşhisinde kullanılan testler hücrel ve humoral yanıtın ortaya konulmasına yönelik olup avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Günümüzde infeksiyonun daha kısa sürede ve güvenilir bir şekilde teşhis edilmesi ve neticesinde gerekli önlemlerin alınabilmesi amacıyla şu an için bakteriyolojik, serolojik, alerjik ve moleküler testlerden yararlanılmaktadır. Şu an için tek bir test yönteminin teşhis için yeterli olmadığı mutlaka iki test uygulaması sonucunda kararın verilmesi görüşü ağır basmaktadır.

Kronik aşamada oluşan antikorların tanımlanmasında pratik olması ve kısa sürede sonuç vermeleri bakımından serolojik testlerin büyük avantajları bulunmaktadır. Ancak bu testler infeksiyonun erken aşamasında veya subklinik formda oluşabilecek antikorları sınırlı düzeyde tanımlamaktadır. Humoral immun yanıt etkenin vücuttan çıkarılmasından sonra etkisini göstermektedir. Çevresel *Mycobacterium* türlerine karşı ortaya çıkan kros reaksiyonlar serolojik testlerin spesifitesini azaltmaktadır.

Bu çalışmada Kayseri ilinde mahalle aralarında satışa sunulan sütün ELISA yöntemi ile incelenmesi sonucu 200 süt numunesinden sadece 1 (%0.5) numunede pozitiflik saptanmıştır. Örnekler rastgele mahalle arasında satılan sütlerden aynı satıcıdan bir kere alınarak yapılmıştır. Süt toplayıcılar birçok aile işletmesinden topladıkları sütleri bir tankta toplamakta ve bunları mahalle aralarında satışa sunmaktadır. Satışa sunulan sütün hiçbirisi soğuk zincirde deponlanmadığı ve gün boyunca perakende olarak satılmaya kadar sürekli çevresel ısıya maruz kaldıkları görülmüştür.

Hendrick ve ark. (12), süt numunelerini ELISA ile incelemişler ve 77 (%11.2) numunede pozitiflik saptanmıştır. Araştırmamızda kullanılan teşhis yöntemi ve kit araştırmacılarinki ile aynı olup sadece bir süt numunesinde pozitiflik tespit edilmiştir. Bu durumun numune sayısının farklılığından ve numunelerin bireysel değil tank sütünden analiz yapılmasından kay-

naklandığını düşündürmektedir. Araştırmacılar numuneleri 9 sürü toplam 689 sığırdan numuneleri toplamışlar ve örneklerin paratüberküloz yönünden en az bir klinik semptom gösteren sığır sütü olmasına dikkat etmişlerdir.

Çetinkaya ve ark. (4), Elazığ merkeze ve ilçelere bağlı köylerden 78 farklı lokalizasyondan 500 adet süt numunesi toplamışlardır. Numuneleri sağlıklı görünüşe sahip 1.5-2 yaşın üstündeki ineklerden rastgele almışlardır. Araştırmacılar etkenin tanımlanması amacıyla başlıca PCR yöntemini kullanırken pozitif sonuç aldıkları süt numunelerinin kültürünü yapmışlardır. Pozitif sonuç alınan süt numunelerinin 17 (% 68)'sinden kültürel yoklamalar sonucu etken izolasyonu yapmışlardır. Araştırmacılar yaptıkları mini anket çalışması sonucu paratüberküloz görülme oranının %5.5 ineklerin tohumlanmasında boğa kullanıldığını, 4 (%3.3) inekte suni tohumlama ve 1 (%6.3) inekte ise hem boğa hem de suni tohumlama yapıldığını bildirmişlerdir. Ayrıca ineklerin ırk ve yaş gruplarına göre infeksiyonun görülme sıklığının değiştiğini ifade etmişlerdir. Araştırmamızda bizzat sokak sütleri satıcılardan topladığı için süt numunelerinin alındığı sığır ve işletmeye ait bilgiler bulunmamaktadır. Çetinkaya ve ark. (4)'nin infeksiyon üzerine birçok faktörün etkili olabileceği ve bu faktörlere bağlı olarak paratüberkülozun artış gösterebileceğini bildirmişlerdir. Başlıca faktörler arasında iklim, beslenme, ırk, yaş, dölllenme tipi ve barınak koşulları bulunmaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz pozitiflik oranının düşüklüğünün bu faktörlerle yakından ilgili olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, Kayseri bölgesinde yapılan süt sığırcılığında paratüberkülozun yüksek bir oranda olmasında bulunduğu görülmüştür. Bu çalışmada kullanılan serolojik yöntem sonucu elde edilen verilerin gold standart olan kültür yöntemi ile aynı sonuç vermesi hala ELISA'nın rutin uygulamalar için duyarlı, pratik ve ucuz bir test yöntemi olduğunu göstermiştir. Teşhiste kullanılacak laboratuvar yöntemlerinin infeksiyonun seyrine göre hastalığın ortaya konulmasında önemli bir faktör olabileceği kanaatine varılmıştır.

Ülkemiz açısından değerlendirildiğinde ekonomik, politik veya işletmelerden kaynaklanan sebeplere bağlı olarak MAP'nin eradike edilememesi halinde, özellikle infeksiyonun kontrolünü sağlayacak aşı uygulamaları ile ilgili yoğun çalışmaların yapılması ve tüketime sunulan gıda ürünlerinde mikrobiyal kontaminasyonu engelleyebilecek stratejilerin geliştirilmesi B planı olarak üzerinde durulması gereken önemli konulardır. Subklinik infekte sığırların kısa sürede belirlenmesi sağlayabilecek rutin teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi de paratüberkülozun sağlık problemi oluşturma özelliğini ortadan kaldıracaktır. Ayrıca bu sadece ülkemizin sorunu olmak dışında dünyada ruminant yetiştiriciliği yapılan tüm ülkelerin problemi olarak düşünülmelidir. Bu bağlamda paratüberkülozun önemi vurgulayacak organizasyonlar düzenlen-

meli ve infeksiyonun eradikasyonuna yönelik ülkeler arası işbirliği gerçekleştirilmelidir.

Teşekkür

TSY-10-1089 kodlu proje ile bu tez çalışmasının yapılmasındaki maddi katkılarından dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve pozitif kontrol suşun temini hususunda yardımlarını gördüğümüz Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Tüberküloz Paratüberküloz Ruam Teşhis Laboratuvarı Şefi Dr. Erhan AKÇAY'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Anzabi Y, Hanifian S. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in pasteurized milk by IS900 PCR and culture method. African J Microbiol Res 2012; 6(7): 1453-6.
- Ayele WY, Svastova P, Roubal P, Bartos M, Pavlik I. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. Appl Environ Microbiol 2005; 71(3): 1210-4.
- Carvalho IA, Pietralonga PAG, Schwarz DGG, Faria ACS, Moreira MAS. Short communication: recovery of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from retail pasteurized whole milk in Brazil. J Dairy Sci 2012; 95(12): 6946-8.
- Çetinkaya B, Muz A, Ertaş HB, Güngör H, Sezen İY, Gülcü HB. Süt ineklerinde paratüberkülozun prevalansının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması. Tr J Vet Anim Sci 2000; 24(4): 371-9.
- Djonne B, Pavlik I, Svastova P, Bartos M, Holstad G. IS900 restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from goats and cattle in Norway. Acta Vet Scand 2005; 46(1-2): 13-8.
- Drobniewski FA, Uttley AHC. Mycobacterial speciation. Parish T, Stoker NG eds. In: Mycobacteria Protocols. Towata: Humana Press Inc, 1998; pp. 323-47.
- Dundee L, Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. Lett Appl Microbiol 2001; 33(3): 173-7.
- Eda S, Elliott B, Scott MC, Waters WR, Bannantine JP, Whitlock RH, Speer CA. New method of serological testing for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (John's Disease) by flow cytometry. Foodborne Pathog Dis 2005; 2(3): 250-62.
- Florou M, Leontides L, Kostoulas P, Billinis C, Sofia M, Kyriazakis I, Lykotrafitis F. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. Epidemiol Infect 2008; 136(5): 644-52.
- Grant IR, Kirk RB, Hitchings E, Rowe MT. Comparative evaluation of the MGIT™ and BACTEC culture systems for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. J Appl Microbiol 2003; 95(1): 196-201.
- Gümüşsoy KS, İça T, Abay S, Aydın F, Hızlısoy H. Serological and molecular diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. Turkish J Vet Anim Sci 2015; 39(2): 147-53.
- Hendrick SH, Duffield TF, Kelton DF, Leslie KE, Lissemore KD, Archambault M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of paratuberculosis in lactating dairy cows. JAVMA 2005; 226(3): 424-8.
- Hendrick SH, Kelton DF, Leslie KE, Lissemore KD, Archambault M, Duffield TF. Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. JAVMA 2005; 227(8): 1302-8.
- Ikiz S, Bağcıgil AF, Ak S, Özgür NY, İlğaz A. Paratuberculosis in cattle in Turkey detected by PCR. Medycna Wet 2005; 61(8): 881-3.
- Koenig GJ, Hoffsis GF, Shulaw WP, Bech-Nielsen S, Rings DM, St-Jean G. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from mononuclear cells in tissues, blood, and mammary glands of cows with advanced paratuberculosis. Am J Vet Res 1993; 54(9): 1441-5.
- Makav V, Gökçe E. Kars yöresi sığırlarında subklinik paratüberkülozun seroprevalansı. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2013; 19(5): 913-6.
- Merkal RS, Curran BJ. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. Appl Microbiol 1974; 28(2): 276-9.
- Oken HA, Saleeb PG, Redfield RR, Schimpff SC. Is *Mycobacterium avium paratuberculosis* the trigger in the Crohn's Disease spectrum. Open Forum Infect Dis 2017; 4(3): 1-3.
- Ozturk D, Pehlivanoglu F, Tok AA, Gunlu S, Guldali Y, Turutoglu H. Seroprevalence of paratuberculosis in the Burdur province (Turkey), in dairy cattle using the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Israel J Vet Med 2010; 65(2): 53-

- 7.
20. Özpinar H, Tekiner İH, Karaman O, Kurt Y. Türkiye Trakya bölgesindeki süt işletmelerinden toplanan fekal ve çiğ süt örneklerinde *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) incelemesi. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2015; 21(2): 247-52.
21. Patel A, Shah N. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-incidences in milk and milk products, their isolation, enumeration, characterization, and role in human health. J Microbiol Immun Infect 2011; 44(6): 473-9.
22. Pierce ES. Could *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cause Crohn's disease, ulcerative colitis and colorectal cancer? Infect Agent Cancer 2018; 13(1): 1.
23. Robertson RE, Cerf O, Condron RJ, Donaghy JA, Heggume C, Jordan K. Review of the controversy over whether or not *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* poses a food safety risk with pasteurised dairy products. Int Dairy J 2017; 73: 10-8.
24. Rossi G, Grohn YT, Schukken YH, Smith RL. The effect of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection on clinical mastitis occurrence in dairy cows. J Dairy Sci 2017; 100(9): 1-9.
25. Stabel JR, Steadham EM, Bolin CA. Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective? Appl Environ Microbiol 1997; 63(12): 4975-7.
26. Stratmann J, Strommenger B, Stevenson K, Gerlach GF. Development of a peptide-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. J Clin Microbiol 2002; 40(11): 4244-50.
27. Sweeney RW, Whitlock RH, Hamir AN, Rosenberger AE, Herr SA. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation of uninfected cattle. Am J Vet Res 1992; 53(8): 1312-4.
28. Uzun M. Tüberküloz tanı yöntemleri LJ besiyeri ile antitüberküloz duyarlılık testi. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. 11-12 Haziran, 286-289 2003; Samsun-Türkiye.
29. Whitlock RH, Wellsb SJ, Sweeney RW, Van Tiem J. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (John's disease): sensitivity and specificity of each method. Vet Microbiol 2000; 77(3-4): 387-98.
30. Yıldırım D, Civelek T. Prevalence of subclinical paratuberculosis in dairy cattle in Uşak region. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2013; 19(1): 121-6.



Taze ve Alkid Resinle Hazırlanan Rat Sindirim Sistemi Organlarının Tekstür ve Renk Değerlerinin Karşılaştırılması

Hacı KELEŞ¹, Selim ÇINAROĞLU²

¹Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

²Ömer Halisdemir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Niğde-TÜRKİYE

*Sorumlu yazar: Hacı KELEŞ ; E-posta: hacikeles@ohu.edu.tr; ORCID: 0000-0002-0770-8269

Atıf yapmak için: Keleş H, Çınaroğlu S. Taze ve alkid resinle hazırlanan rat sindirim sistemi organlarının tekstür ve renk değerlerinin karşılaştırılması. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(3): 198-203.

Özet: Mide-barsak, tükrük bezleri, karaciğer ve pankreas araştırmalarında deney hayvanı olarak çoğunlukla ratlar kullanılmaktadır. Bu hayvanların sindirim sistemi anatomilerinin araştırma ve uygulama yapacaklar tarafından iyi bilinmesi gerekmektedir. Bu çalışmada; sindirim sistemi üzerinde çeşitli araştırmalar planlayanlar için Alkid resin metoduyla anatomik öğrenme materyali hazırlayarak, bu materyallerin taze sindirim sistemi organlarıyla tekstür ve renk açısından farklılıklarını ortaya koymak amaçlandı. Bu amaçla, kadvraların dil, karaciğer ve midelerinden faydalanıldı. Kadvralara tespit, dehidrasyon, gömme, emdirmeye ve sertleştirme işlemleri uygulandı. Formolle tespit edilen materyaller, 24 saat akarsuda yıkandıktan sonra dehidrasyon için alkol (%50-60-70-80-90-96 ve 100) ve aseton (%50 alkol-%50 aseton ve %100 aseton) serisinden geçirildi. Böylece materyallerin içerisindeki yağ ve su en az düzeye indirildi. Daha sonra dokudaki çökmeleri önlemek için materyaller vakum altında gliserol'e gömüldü. Buradan alınan materyaller kurutma kağıdının üzerine alınarak fazla gliserolden arındırıldı. En son olarak emdirmeye işlemi için Alkid resin içeren solüsyonun içine konuldu. Bu işlemden sonra, materyaller sertleştirme işlemi için normal oda şartlarında dinlendirilip işlem sonuçlandırıldı. Materyallerin renk değerleri (L, a, b) Lovibond RT (Lovibond RT series tintometer device. The Tintometer LTD, UK) marka renk analiz cihazı ile tekstür özellikleri ise (sertlik, elastikiyet, yapışkanlık) TA.TXP Plus Texture Analyzer (TA XT-Plus Texture Analyser Device. Stable Microsystems LTD, UK) ile belirlendi. Organların büyüklükleri bakımından barsak ve pankreasta tekstür ve renk analizleri gerçekleştirilemedi. Alkid resinle işlenmiş dil, karaciğer ve mide taze doku ile karşılaştırıldığında tekstür ve renk parametreleri bakımından çeşitli istatistiksel farklılıklar bulundursa da; bu metotla hazırlanan materyallerin hem araştırma hem de anatomi uygulamalarında kullanılabileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Alkid resin, kadavra, rat, sindirim sistemi

Comparison of Texture and Color Values of Rat Digestive System Organs Prepared with Fresh and Alkid Resin

Summary: Rats are mostly used as experimental animals in gastrointestinal system, liver and pancreas studies. Anatomy of digestive system of these animals must be well known by the researchers and applicator. The aim of the study is to prepare the anatomical learning material by using alkyd resin method for those who plan various researches on the digestive system and to reveal the differences of these materials with the fresh digestive system organs in terms of texture and color. For this aim, the tongue, liver and stomachs of the cadavers were used. Fixed, dehydration, embedding, impregnation and hardening were applied to the cadavers. Formol fixated materials were washed for 24 hours in tap water, followed by alcohol (50-60-70-80-90-96 and 100%) and acetone (50% alcohol-50% acetone and 100% acetone) for dehydration. Subsequently, the materials were immersed in glycerol under vacuum to prevent tissue collapses. The materials obtained from this were removed from the glycerol by taking on the drying paper. Finally, it was put into the solution containing alkyd resin for the impregnation process. After this process, the materials were held under room conditions for the hardening process and the technique was finalized. The color values of the materials were determined by the Lovibond-RT analyzer and the texture properties were determined by TA.TXP Plus Texture Analyzer. This study, both informative and long-term anatomical learning materials have been produced for those who want to do research on the organs of the digestive system.

Key words: Alkyd resin, cadaver, digestive system, rat

Giriş

Günümüzde başta tıp araştırmaları olmak üzere birçok farklı araştırmada hayvanlar tercih edilmektedir. Silah araştırmalarında, tütün deneylerinde, gıda maddelerinin etkilerinin belirlenmesinde, psikoloji testle-

rinde, kozmetik sanayinde (hem temel maddeleri ve kokuları analiz etmede hem de kozmetik maddesinin vücutta oluşturabileceği duyarlılıkları ve alerjileri araştırmada deney hayvanı olarak), ilaç araştırmalarında ve toksik madde testlerinde (Letal Doz 50) deney hayvanları yoğun olarak kullanılmaktadır (6). İnsanlığı tehdit eden birtakım hastalıkların ortadan kaldırılması, su ve havanın zarar verici sınırlarının belirlenmesi,

gıda maddelerinin çeşitli zararlı kimyasallarla ne kadar kirlendiğinin belirlenmesi, yeni cerrahi müdahale yöntemlerinin geliştirilmesi, organ nakillerinin nasıl yapılacağı veya organların fonksiyonlarının karşılaştırılması-karşılanması ve ilaçların geliştirilmesi, denemesi ve uygulaması gibi birçok veri deneylerde hayvanları kullanmak suretiyle elde edilmiştir (9). Sindirim sistemi fiziolojisinin araştırılmasında en popüler hayvanlardan biri ratlardır. Özellikle; mide-barsak, tükrük bezleri, karaciğer ve pankreas araştırmalarında çoğunlukla tercih edilirler. Dolayısı ile bu hayvanların sindirim sistemi anatomilerinin araştırma ve uygulama yapacaklar tarafından iyi bilinmesi gerekmektedir (8).

Bu çalışmada Wistar albino ratların sindirim sistemi organları (mide, dil, karaciğer, barsaklar, yemek borusu, pankreas, yutak v.d.) Alkid resin metodu ile hazırlanarak taze olarak elde edilen sindirim sistemi organlarıyla tekstür ve renk değerleri açısından farklılıklarının araştırılması ve rat sindirim sistemi organları üzerinde araştırma yapacaklar için Alkid resin metodu ile maket haline dönüştürülmüş örnekler hazırlanması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulundan alınan 11.05.2015 tarih ve 27552122-238 sayılı izin ile kullanımdan çıkmış 3 adet erkek Wistar Albino rat ile aynı üniversitede yürütülen bilimsel çalışmaların kontrol grubu ratlardan elde edilen 14 adet mide, dil ve karaciğer (Wistar Albino rat) kullanıldı. Bu örneklerden 7'şer adeti taze olarak tekstür ve renk analizi için kullanılırken geriye kalan 7 adeti ve 3 tüm kadavra Alkid resin metodu ile hazırlanmak üzere aşağıda yer alan prosedürlerden geçirildi. Temin edilen hayvanlardan elde edilen sindirim sistemi organları taze ve Alkid resin metodu ile işlenerek tekstür ve renk analizlerine tabi tutuldu. Tükrük bezi, pankreas, barsak ve yemek borusu gibi organların doku kalınlığının renk ve tekstür analizi yapmak için yetersiz olması sebebiyle çalışmaya dâhil edilemedi. Kullanılan 3 tüm kadavra eğitim ve sergi amacıyla Alkid resin metodu ile işlenerek sehpa üzerine alındı.

Alkid resin yöntemi safhaları:

Fiksasyon-tespit: Tekniğin ilk aşaması fiksasyondur. Demonstrasyon için hazırlanacak kadvralara, *aorta abdominalis*'lerinden gerçekleştirilen yıkama işleminin ardından uygun pozisyonlar verildi. Pozisyon işlemini takiben aynı damardan Spence'in kadavra sıvısı verilerek hayvanlar tespit edildi. Bu tespit sıvısı, 64 kg vücut ağırlığına sahip bir canlı için 2 lt formaldehit, 4 lt metil alkol, 600 ml gliserin, 800 gr fenol ve 3 lt suyun karıştırılması ile elde edilir (10). Demonstrasyon amaçlı kullanılacak kadvralara pozisyon verildikten sonra aorta abdominalis yoluyla tespit sıvısı verilerek

istenilen pozisyonlarda kalmaları sağlandı. Kadvralardan alınan organların normal yerleşimleri ve görünüşleri mümkün olduğunca korunmaya çalışıldı. Bu şekilde alınan 7'şer adet mide ve karaciğer %10'luk formalin içerisine yatırıldı ve 1 ay tespit işlemine devam edildi.

Usulüne uygun olarak diseksiyon işlemi gerçekleştirilen organlar tespit işleminin ardından yıkama işlemine alındı.

Formaldehit ile demonstrasyon amaçlı tespit edilen kadvralar sindirim sistemi ve organları açığa çıkarılacak şekilde diseke edildi.

Yıkama: Fiksasyondan alınan örnekler 24 saat akar çeşme suyu altında yıkandı ve fazla formaldehitten arındırıldı.

Dehidrasyon-Arındırma aşaması: Yıkamadan çıkan örnekler %50-60-70-80-90 ve 96'lık alkol serisinden geçirildi. Örnekler alkol serisinin her aşamasında yaklaşık 8 saat bekletildi. Alkol içerisinden çıkarılan örnekler alkol-aseton (%50 alkol ve %50 aseton) solüsyonunda 24 saat bekletildi. Dehidrasyon aşamasının son kısmını ise aseton uygulaması oluşturdu. Oda şartlarında bulunan asetonun içerisine yatırılan materyaller 48 saat burada bekletilerek doku içerisindeki yağ ve su en az düzeye indirildi.

Gömme: Dehidrasyon işleminden alınan numuneler vakumlu desikatörlerde gliserol içerisine daldırılarak 3 gün süreyle vakum altında (220-380 mm Hg) bırakıldı. Böylece asetonun sertleştirdiği dokular yumuşayarak normal doku kıvamına getirildi. Ayrıca; örneklerde oluşabilecek birtakım çökmelerinde önüne geçilmeye çalışıldı.

Ön kurutma: Gliserol içerisinden alınan örnekler kurutma kâğıdının üzerine alınarak 3 gün süre ile fazla gliserolden arınması sağlandı.

Emdirme: Ön kurutmadan alınan materyaller, Alkid resin içeren solüsyonun içerisine bırakılarak vakum altında (120-380 mm Hg) 48 saat süre ile resinin materyallere nüfuz etmesi sağlandı ve böylelikle emdirme safhası sonuçlandırıldı.

Son kurutma: Alkid resin solüsyonunu iyice absorbe eden materyaller 15 gün süre ile normal oda şartlarında kurumaya bırakıldı ve Alkid resin tekniği sonlandırıldı (1,4,5).

Elde edilen tüm ürünler kadavra muhafaza ve sergi sehpa üzerine alındı. Bu sayede kullanım esnasında ve sonrası oluşabilecek zararlardan korunmaları amaçlandı.

Tekstür ve renk analizleri için seçilen doku-organlar ve ölçüm yerleri: Fresh (taze) grubu 1 adet karaciğer ve 1 dil 2 saat kadar 0°C'de bırakıldı

soğuk hava deposundan alınarak geriye kalanları da ratların ölümünü takiben alınan doku-organlardan oluşturularak tekstür ve renk analizleri gerçekleştirildi. Alkid resin metodu uygulanan grup ise teknik sonlandırıldıktan sonra tekstür ve renk analizlerine tabii tutuldu. Doku veya organların tekstür özelliklerini değiştirebileceği için renk analizleri (dokunun üzerine renk ölçüm cihazının optik gözü yerleştirilip basınç uygulanması sebebiyle) tekstür analizlerinden hemen sonra yapıldı. Materyallerin renk analizi için Lovibond RT marka renk analiz cihazı kullanıldı. Renk analizlerinde L (+L: beyaz, -L: siyah), a (+a: kırmızı, -a: yeşil), b (+b: sarı, -b: mavi değerlerini ifade eder) parametreleri kullanıldı.

Tekstür değerleri için ise (sertlik, elastikiyet, yapışkanlık) TA.TXP Plus Texture Analyzer cihazı kullanıldı. Bu parametrelerden sertlik dokunun diseke edilebilirliği ve dikiş atılabilirliği açısından önemlidir. Bu değer ile ilgili doku lehine bir aralık bulunmayıp aşırı yumuşak veya taze dokuya göre bin kat daha sert dokularda diseksiyon işlemi yapılamaz.

Elastikiyet değeri ile ilgili anatomide veya kadavrada belirlenmiş bir değer bulunmamakla birlikte çalışma esnasında veya sonrasında dokunun tekrar eski haline dönmelerini ifade eder. Çalışmada bu değer taze dokudaki aralığı belirlenmeye çalışılmış, Alkid resin metodu ile işlenen dokuların elastikiyet gösterip göstermedikleri tespit edilmiştir.

Yapışkanlık değerine diseksiyon esnasında Alkid resinli dokunun bistöri, pens ve diseksiyon sahasına yapışmadığının görülmesi üzerine araştırmada kullanılmasına karar verilmiştir. Bu parametrenin ameliyat sonrasında yara iyileşmesinde etkili olabileceği tahmin edilmektedir.

Araştırmada kullanılan doku ve organlar ile bu dokulara ait ölçüm yerleri aşağıda belirtilmiştir.

Mide: Organ *pylorus* ve *cardia* üzerinde kalacak şekilde çıkarıldı. *Facies parietalis* veya *visceralis*'i üzerine bırakılan organdan tekstür ve renk verileri alındı.

Karaciğer: Organ bir bütün olarak çıkartıldıktan sonra tekstür ve renk analizleri için *lobus hepatis sinister* ayrılarak kullanıldı.

Dil: Organın apeksinden başlayıp *radix linguae*'ya kadar diseke edildi. Dil *margo linguae*'sı üzerine yatırılarak (*laterolateral*) tekstür değerleri alındı. Organın renk değerleri ise *corpus linguae* üzerinden değerlendirildi.

Tükrük bezi, pankreas, barsak ve yemek borusu gibi organların doku kalınlığının renk ve tekstür analizi yapmak için yetersiz olması sebebiyle çalışmaya dâhil edilememiştir. Anatomik adlandırmalar ICVGAN 2012'ye göre yapıldı (7). Çalışmanın fotoğrafları Canon 350D fotoğraf makinesi ile çekilmiştir.

İstatistik analizler

Alkid resinle ve taze olarak hazırlanan materyallerin sertlik, elastikiyet ve yapışkanlık değerleri ile L, a, b değerleri normal dağılıma sahip olmadığı için ve gruplarda N sayısı 30'dan küçük olduğu için parametrik olmayan Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. Sertlik, elastikiyet ve yapışkanlık değerleri ile L, a, b değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri medyan ile gösterilmiştir. Değerlerin analizinde SPSS (Spss 22.0 evaluation version for Windows, Trial Version) paket programında yer alan Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Bulgular

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi'nde yürütülen araştırmaların kontrol gruplarından elde edilen kadavralarda tespit işlemi için damarların yıkanması esnasında *aorta abdominalis* ve *v. cava caudalis*'lere girmek,

Tablo 1. Tekstür analiz sonuçları

| | | Mide | | Karaciğer | | Dil | |
|---------------------|----------|------|----------------------|-----------|----------------------------|-----|-------------------------|
| | | N | Medyan değer | N | Medyan değer | N | Medyan değer |
| Sertlik (g) | Taze | 7 | 35.16 (0.95; 51.46) | 6 | 428.96 (27.93; 1552.06) | 6 | 111.20 (40.85; 245.58) |
| | A.Resin | 7 | 44.80 (34.73; 91.67) | 6 | 1426.78 (1065.45; 1717.87) | 6 | 233.36 (188.65; 287.74) |
| | P değeri | | P= 0.01 | | P= 0.01 | | P= 0.01 |
| Elastikiyet (%) | Taze | 7 | 0.98 (0.97; 0.99) | 6 | 0.95 (0.93; 0.97) | 6 | 0.96 (0.89; 0.98) |
| | A.Resin | 7 | 0.79 (0.60; 0.94) | 6 | 0.76 (0.58; 0.91) | 6 | 0.93 (0.92; 0.95) |
| | P değeri | | P= 0.003 | | P= 0.01 | | P= 0.08 |
| Yapışkanlık (g.sec) | Taze | 7 | -4.2 (-5.97; -0.63) | 6 | -10.58 (-25.46; 0.00) | 6 | -0.93 (-2.32; 0.00) |
| | A.Resin | 7 | 0.00 (0.00; 0.00) | 6 | 0.00 (0.00; 0.00) | 6 | 0.00 (0.00; 0.00) |
| | P değeri | | P= 0.01 | | P= 0.01 | | P= 0.01 |

yıkama sıvısı vermek gibi birtakım zorlukların olduğu, hayvanlara pozisyon vermenin oldukça güç olduğu, iç organlardan karaciğer, barsaklar gibi birtakım organların anatomik pozisyonlarından ayrıldıkları tespit edilmiştir. Bu çalışma için sadece kan parametrelerinin değerlendirildiği araştırmalarda kullanılan kontrol grubu hayvanların iç organlarının anatomik pozisyonlarını korudukları ve kadavra tespit işlemi esnasındaki zorlukların asgari düzeyde olduğu belirlenmiştir. Bu gözlem çalışmanın subjektif bulgularından olup, kadavra tespit işlemi için harcanan süre göz önüne alınmıştır.

Tablo 2. Renk analiz sonuçları

| | | Mide | | Karaciğer | | Dil | |
|----------|---------|----------|----------------------|-----------|---------------------|---------|----------------------|
| | | N | Medyan değer | N | Medyan değer | N | Medyan değer |
| L | Taze | 7 | 46.47 (45.77; 48.35) | 21696 | (21.25; 22.49) | 48 | 41 (40.75; 43.24) |
| | A.Resin | 7 | 43.70 (41.50; 48.35) | 25659 | (23.57; 30.22) | 46 | 25 (42.79; 46.57) |
| P değeri | | P= 0.025 | | P= 0.018 | | P= 0.01 | |
| a | Taze | 7 | 3.75 (3.07; 4.91) | 6 | 10.12 (8.45; 10.42) | 6 | 5.98 (5.51; 6.64) |
| | A.Resin | 7 | 2.78 (2.47; 4.98) | 6 | 1.68 (1.51; 4.24) | 6 | 8.55 (6.56; 9.07) |
| P değeri | | P= 0.200 | | P= 0.003 | | P= 0.08 | |
| b | Taze | 7 | 7.78 (6.83; 8.60) | 6 | 5.61 (4.06; 6.10) | 6 | 6.49 (5.77; 7.33) |
| | A.Resin | 7 | 13.68 (12.11; 15.64) | 6 | 3.12 (1.55; 5.87) | 6 | 14.51 (13.96; 15.61) |
| P değeri | | P= 0.006 | | P= 0.142 | | P= 0.01 | |

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi'nde yürütülen deneysel araştırmaların kontrol gruplarından elde edilen kadvralar sindirim sistemlerinin gıda maddeleriyle dolu olması neticesinde Alkid resin metodu ile işlendikten sonra karın içi organların koyu bir görüntüye sahip oldukları (Şekil 1 ve Şekil 2), sindirim kanallarında gıda maddesi bulunmayan kadvralarda ise karın boşluğu organlarının renklerinin oldukça açık görüldüğü tespit edilmiştir.

Tablo 1'e göre resinlenmiş mideler daha sert bir yapıya sahip iken (P= 0.01), taze mideler ile elastikiyet değerleri bakımından karşılaştırıldığında aralarında fark bulunmaktadır (P= 0.03). Taze mide dokusu yapışkan özelliktedir (P= 0.01). Midenin sertlik, elastikiyet ve yapışkanlık özellikleri bakımından taze ve Alkid resinli gruplar arasında istatistiksel olarak fark anlamlıdır.

Tablo 1 incelendiğinde resinli karaciğerlerden hiç yapışkanlık verisi elde edilemezken (P= 0.01), taze karaciğerlere göre daha elastikiyeti düşük (P= 0.01) ve sertlik değeri yüksek veriler elde edilmiştir (P= 0.01). Tekstür değerlerine göre gruplar birbirlerinden farklı ve gruplar arasındaki istatistik fark önemli bulunmaktadır.

Tablo 1'de Alkid resin tekniği ile hazırlanmış dil örnekleri taze dil örneklerine nazaran sert ve yapışkan özellik göstermektedir. Sertlik ve yapışkanlık değerleri bakımından iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (P= 0.01). Alkid resinli dil örneklerinin elastikiyet özelliği yönünden taze dil örnekleri gibi davrandığı, iki grubun elastikiyet düzeyleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (P= 0.08).

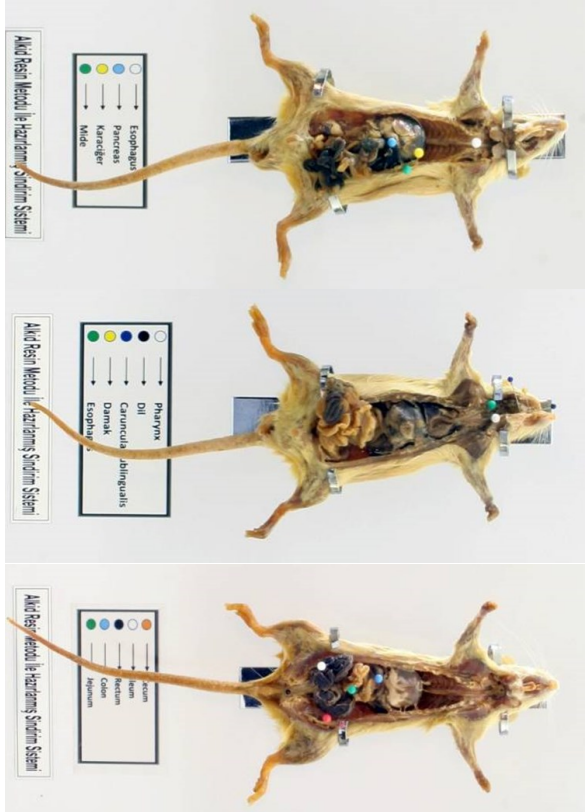
Çalışma oluşturulan iki grup mide arasındaki renk değerleri tablo 2'ye göre incelendiğinde a parametre-

si istatistiksel olarak önemsizdir (P= 0.200). L değeri açısından taze mideler daha beyaz iken (P= 0.025), b değerine göre Alkid resinli mideler daha sarıdır (P= 0.006), bu iki parametrede istatistiksel olarak anlamlıdır. Makroskobik olarak gözlemlendiğinde taze midelerin daha parlak görüldüğü dikkati çekmektedir.

2 nolu tabloya bakıldığında taze ve alkid resinle hazırlanmış karaciğerlerin b değerleri birbirlerine benzer ve istatistiksel olarak farksızdır (P= 0.142). L ve a değerleri karşılaştırıldığında taze karaciğer örnekleri istatistiksel olarak önemli derecede farklı değerler taşımaktadır (P= 0.018; P= 0.003). Karaciğerler L ve a değerleri bakımından incelendiğinde, hem istatistiksel olarak hem de çıplak göz ile yapılan değerlendirmede taze karaciğerlerin kırmızı renk barındırma oranı Alkid resinli gruba göre yüksek, resinli karaciğerlerin beyazlığı veya parlaklığı taze karaciğerlerden fazladır.

Dilde taze örnekler Alkid resinli örneklere göre sarı rengi daha düşük oranda barındırmakla birlikte, istatistiksel olarak farkın önemli olduğu tespit edilmiştir (P= 0.004). Siyahlık- beyazlık ve kırmızılık-yeşillik değerleri göz önüne alındığında gruplar arası istatistiksel fark önemli bulunmamıştır (P= 0.55).

Ayrıca hazırlanan örnekler 29 aydır oda şartlarında muhafaza edilmektedir. Örneklerin dayanma süreleri gözlenmektedir.



Şekil 1. Alkid resin metoduyla hazırlanmış rat sindirim sistemi modelleri



Şekil 2. Alkid resin metoduyla hazırlanmış organ materyalleri

Tartışma ve Sonuç

Alkid resin tekniğinin uygulanmasındaki amaç, dokunun içerisindeki yağın ve suyun alınarak yerine Alkid resin denilen reçinenin nüfuz etmesini sağlamaktır. Ratlardan daha büyük doku, organ veya kadvralarda bu arındırma (dehidrasyon) işleminin doku içeri-

sindeki yağı ve suyu tamamen almadığı, buna bağlı olarak düşük derecede yumuşaklığın ve bir miktar yapışkanlığın bulunduğu tahmin edilmektedir. Gerçekleştirilen çalışmada sertliğin diğer çalışmalara göre yüksek çıkması ve kaybolan elastikiyetin sebebinin çalışılan dokulardaki yağ ve suyun tamamen alınmış olabileceği hususunu akla getirmektedir.

Alkid resinle işlenen dilde elastikiyetin korunduğu, mide ve karaciğerde ise elastikiyetin istatistik açıdan önemli farklılığa sahip olsa da kaybolmadığı tespit edilmiştir. Elastikiyetin eğitim materyali olarak kullanılan kadvralarda bulunması deformasyonu azaltan anatomik yapının orijinal şeklini korumasına yardımcı olan bir özelliktir. Çalışmadaki elastikiyet bulguları Alkid resin metodu üzerine gerçekleştirilen önceki çalışmaların (1,2,3,4) Alkid resinli materyallerin elastik olduğu yönündeki bulgularını desteklemektedir.

Arı ve ark. (2010); Çınaroğlu ve ark. (2010); Arı ve Çınaroğlu (2011); Çınaroğlu ve Arı (2015); Çınaroğlu ve ark. (2015) ile yürütülen çalışma kıyaslandığında doku ve organlar farklı olsa da sarı renk değerleri, kırmızı renk değerleri açısından büyük benzerlik göstermekte, beyazlık parametresinde Alkid resin metodu ile işlenmiş bazı dokularda, yürütülen bu çalışmaya göre daha mat ve koyu renk ön plana çıkmaktadır.

Alkid resin tekniğinin diğer laboratuvar hayvanlarında kullanılabilirliği ve güvenli kullanımı açısından sağlık risklerinin araştırılması ile plastinasyon gibi referans tekniklerle elde edilecek doku ve organların karşılaştırılarak avantaj ve dezavantajlarının belirlenmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bilimsel araştırmalarda kullanılan deney hayvanlarının sayılarını düşürmek için bilim dünyasında uygulanabilir bir farkındalık oluşturmak, en azından eğitim amaçlı deney hayvanı kullanımını azaltmak hem hayvan hakları açısından hem de insani değerler açısından büyük önem arz etmektedir.

Bu çalışma ile sindirim sistemi organları üzerinde araştırma yapmak isteyenler için hem bilgilendirici hem de uzun süre kullanılacak Anatomik öğrenme materyalleri üretilmiş ve bilim dünyasının hizmetine sunulmuştur.

Kaynaklar

1. Arı HH, Çınaroğlu S. A new approach to preservation of some organs using alkyd resin. Res Vet Sci 2011; 90(1): 16-9.
2. Arı HH, Soygüder Z, Çınaroğlu S. Alkid resin kullanılarak keçi ön ve arka bacağının kadvrasının hazırlanması. Altıncı Ulusal Veteriner Anatomisi Kongresi. Eylül, 16-19, 2010; Afyonkarahisar -Türkiye.
3. Çınaroğlu S, Arı HH, Soygüder Z. Alkid resin

kullanılarak kalp kadavranın hazırlanması. Altıncı Ulusal Veteriner Anatomisi Kongresi. Eylül, 16-19, 2010; Afyonkarahisar-Türkiye.

4. Çınaroğlu S, Arı HH. Investigation of macro anatomy of the urogenital system organs of norduz sheep by using the method of alkyd resin and preparation of their cadavers. Van Vet J 2015; 26 (3): 129-39.
5. Çınaroğlu S, Keleş H, Soygüder Z, Arı HH. Alkid resin metodu kullanılarak ruminant karaciğerinin kadavrasının hazırlanması. Dokuzuncu Ulusal Veteriner Anatomi Kongresi. Eylül, 7-10, 2015; Elazığ-Türkiye.
6. Des Jardins JR. Çevre Etiği Çevre Felsefesine Giriş (Çev. Keleş R). Ankara: İmge Kitabevi, 2006; ss. 194-235.
7. International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. Nomina Anatomica Veterinaria (NAV). Sixth Edition. Hannover, Columbia, Gent, Sapporo: World Association of Veterinary Anatomists, 2012.
8. Krinke GJ. The Laboratory Rat. London: Academic Press, 2000; pp. 5-16, 26, 200-8.
9. Sungurbey İ. Hayvan Hakları: Bir İnsanlık Kitabı. İstanbul: İÜ Basımevi, 1993; pp. 84-9.
10. Yıldız B, İkiz İ. Kadavra yapımında ve korunmasında yaygın olarak kullanılan tespit sıvıları. Uludağ Univ Vet Fak Derg 1993; 12(1): 129-35.



Elazığ'da Açıkta Satılan Baharatların Mikrobiyolojik Kalitesi

Pelin DEMİR, Sümeyye ERKAN, Gülsüm ÖKSÜZTEPE, Gökhan Kürşad İNCİLİ

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Elazığ-TÜRKİYE

*Sorumlu yazar: Gülsüm ÖKSÜZTEPE ; E-posta: gulsumoksuztepe@hotmail.com ; ORCID: 0000-0003-3267-6841
Atıf yapmak için: Demir P, Erkan S, Öksüztepe G, İncili GK. Elazığ'da açıkta satılan baharatların mikrobiyolojik kalitesi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(3): 204-212.

Özet: Bu çalışma Elazığ ili kapalı çarşısında açıkta satılan baharatların mikrobiyolojik kalitelerini belirlemek için yapıldı. Bu amaçla 30' ar adet öğütülmüş karabiber (*Piper nigrum* L.), kırmızı toz biber (*Capsicum annuum* L.), kırmızı pul biber (*Capsicum annuum* L.), ve kimyon (*Cuminum cyminum* L.) materyal olarak kullanıldı. Baharat örneklerinde toplam mezofilik aerob bakteri, koliform grubu bakteri, *Staphylococcus-Micrococcus*, maya-küf, aerob sporlu mezofiller, anaerob sporlu mezofiller, laktobasiller, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* sayımları yapıldı. Öğütülmüş karabiberde, kırmızı toz biberde, kırmızı pul biberde ve kimyonda ortalama olarak (\log_{10} kob/g) sırasıyla toplam mezofilik aerob bakteri sayısı 7.50, 5.92, 5.80, 5.45; koliform grubu bakteri sayısı 3.54, 2.03, 2.13, 3.39; *Staphylococcus-Micrococcus* sayısı 5.52, 4.22, 4.01, 4.89; maya-küf sayısı 3.13, 3.40, 2.81, 2.44; laktobasiller 5.79, 4.27, 4.77, 4.21; *Enterobacteriaceae* 4.02, 3.22, 3.02, 2.34 ve aerob sporlu mezofiller 4.28, 4.40, 4.09, 4.89 seviyesinde bulundu. Anaerob sporlu mezofiller karabiber ve kırmızıbiber örneklerinin tamamında, kimyon örneklerinin ise % 50'sinde saptandı. *Escherichia coli* 4 karabiber, 3 kırmızı toz biber, 2 kırmızı pul biber ve 5 kimyon örneğinde tespit edildi. Ancak örneklerin hiç birinde koagülaz pozitif *S. aureus* izole edilmedi. Sonuç olarak incelenen baharat örneklerinin mikrobiyolojik kalitelerinin düşük olduğu ve halk sağlığı açısından risk teşkil edebileceği kanaatine varıldı. Bu nedenle baharatların açıkta satışlarının yapılmaması, uygun ambalaj materyallerinde saklanması ve üretimden tüketime kadar tüm aşamaların endüstriyel ortamlarda HACCP kurallarına uygun olarak yapılması tavsiye edilmektedir.

Anahtar kelimeler: Baharatlar, halk sağlığı, mikrobiyolojik kalite

Microbiological Qualities of Unpacked Spices Sold Out in Elazığ

Summary: This study was carried out to determine the microbiological qualities of spices which are selling in open market in Elazığ province. For this purpose, totally 30 samples were used; ground black pepper (*Piper nigrum* L.), red powdered pepper (*Capsicum annuum* L.), red pepper flakes (*Capsicum annuum* L.) and cumin (*Cuminum cyminum* L.). Total mesophilic aerobic bacteria (TMAB), coliform group bacteria, *Staphylococcus-Micrococcus*, yeast-mold, aerobic spores mesophiles, anaerobic spores mesophiles, Lactobacillus, *Enterobacteriaceae*, *E. coli* and *Staph. aureus* counts were detected in all samples. In the study TMAB counts were detected 7.50, 5.92, 5.80, 5.45 (cfu/g); coliform group bacteria counts 3.54, 2.03, 2.13, 3.39; *Staphylococcus-Micrococcus* counts 5.52, 4.22, 4.01, 4.89; yeast-mold counts 3.13, 3.40, 2.81, 2.44; Lactobacillus counts 5.79, 4.27, 4.77, 4.21; *Enterobacteriaceae* counts 4.02, 3.22, 3.02, 2.34 and aerobic spores mesophiles 4.28, 4.40, 4.09, 4.89 of ground black pepper, red powdered pepper, red pepper flakes and cumin, respectively. In all black pepper and red pepper samples were found anaerobic sporophilic mesophiles, although in cumin samples were detected only in 50% of it. *E.coli* was detected in 4 black pepper, 3 red pepper, 2 red pepper flakes and 5 cumin samples. However, any samples coagulase positive *S. aureus* were not detected. In conclusions, the microbiological qualities of the spices samples are low and which may pose a risk for public health. For this reason, it is recommended to storage spices in appropriate conditions, do not sell outdoors, and correct packaging materials, also HACCP rules should be applied during all processing steps.

Key words: Microbiological quality, public health, spices

Giriş

Gıda katkı maddeleri olarak da sınıflandırılabilen baharatların iştah açıcı, sindirimi kolaylaştırıcı, ürünlere koku ve lezzet verici aynı zamanda gıdaları koruyucu özellikleri de bulunmaktadır. Gıda sanayinde ve evlerde çok yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Baharat-

lar hasat sonu yıkama, kabuk giderme, ağartma, delme, küring, kurutma, temizleme, sınıflandırma, parçalama, öğütme, ambalajlama ve depolama gibi işlemlerden geçtikten sonra sofralarımıza girmektedirler. Bu süreçte baharatlar fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik olarak bir takım değişimlere ve bozulmalara maruz kalabilirler. Baharatların mikrobiyolojik kalitesi üretildiği, işlendiği ve depolandığı yerlerin hijyenik kaliteleri ile doğrudan bağlantılıdır. Toz, kirli sular, kemirgenler, kuşların dışkıları ve böcekler gibi birçok çevresel faktörler baharatların mikrobiyolojik kalitesi

Geliş Tarihi/Submission Date : 13.09.2018

Kabul Tarihi/Accepted Date : 29.04.2019

*7.Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi'nde poster bildiri olarak kabul edilmiş ve yayınlanmıştır.

üzerinde etkili olabilmektedir. Bu nedenle baharatlar üzerindeki mikrobiyal yük insan sağlığı üzerinde önemli etkiler yapabilmektedir (6,31). Kontamine baharatların çoğunlukla ısıtılma işlemi uygulanmayan veya yetersiz ısıtılma işlemi uygulanan gıdalara ilave edilmesi sonucu insanlarda gıda kökenli enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar oluşabilir. Aynı zamanda yüksek oranda kontamine baharatların gıda teknolojilerinde kullanılması ile hatalı ürünler ve gıda bozulmaları meydana gelebilir (18,24). Baharatların mikrobiyolojik kalitelerini belirlemede birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler içerisinde temizlik ve hijyenin önemi de oldukça büyüktür (9,24). Baharat ihtiva eden konserve gibi ürünler çok az risk teşkil etmesine rağmen baharat ilave edilen ve çiğ olarak tüketilen çeşitli ürünler halk sağlığı bakımından risk teşkil edebilmektedir. Kırmızı toz biber, kırmızı pul biber, öğütülmüş karabiber ve kimyon özellikle et endüstrisinde ve birçok gıda maddesinin yapım aşamasında kullanılan baharat çeşitleridir (7,9,18). Baharatların mikrobiyolojik kalitelerini çeşitli fumigasyon yöntemleriyle artırmak mümkündür. Fumigasyon yöntemleri arasında etilen oksit, propilen oksit, mikrodalga, iyonize ışınlar ve alkol buharı gibi uygulamalar etkin olarak kullanılmaktadır. Ancak bu metotların fiyatlarının yüksek olması ve bazı baharat türlerinde renk ve lezzet değişikliğine sebep olmalarından ötürü ülkemizde çok sınırlı olarak kullanılmaktadırlar (22). Ülkemizde açıkta veya kapalı ambalajlarda satılan çeşitli baharatların mikrobiyolojik kaliteleri ile ilgili olarak yapılan çalışmalar (5,6,7,29,30,32) oldukça sınırlı sayıda bulunmaktadır. Tüm çalışma sonuçlarına göre baharatların oldukça yüksek sayılarda mikrobiyal yük taşıdıkları görülmektedir. Bu çalışma Elazığ ili kapalı çarşısında açıkta satılan öğütülmüş karabiber, kırmızı toz biber, kırmızı pul biber ve kimyonun bazı mikrobiyolojik parametrelerini incelenmesi amaçlandı

Gereç ve Yöntem

Gereç

Çalışma kapsamında, Elazığ ilinde Eylül 2016-Şubat 2017 tarihleri arasında açıkta satılan 30'ar adet öğütülmüş karabiber, kırmızı toz biber, kırmızı pul biber ve kimyon örnekleri materyal olarak kullanıldı. Numuneler satıcılar tarafından tüketicilere satılan şekliyle 15 günde bir ve her seferinde farklı üreticilerden olmak üzere ve her bir numuneden 100'er gram olacak şekilde alındı. Laboratuvara getirildi ve analizleri yapılınca kadar buzdolabında saklandı.

Mikrobiyolojik analiz

Mikrobiyolojik analiz için baharat örnekleri bir parçalayıcının (Stomacher 400, United Kingdom) özel torbasında 10 g tartıldı ve üzerine steril %0.1 peptonwater çözeltisinden 90 mL ilave edilerek parçalayıcıda homojen hale getirildi. Böylece örneğin 10^{-1} 'lik (1/10) dilüsyonu hazırlandı. Bu dilüsyondan aynı seyrelticiyi

kullanmak suretiyle örneğin 10^{-9} 'a kadar diğer seyreltileri yapıldı. Örneklerin her seyreltisinden 1'er mL kullanılarak çift seri halinde dökme plak metoduyla ekimleri yapıldı ve inkübasyon süresi sonunda 30-300 koloni içeren plaklar değerlendirildi (2,11).

Numunelerdeki toplam mezofilik aerob mikroorganizmaların sayımı için Plate Count Agar (20), koliform grubu bakterilerin sayımı için ise Violet Red Bile Agar (11), *Staphylococcus-Micrococcus* mikroorganizmaların sayımları için Mannitol Salt Agar (23), maya-küf sayımı için Rose Bengal Chloramphenicol (12), laktobasillerin sayımında de Man Rogosa Sharpe Agar (2), *Enterobacteriaceae* sayımı için Violet Red Bile Glucose Agar (13) besi yeri kullanıldı. Aerob sporlu mezofiller için örneklerin %10'luk dilüsyonu 80°C 'de 10 dakika bekletildikten sonra derhal soğutulularak Plate Count Agar besiyerine ekimleri yapıldı (11). Mezofilik anaerob sporlu bakterilerin sayımı için ise aynı ısıtılma işlemi tabii tutulan örneklerden Tryptose Sulphite Cycloserine Agara ekimler yapılarak petri kutuları anaerobik jar içerisinde 37°C 'de 24-48 saat inkübe edildi (2). *Escherichia coli* sayımı için Tryptone Bile X-Glucuronide medium besi yeri kullanıldı. 30°C 'de 4 saat, daha sonra 44°C 'de 18 saat inkübe edildikten sonra plakların sayımları yapıldı (14). Koagülaz pozitif *S. aureus* sayımı için Baird Parker Agar besi yeri kullanıldı. Koagülaz test sonucu pozitif olan kolonilerin sayısı şüpheli kolonilerin sayısıyla çarpılıp, 5'e bölünerek koagülaz pozitif *S. aureus*'un sayısı belirlendi (15,19).

İstatistiksel analiz

Mikrobiyolojik analizler sonucu elde edilen veriler logaritmaya çevrildi ve ortalama değerler ile standart sapma değerleri tespit edildi. Ayrıca örneklerde tespit edilen mikroorganizma ve mikroorganizma gruplarının birbirleri ile olan ilişkilerini ortaya koymak amacıyla Pearson korelasyon analizi yapıldı. Korelasyon analizleri için SPSS paket programı (Versiyonu 21) kullanıldı (8).

Bulgular

Baharat örneklerine ait mikrobiyolojik analiz bulguları Tablo 1'de özel ve genel mikroorganizmaların dağılımına ait analiz sonuçları Tablo 2-5'de ve korelasyon katsayıları ise Tablo 6'da gösterilmektedir. Buna göre; istatistiksel olarak karabiber örneklerinde TMAB ile *Staphylococcus-Micrococcus*, maya-küf ve A. Sporlu mikroorganizmalar arasında ($P<0.001$), kimyon örneklerinde TMAB ile koliform ve LLP arasında ($P<0.001$), kırmızı toz biber örneklerinde TMAB ile A. sporlu mikroorganizmalar arasında ($P<0.001$) ve kırmızı pul biber örneklerinde *Staphylococcus-Micrococcus* ile *Enterobacteriaceae* arasında güçlü bir korelasyon olduğu tespit edildi ($P<0.001$) (Tablo 6).

Tablo 1. Baharat örneklerinin mikrobiyolojik analiz bulguları (ortalama \pm standart sapma)

| Mikroorganizma | | Örnek | | | | |
|--|-------------------------|---------------------|-----------------|-----|-----------------|-----------------|
| | | Öğütülmüş Karabiber | Kırmızı Biber | Toz | Kırmızı Biber | Pul Kimyon |
| TMAB | Minimum | 5.10 | 3.00 | | 4.00 | 3.00 |
| | Maksimum | 9.00 | 7.60 | | 7.26 | 7.80 |
| | Ortalama | 7.50 \pm 0.96 | 5.92 \pm 1.25 | | 5.80 \pm 1.12 | 5.45 \pm 1.44 |
| | \pm Standart Sapma | | | | | |
| Koliform | Minimum | 1.00 | 1.00 | | 1.00 | 1.00 |
| | Maksimum | 5.46 | 3.10 | | 3.46 | 5.00 |
| | Ortalama | 3.54 \pm 1.36 | 2.03 \pm 0.73 | | 2.13 \pm 0.78 | 3.39 \pm 1.15 |
| | \pm Standart Sapma | | | | | |
| <i>Staphylococcus-Micrococcus</i> | Minimum | 3.50 | 2.00 | | 2.00 | 2.36 |
| | Maksimum | 7.82 | 5.90 | | 5.32 | 7.26 |
| | Ortalama | 5.52 \pm 1.23 | 4.22 \pm 0.97 | | 4.01 \pm 0.97 | 4.89 \pm 1.49 |
| | \pm Standart Sapma | | | | | |
| Maya-Küf | Minimum | 2.00 | 1.00 | | 1.00 | 1.00 |
| | Maksimum | 4.90 | 5.20 | | 4.00 | 3.92 |
| | Ortalama | 3.13 \pm 0.80 | 3.40 \pm 1.25 | | 2.81 \pm 0.90 | 2.44 \pm 0.82 |
| | \pm Standart Sapma | | | | | |
| <i>Lactobacillus-Leuconostoc-Pediococcus</i> | Minimum | 3.52 | 2.35 | | 2.16 | 1.16 |
| | Maksimum | 7.70 | 6.12 | | 6.75 | 6.49 |
| | Ortalama | 5.79 \pm 1.26 | 4.27 \pm 1.15 | | 4.77 \pm 1.24 | 4.21 \pm 1.58 |
| | \pm Standart Sapma | | | | | |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | Minimum | 1.00 | 1.00 | | 1.00 | 1.00 |
| | Maksimum | 6.40 | 4.80 | | 4.70 | 3.40 |
| | Ortalama | 4.02 \pm 1.26 | 3.22 \pm 0.98 | | 3.02 \pm 1.19 | 2.34 \pm 0.73 |
| | \pm Standart Sapma | | | | | |
| Aerob Sporlu Mezo-filler | Minimum | 2.00 | 2.20 | | 2.00 | 2.66 |
| | Maksimum | 6.00 | 6.00 | | 5.60 | 6.30 |
| | Ortalama | 4.28 \pm 1.23 | 4.40 \pm 1.03 | | 4.09 \pm 1.00 | 4.89 \pm 1.06 |
| | \pm Standart Sapma | | | | | |
| Anaerob Sporlu Mezo-filler | Minimum | 1.10 | 1.00 | | 1.00 | 1.00 |
| | Maksimum | 5.70 | 5.75 | | 5.12 | 4.72 |
| | Ortalama | 3.05 \pm 1.22 | 3.12 \pm 1.43 | | 3.37 \pm 1.45 | 2.70 \pm 1.27 |
| | \pm Standart Sapma | | | | | |
| <i>E. coli</i> | Minimum | 1.00 | 1.00 | | 1.00 | 1.00 |
| | Maksimum | 1.68 | 1.10 | | 1.00 | 1.52 |
| | Ortalama | 1.17 \pm 0.34 | 1.06 \pm 0.05 | | 1.00 \pm 0.00 | 1.17 \pm 0.24 |
| | \pm Standart Sapma | | | | | |
| <i>S. aureus</i> | Minimum | <1.00 | <1.00 | | <1.00 | <1.00 |
| | Maksimum | <1.00 | <1.00 | | <1.00 | <1.00 |
| | Ortalama | <1.00 | <1.00 | | <1.00 | <1.00 |
| | \pm Standart Sapma | | | | | |

Tablo 2. Öğütülmüş karabiberde genel ve özel mikroorganizmaların dağılımı (log₁₀ kob/g)

| Mikroorganizma | < 1.0 | | 1.0-1.99 | | 2.0-2.99 | | 3.0-3.99 | | 4.0-4.99 | | 5.0-5.99 | | >6.00* | |
|---------------------------|-------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|--------|------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| TMAB* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 3 | 10 | 2 | 90 |
| Koliform | - | - | 3 | 10 | 5 | 16.6 | 1 | 33.3 | 5 | 16.6 | 7 | 23.3 | - | - |
| <i>Staph.-Micrococ</i> | - | - | - | - | - | - | 3 | 10 | 8 | 26.6 | 5 | 16.6 | 1 | 46.6 |
| Maya-Küf | - | - | - | - | 9 | 30 | 1 | 53.3 | 5 | 16.6 | - | - | - | - |
| <i>Lac.-Leu.-Pedio.</i> | - | - | - | - | - | - | 1 | 3.33 | 7 | 23.3 | 9 | 30 | 1 | 43.3 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | - | - | 2 | 6.67 | 2 | 6.67 | 8 | 26.6 | 1 | 33.3 | 6 | 20 | 2 | 6.67 |
| A. Sporlu Mezofil | - | - | - | - | 4 | 13.3 | 7 | 23.3 | 5 | 16.6 | 1 | 40 | 2 | 6.67 |
| An. Sporlu Mezofil | - | - | 5 | 16.6 | 9 | 30 | 9 | 30 | 4 | 13.3 | 3 | 10 | - | - |
| <i>E.coli</i> | 2 | 86.6 | 4 | 13.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. aureus</i> | 3 | 100 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

*TMAB sayısının Türk Gıda Kodeksi Limitlerinden fazla olan numuneleri ifade etmektedir

Tablo 3. Kırmızı toz biberde genel ve özel mikroorganizmaların dağılımı (log₁₀ kob/g)

| Mikroorganizma | < 1.0 | | 1.0-1.99 | | 2.0-2.99 | | 3.0-3.99 | | 4.0-4.99 | | 5.0-5.99 | | >6.00 | |
|---------------------------|-------|----|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|-------|------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Toplam Mezofilik Aerob | - | - | - | - | - | - | 3 | 10 | 3 | 10 | 8 | 26.6 | 1 | 53.3 |
| Koliform | - | - | 1 | 36.6 | 1 | 46.6 | - | 16.6 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Staph.-Micrococ</i> | - | - | 1 | 7 | 4 | 7 | 5 | 7 | - | - | - | - | - | - |
| Maya-Küf | - | - | - | - | 4 | 13.3 | 7 | 23.3 | 1 | 33.3 | 9 | 30 | - | - |
| <i>Lac.-Leu.-Pedio.</i> | - | - | 5 | 16.6 | 3 | 10 | 9 | 30 | 9 | 30 | 4 | 13.3 | - | - |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | - | - | - | - | 3 | 10 | 7 | 23.3 | 8 | 26.6 | 2 | 40 | - | - |
| A. Sporlu Mezofil | - | - | 3 | 10 | 5 | 7 | 5 | 50 | 7 | 3 | - | - | - | - |
| An. Sporlu Mezofil | - | - | - | - | 3 | 10 | 5 | 7 | 0 | 3 | 0 | 3 | 2 | 6.67 |
| <i>E.coli</i> | 2 | 7 | 7 | 90 | 3 | 10 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. aureus</i> | 3 | 10 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Tablo 4. Kırmızı pul biberde genel ve özel mikroorganizmaların dağılımı (\log_{10} kob/g)

| Mikroorganizma | < 1.0 | | 1.0-1.99 | | 2.0-2.99 | | 3.0-3.99 | | 4.0-4.99 | | 5.0-5.99 | | >6.00 | |
|----------------------------|-------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|-------|------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| TMAB | - | - | - | - | - | - | - | - | 6 | 20 | 7 | 23.3 | 1 | 56.6 |
| Koliform | - | - | 1 | 33.3 | 1 | 43.3 | 3 | 23.3 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Staph.-Micrococ</i> | - | - | 0 | 3 | 3 | 3 | 7 | 3 | - | - | - | - | - | - |
| Maya-Küf | - | - | - | - | 4 | 13.3 | 8 | 26.6 | 1 | 33.3 | 8 | 26.6 | - | - |
| <i>Lac.-Leu.-Pedio.</i> | - | - | 4 | 13.3 | 1 | 36.6 | 1 | 36.6 | 4 | 13.3 | - | - | - | - |
| <i>Enterobacteria-ceae</i> | - | - | - | - | 2 | 6.67 | 6 | 6.67 | 8 | 26.6 | 1 | 46.6 | 4 | 7 |
| A. Sporlu Mezofil | - | - | 6 | 20 | 6 | 20 | 9 | 30 | 9 | 30 | - | - | - | - |
| An. Sporlu Mezofil | - | - | - | - | 3 | 10 | 0 | 3 | 8 | 7 | 9 | 30 | - | - |
| <i>E.coli</i> | 2 | 93.3 | 7 | 23.3 | 3 | 10 | 6 | 20 | 1 | 36.6 | 3 | 10 | - | - |
| <i>S. aureus</i> | 8 | 3 | 2 | 6.67 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 3 | 100 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Tablo 5. Kimyonda genel ve özel mikroorganizmaların dağılımı (\log_{10} kob/g)

| Mikroorga-nizma | < 1.0 | | 1.0-1.99 | | 2.0-2.99 | | 3.0-3.99 | | 4.0-4.99 | | 5.0-5.99 | | >6.00 | |
|----------------------------|-------|-------|----------|------|----------|------|--------------------------|------|----------|------|----------|------|-------|------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| TMAB | - | - | - | - | - | - | 7 | 23.3 | 4 | 13.3 | 6 | 20 | 13 | 43.3 |
| Koliform | - | - | 4 | 13.3 | 6 | 20 | 8 | 26.6 | 1 | 33.3 | 2 | 6.67 | - | - |
| <i>Staph.-Micrococ</i> | - | - | - | - | 3 | 10 | 6 | 20 | 5 | 16.6 | 7 | 23.3 | 9 | 30 |
| Maya-Küf | - | - | 7 | 23.3 | 1 | 43.3 | 10 | 33.3 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Lac.-Leu.-Pedio.</i> | - | - | 3 | 10 | 5 | 16.6 | 4 | 13.3 | 4 | 13.3 | 1 | 33.3 | 4 | 13.3 |
| <i>Enterobacteria-ceae</i> | - | - | 7 | 23.3 | 1 | 50 | 8 | 26.6 | - | - | - | - | - | - |
| A. Sporlu Mezofil | - | - | - | - | 2 | 6.67 | 5 | 16.6 | 7 | 23.3 | 1 | 36.6 | 5 | 16.6 |
| An. Sporlu Mezofil | - | - | 7 | 23.3 | 8 | 26.6 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>E.coli</i> | 25 | 83.33 | 5 | 16.6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. aureus</i> | 30 | 100 | - | - | - | - | Tartışma ve Sonuç | | - | - | - | - | - | - |

Tablo 6. İncelenen numunelerde mikrobiyolojik analiz sonuçları arasındaki pearson korelasyon katsayıları (r)

| Nu- mune | Mikroorga- nizma | Koli- form | Staph- Micro. | Maya-Küf | A. Sporlu | Lac-Leu- Pedio. | Entero- bac. |
|---------------------------|---------------------|---------------|------------------|----------|-----------|--------------------|-----------------|
| Kara- biber | TMAB | 0.443* | 0.660*** | 0.618*** | 0.669*** | 0.285 | 0.419* |
| | Koliform | | 0.435* | 0.418* | 0.636*** | 0.340 | 0.405* |
| | Staph-Micro. | | | 0.545** | 0.738*** | 0.502** | 0.079 |
| | Maya-Kuf | | | | 0.530** | 0.399* | 0.330 |
| | A. Sporlu | | | | | 0.277 | 0.391* |
| | Lac-Leu- Pedio. | | | | | | 0.209 |
| Kim- yon | | 0.686** | | | | | |
| | TMAB | * | 0.418** | 0.159 | 0.216 | 0.555*** | 0.152 |
| | Koliform | | 0.464** | 0.114 | 0.242 | 0.503** | 0.306 |
| | Staph-Micro. | | | 0.356 | 0.551** | 0.331 | 0.172 |
| | Maya-Küf | | | | 0.109 | 0.015 | -0.323 |
| | A. Sporlu | | | | | 0.024 | 0.330 |
| Kırmı- zı Toz Biber | Lac-Leu- Pedio. | | | | | | 0.284 |
| | TMAB | 0.131 | 0.316 | 0.257 | 0.722*** | 0.300 | -0.429* |
| | Koliform | | -0.021 | 0.361* | 0.137 | 0.114 | 0.170 |
| | Staph-Micro. | | | 0.155 | 0.371* | 0.464** | -0.086 |
| | Maya-Küf | | | | 0.240 | 0.163 | 0.339 |
| | A. Sporlu | | | | | 0.509** | -0.234 |
| Kırmı- zı Pul Biber | Lac-Leu- Pedio. | | | | | | 0.218 |
| | TMAB | 0.363* | 0.132 | 0.106 | 0.103 | 0.000 | 0.194 |
| | Koliform | | 0.516** | 0.118 | 0.168 | 0.082 | 0.505** |
| | Staph-Micro. | | | 0.265 | 0.372* | 0.212 | 0.554*** |
| | Maya-Küf | | | | 0.551** | 0.150 | 0.194 |
| | A. Sporlu | | | | | 0.206 | 0.393* |
| Lac-Leu- Pedio. | | | | | | | 0.369* |

* : Önem derecesi (P<0.05) Orta derecede korelasyon (r: 0.40-0.69).

** : Önem derecesi (P<0.01) Güçlü derecede korelasyon (r: 0.70-0.89).

***: Önem derecesi (P<0.001) Çok güçlü korelasyon (r:0.90-1.00).

Gıda sektöründe oldukça geniş bir alanda kullanılma imkanı bulan baharatların mikrobiyal yükleri ilave edildikleri ürünlerin kalitelerini direkt olarak etkilemektedir. Yapılan mikrobiyolojik analiz sonuçlarına göre toplam mezofilik aerob bakteri sayısı ortalama olarak (\log_{10} kob/g) öğütülmüş karabiberde 7.50, kırmızı toz biberde 5.92, kırmızı pul biberde 5.80 ve kimyonda ise 5.45 olarak tespit edildi (Tablo 1). Türk Gıda Kodeksi Baharatlar Tebliği'ne (29) göre baharatlarda bulunmasına izin verilen toplam mezofilik aerob bakteri sayısı maksimum 10^6 kob/g'dır. Buna göre incelenen öğütülmüş karabiberin 27 tanesi (%90), kırmızı toz biberin 16 tanesi (%53.33), kırmızı pul biberin 17 tanesi (%56.67) ve kimyonun ise 13 tanesinin (% 43.33) kodekse uygun olmadığı görüldü (Tablo 2-5). Karabiberde tespit edilen ortalama değer gerek yurt dışı (6.00 - 7.40) (1,25,26) ve gerekse yurt içinde (4.86 - 7.41) (17,27,30) yapılan çalışmalarda elde edilen değerlerden yüksek bulundu. Kırmızı toz biber ve kırmızı pul biberde saptanan ortalama değerlerin

Ulukanlı ve ark.'nın (30) buldukları değerden (4.84) yüksek ancak hem yurt dışında yapılan çalışmalarda (3, 4) (7.31 ve 6.50) ve hem de yurt içinde yapılan çalışmalarda (6,7,17,27,32) tespit edilen değerlerden (6.00-7.41) ise düşük seviyelerde bulundu. Kimyon örneklerinde bulunan ortalama değerlerin bazı araştırmacıların (9,27,32) bulgularıyla hemen hemen uyum içerisinde olduğu (5.59, 5.00, 5.00) ancak diğer araştırmacıların (3,4,7) bulgularından (6.50, 6.45, 6.00) ise kısmen daha düşük seviyelerde olduğu görüldü. Kimyon örneklerinde kontaminasyon düzeyinin düşük seviyelerde olması kimyonun antimikrobiyal etkisinden kaynaklanmış olabilir (3,6).

Koliform grubu bakteriler hijyen indikatörü olarak bilinen bakterilerdir. İncelenen baharat örneklerinin tamamında bu grup bakterilere rastlanılmıştır. Ortalama olarak (\log_{10} kob/g) öğütülmüş karabiberde 3.54, kırmızı toz biberde 2.03, kırmızı pul biberde 2.13 ve kimyonda ise 3.39 olarak belirlendi (Tablo 1). En yük-

sek dağılımlara bakıldığı zaman öğütülmüş karabiber örneklerinin 7 tanesinde (%23.33), kimyon örneklerinin ise 2 tanesinde (%6.67) \log_{10} kob/g olarak 5.0-5.99 aralığında; kırmızı toz biber örneklerinin 5 tanesinde (%16.67) ve kırmızı pul biber örneklerinin ise 7 tanesinde (%23.33) \log_{10} kob/g olarak 3.0-3.99 aralığında koloni tespit edildi (Tablo 2-5). Elde edilen değerlerin Erol ve ark.'nın (6) buldukları değerlerden (%88) daha düşük seviyelerde olduğu görüldü. Kırmızı toz biberin %63.34 ile kırmızı pul biberin %66.66'sında koliform grubu bakterilerin 2.00-6.00 \log_{10} kob/g arasında bulunması Muhammed ve ark tarafından yapılan bir çalışmada (21) tespit edilen bulgularla benzerlik arz etmektedir (kırmızı biber örneklerinin %53'ünde). Karabiberde saptanan ortalama değer Garcia ve ark.'nın (9) buldukları değerden düşük (3.00) ancak diğer bazı araştırmacıların (4,7,10,17,27,30,32) buldukları değerlerden (3.60, 3.69, 3.79, 3.98, 4.00, 4.52, 4.97) ise nispeten daha az seviyelerde olduğu görüldü. Kimyon örneklerindeki koliform bakteri dağılımına bakıldığında örneklerin %60'nın 1.00-4.00 \log_{10} kob/g arasında bakteri ile kontamine olduğu saptandı (Tablo 5). Bu sonucun Iğdır'da yapılan bir çalışmada (30) incelenen kimyon örneklerinin %94.7'sinin aynı seviyede bakteri ile kontamine olmuş olması sonucundan oldukça farklı olduğu görülmektedir. Koliform grubu bakterilerin varlığı ve kontaminasyon düzeyleri diğer çalışma bulgularıyla karşılaştırıldığında farklılıklar muhtemelen alınan örneklerin orijinlerinin farklı olmasından, ürünlerin işleme ve depolama şartlarından ve tüketime sunuş şekillerinden (açıkta veya kapalı ambalajlarda) kaynaklanmış olabilir (6,10).

Staphylococcus-Micrococcus sayıları ortalama olarak sırasıyla \log_{10} kob/g bakımından öğütülmüş karabiberde 5.52, kırmızı toz biberde 4.22, kırmızı pul biberde 4.01 ve kimyonda ise 4.89 olarak saptandı (Tablo 1). Öğütülmüş karabiberde saptanan değerlerin bazı araştırmacıların (7,27) değerleriyle (4-5, 5-6 \log_{10} kob/g) benzerlik gösterdiği belirlendi. Bu grup mikroorganizmaların genel dağılımlarına bakıldığında öğütülmüş karabiber örneklerinin 14 tanesinde (%46.67) ve kimyon örneklerinin ise 9 tanesinde (%30) bakteri sayısının >6.0 \log_{10} kob/g üzerinde olduğu tespit edildi (Tablo 2 ve Tablo 5). Öğütülmüş karabiber örneklerinin %36.67'si, kırmızı toz biber örneklerinin %56.67'si, kırmızı pul biber örneklerinin %23.33'ü ve kimyon örneklerinin ise %36.67'sinin 3-5 \log_{10} kob/g arasında bakteri ile kontamine olduğu belirlendi (Tablo 2-5). Elde edilen bu sonuçların bazı araştırmacıların (6, 30) bulgularıyla benzerlik arz ettiği görüldü. Öğütülmüş karabiber ve kimyon örneklerinde sayının yüksek çıkması muhtemelen numunelerin hazırlanması esnasında yetersiz personel hijyeni olmasından kaynaklanmış olabilir.

Maya ve küfler gıdaların bozulmalarında önemli rol oynayan bakteri grubundan sayılmaktadırlar. Ortalama olarak \log_{10} kob/g bakımından sırasıyla öğütül-

müş karabiberde 3.13, kırmızı toz biberde 3.40, kırmızı pul biberde 2.81 ve kimyonda ise 2.44 olarak belirlendi (Tablo 1). Elde edilen bu sonuçların bazı araştırmacıların (6,7,27,32) bulgularıyla (3, 3-4, 2-4, 3 \log_{10} kob/g) benzerlik gösterdiği ancak diğer araştırmacıların (4,10,30) bulgularından (4-5, 4-5, >4 \log_{10} kob/g) ise daha düşük seviyelerde oldukları görüldü. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Baharatlar Tebliği'ne (29) göre incelenen numunelerin tamamında olması gereken maksimum sayı olan 2 \log_{10} kob/g seviyesine göre incelenen öğütülmüş baharat örneklerinin tamamı (%100), kırmızı toz biber örneklerinin %83.33'ü, kırmızı pul biber örneklerinin %86.67'si ve kimyon örneklerinin ise %76.66'sı tüketime uygun değildir (Tablo 2-5). Maya- küf sayılarının yüksek çıkması muhtemelen baharatların üretildiği, muhafaza edildiği yerlerin hijyenik olmamasından ve ürünlerin açıkta olarak satışa sunulmuş olmasından kaynaklanmış olabilir.

Lactobacillus-Leuconostoc-Pediococcus mikroorganizmaları ürünlerin lezzet ve aromaları üzerine etkili olan bakteri grubundadırlar. Bu grup mikroorganizmaların sayıları ortalama olarak \log_{10} kob/g bakımından öğütülmüş karabiber örneklerinde 5.79, kırmızı toz biber örneklerinde 4.27, kırmızı pul biber örneklerinde 4.77 ve kimyon örneklerinde ise 4.21 olarak bulundu (Tablo 1). Ayrıca incelenen öğütülmüş karabiber örneklerinin 13 tanesinde (%43.33) ve kimyon örneklerinin ise 4 tanesinde (%13.33) sayının >6 \log_{10} kob/g olduğu belirlendi (Tablo 2 ve Tablo 5). Baharatların fermente et ürünlerinde kullanılıyor olmasından dolayı bu grup bakteri sayısının yüksek çıkması bir avantaj olarak görülebilir.

Enterobacteriaceae lar hijyenik kalitenin önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedirler. Ürünlerin mikrobiyal kaliteleri hakkında fikir verirler. Ortalama olarak sırasıyla (\log_{10} kob/g) öğütülmüş karabiberde 4.02, kırmızı toz biberde 3.22, kırmızı pul biberde 3.02 ve kimyonda ise 2.34 olarak bulundu (Tablo 1). Öğütülmüş karabiber örneklerinin %6.67'sinde >6.0 \log_{10} kob/g %60'da ise 3-5 \log_{10} kob/g olarak belirlendi (Tablo 2). Bu sayının Ulukanlı ve ark.'nın (30) belirlediği değerden (%26) yüksek Erol ve ark.'nın (6) belirledikleri değerden (%76) ise düşük olduğu görüldü. İncelenen kırmızı toz biber örneklerinin %73.33'de kırmızı pul biber örneklerinin ise %60'ında bu grup mikroorganizmaların 3-5 \log_{10} kob/g düzeyinde dağılım gösterdiği belirlendi (Tablo 3 ve 4). Bu sonucun Ulukanlı ve ark.'nın (30) buldukları değerden (%16) oldukça yüksek seviyede olduğu belirlendi. Yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar baharatların muhtemelen uygun olmayan şartlarda üretilmiş olduğunu ve uygun olmayan çevre koşullarında muhafaza edildiğine işaret etmektedir.

Aerob sporlu mezofiller sırasıyla ortalama olarak (\log_{10} kob/g) öğütülmüş karabiber örneklerinde 4.28 olarak belirlendi (Tablo 1). Bu değer Erol ve ark.'nın

(6) buldukları 6.34 değerinden düşük seviyelerde olduğu görülmektedir. Kırmızı toz biber örneklerinde 4.40, kırmızı pul biber örneklerinde 4.09 ve kimyon örneklerinde ise 4.89 olarak saptandı (Tablo 2-5). Tespit edilen bu değerlerin Erol ve ark.'nın (6) buldukları değerlerden (5.79, 5.53, 5.76) oldukça düşük seviyelerde olduğu görülmektedir. İncelenen öğütülmüş karabiber ve kırmızı toz biber örneklerinin % 6.67'de kimyon örneklerinin ise %16.67'de $>6 \log_{10}$ kob/g seviyelerinde bulundu. Tespit edilen bu kontaminasyon düzeylerinin bazı çalışmalarla (6,27,28,30) uyum içerisinde olduğu gözlemlendi.

Anaerob sporlu mezofiller ortalama olarak (\log_{10} kob/g) öğütülmüş karabiber örneklerinde 3.05, kırmızı toz biber örneklerinde 3.12, kırmızı pul biber örneklerinde 3.37 ve kimyon örneklerinde ise 2.70 olarak saptandı (Tablo 1). İncelenen baharat örneklerinden kimyon hariç diğerlerinde bu grup mikroorganizmaların 1-6 \log_{10} kob/g arasında seyrettiği görüldü (Tablo 2-5). Bu değerlerin Ulukanlı ve ark.'nın (30) buldukları 2-5 \log_{10} kob/g değerlerinden nispeten yüksek seviyelerde olduğu belirlendi. Kimyon örneklerinin %50'de diğer baharat çeşitlerinin ise tamamında anaerob sporlu mezofiller üreme gösterdi.

E. coli hijyen indikatörü olarak kabul edilen bir bakteridir. dört tane öğütülmüş karabiber, üç tane kırmızı toz biber, iki tane kırmızı pul biber ve beş tane kimyon örneğinde *E. coli* tespit edildi. Ortalama olarak sırasıyla (\log_{10} kob/g) öğütülmüş karabiber örneklerinde 1.17, kırmızı toz biber örneklerinde 1.06, kırmızı pul biber örneklerinde 1.00 ve kimyon örneklerinde ise 1.17 düzeyinde bulundu (Tablo 1). Bu bakteri ile olan kontaminasyon düzeyi bazı araştırmacıların (4,6,30) bulgularından oldukça yüksek olmasına rağmen bazı araştırmacıların (3,9) bulgularından ise daha az seviyelerdeydi. Söz konusu olan bu farklılıklar muhtemelen alınan numunelerin orijinlerinin farklı olmasından, işleme ve muhafaza koşullarından, baharatların bütün, toz ya da öğütülmüş olma durumlarından, tüketime sunuş şekillerinden ve örnekleme yöntemlerinin farklılığından kaynaklanmış olabilir.

İncelenen tüm baharat örneklerinin hiç birinde koagülaz pozitif *S. aureus*'a rastlanılmamıştır. Elde edilen bu sonucun birçok çalışma (4,6,10,17,32) sonuçlarıyla uyum içerisinde olduğu görülmektedir (Tablo 1-6). Ancak bu sonuç Tekirdağ ve Afyonkarahisar'da satışı sunulan baharat örneklerinde *S. aureus*'a rastlandığını bildiren Coşkun (5) ile Kara ve ark.'nın (16) sonuçlarından farklılık arz etmektedir.

Sonuç olarak; incelenen baharat örneklerinin mikrobiyolojik kalitelerinin düşük olduğu ve açıkta satılan baharatların halk sağlığı bakımından risk teşkil edebilecek düzeyde ve türde bakteri ile kontamine olduğu ve bu nedenle söz konusu olan bu durumun tehlike arz edebileceği kanaatine varıldı. Bu sebeplerden dolayı baharatların açıkta satılmasının yasaklanması,

uygun ambalaj materyallerinde saklanması, üretimden tüketime kadar olan tüm aşamaların endüstriyel ortamlar ve HACCP kurallarına uygun olarak yapılması tavsiye edilmektedir.

Kaynaklar

1. Adinarayanaiah CI, Saxena VB, Upadhyay SN, Mathea TV. Microbiological status of black pepper. J Food Sci Technol 1985; 22: 317-20.
2. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. - fifteenth Edition, 1995.
3. Bhat R, Geeta H, Kulkarni PR. Microbial profile of cumin seeds and chili powder sold in retail shops in the city of Bombay. J Food Prot 1987; 50(5): 418-9.
4. Banarjee M, Sarkar PK. Microbiological quality of some retail spices in India. Food Rest Int 2003; 36: 469-74.
5. Coşkun F. Tekirdağ piyasasında satılan bazı baharatların mikrobiyolojik özellikleri. Tekirdağ Zir Fak Derg 2010; 7(1): 85-93.
6. Erol İ, Küplülü Ö, Karagöz S. Ankara'da tüketime sunulan bazı baharatın mikrobiyolojik kalitesi. Ankara Univ Vet Fak Derg 1999; 46: 115-25.
7. Filiz N. Bursa'da tüketime sunulan bazı baharatların mikrobiyal florası. J Fac Vet Med 2001; 20: 103-7.
8. Fowler J, Cohen L. Practical Statistics for Field Biology. John Willey and Sons Ltd, Chichester, 1992, p. 259.
9. Garcia S, Iracheta F, Galvan F, Heredia N. Microbiological quality of retail herbs and spices from Mexican markets. J Food Prot 2001; 64(1): 99-103.
10. Geeta H, Kulkarni PR. Survey of the microbiological quality of whole, black pepper and turmeric powder sold in retail shops in Bombay. J Food Prot 1987; 50(5): 401-3.
11. Harrigan WF. Laboratory Methods in Food Microbiology. Third Edition. London: Academic Pres 1998; p. 532.
12. ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods. 1.Their Significance and Methods of Enumeration, London: Univ to Toronto Press, 1982; p: 321.
13. ISO 21528-2:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal methods for the

- detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*. Part 2: Colony-count method/ Erişim Tarihi: 01.07.2018.
14. ISO 16649-2: Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Part 2, Colony-count technique a 44°C using 5-bromo-4chloro-3-indoly-beta-D-glucuronide, Geneve, Switzerland, 2001.
 15. ISO 6888-1:1999 /AMD 1:2003. Coagulase (+) *S. aureus* Identification. http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/ Erişim Tarihi: 07.08.2018.
 16. Kara R, Gökmen M, Akkaya L, Gök V. Afyonkarahisar'da satışa sunulan bazı baharatların mikrobiyolojik kalitesinin araştırılması. Altıncı Ulusal veteriner Gıda Hijyeni Kongresi. Ekim, 07-11, 2015; Van-Türkiye.
 17. Karapınar M, Tuncel G. Perakende satılan bazı toz baharatların mikrobiyolojik kaliteleri. Ege Üniv Müh Fak Derg 1986; 4(1): 27-36.
 18. Kneifel W, Berger E. Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian Market. J Food Prot 1994; 57(10): 839-901.
 19. Lancette GA, Bennett RW. *S. aureus* and staphylococcal enterotoxins. Downes FP, Ito K (Eds). In: Microbiological Examination of Foods. 4th Edition. American Public Health Association Washington DC: 2001; 387-404.
 20. Maturin LJ, Peeler JT. Aerobic plate count. In, Bacteriological Analytical Manual, Chapter 3, 2001. <http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-3htm/> Erişim Tarihi: 26.09.2018.
 21. Muhamad LJ, Ito H, Watanabe H, Tamura N. Distribution of microorganisms in spices and their decontamination by gamma irradiation. Agr Biol Chem 1986; 50(2): 347-55.
 22. Mutluer B, Öztaşırın İ, Şerer E, Akkuş M, Ersen S, Kaya B. İyonize radyasyonla baharatların sterilizasyonu 1. Gamma ışınlarının karabiber ve kırmızıbiberlerin mikrobiyel flora, uçucu yağ ve duysal niteliklerine etkisi. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1986; 33(3): 464-76.
 23. Oxoid. The Oxoid Manual. Fiftieth Edition, Published by Oxoid Limited, Hampshire, England, 1982.
 24. Özdemir T. Hatay bölgesinde aktarlarda satılan bazı baharatların kalite özelliklerinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Mustafa Kemal Üniv Fen Bil Enst, Hatay 2011.
 25. Pafumi J. Assessment of the microbiological quality of spices and herbs. J Food Prot 1986; 49 (12): 958-63.
 26. Rosenberger A, Weber H. Keimbelastang von Gewürzproben. Fleischwirtsch 1993; 73(8): 830-3.
 27. Tekinşen OC, Sarıgöl C. Elazığ yöresinde tüketime sunulan bazı öğütülmüş baharatın mikrobiyel florası. Fırat Üniv Vet Fak Derg 1982; 7(1-2): 151-62.
 28. Temelli S, Anar S. Bursa'da tüketime sunulan baharat ve çeşni verici otlarda *Bacillus cereus*'un yaygınlığı. İstanbul Üniv Vet Fak Derg 2002; 28 (2): 459-65.
 29. Türk Gıda Kodeksi Baharatlar Tebliği. Tebliğ No: 2013/12, Resmi Gazete: 10.04.2013, Sayı:28614.
 30. Ulukanlı Z, Karadağ E, Elmalı M, Gürbüz A. Iğdır'da açıkta satılan bazı öğütülmüş baharatların mikrobiyolojik kalitesi. Vet Bil Derg 2005; 21(1-2): 31-7.
 31. Ulus S. Piyasada satışa sunulan baharatların ağır metal, aflatoksin, pestisit, mikrobiyolojik ve kimyasal kirlilik yönünden değerlendirilmesi ve kullanıma alışkanlıkları. Tıpta Uzmanlık Tezi. Genel Kurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi, Ankara 2011.
 32. Üner Y, Ergün O. Piyasada satışa sunulan çeşitli baharatın bazı patojenler ve genel mikrobiyolojik kriterler yönünden incelenmesi. İstanbul Üniv Vet Fak Derg 1999; 25(2): 245-51.



Perakende Olarak Satışa Sunulan Kaymak ve Tereyağlarda Aflatoksin M₁ Varlığı*

Nuri Aydın ÖZKAN, Nurhan ERTAŞ ONMAZ

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni, Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE.

Sorumlu yazar: Nurhan ERTAŞ ONMAZ, E-posta: nertas@erciyes.edu.tr. ORCID: 0000-0002-4679-6548

Atıf yapmak için: Özkan NY, Ertaş Onmaz, N. Perakende olarak satışa sunulan kaymak ve tereyağlarda aflatoksin M₁ varlığı. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(3): 213-217.

Özet: Bu çalışmada, tereyağı ve kaymak örneklerinde aflatoksin M₁'in (AFM₁) varlığı ve düzeylerinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada rastgele alınan 100 örnek (50 tereyağı ve 50 kaymak) Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay (ELISA) tekniği ile analiz edildi. İncelenen örneklerin tamamında (%100) AFM₁ bulunmuştur. AFM₁ kontaminasyon seviyeleri, tereyağı ve kaymak örneklerinde sırasıyla 6.58-128.69 ng/kg ve 5.70-26.62 ng/kg arasında tespit edildi. Sadece bir (%2) tereyağı örneğindeki AFM₁ konsantrasyonunun Türk Gıda Kodeksinin belirlediği maksimum yasal sınırların üzerinde olduğu tespit edildi. Sonuç olarak, tereyağı ve kaymaktaki AFM₁ varlığı muhtemel bir halk sağlığı problemi olarak düşünülebilir. Bu nedenle, süt ve süt ürünleri, AFM₁ kontaminasyonu varlığı yönünden sürekli izlenmelidir.

Anahtar kelimeler: AFM₁, ELISA, kaymak, tereyağı

Presence of Aflatoxin M₁ in Sales as Retail Cream and Butter

Summary: The aim of this study was to investigate the presence and level of aflatoxin M₁ (AFM₁) in butter and cream samples. In this study, 100 samples (50 butter and 50 cream) obtained by random sampling method were analyzed by Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay (ELISA) technique. AFM₁ were found in all of the samples examined (100%). The AFM₁ contamination levels in butter and cream samples ranged from 6.58 to 128.69 ng/kg and 5.70 to 26.62 ng/kg, respectively. In only one (2 %) of butter samples, AFM₁ concentration exceeded the maximum legal limits according to Turkish Food Codex. In conclusion, the occurrence of AFM₁ in the butter and cream may be considered as a possible public health problem. Therefore, milk and milk products have to be monitored continuously for the presence of AFM₁ contamination.

Key words: AFM₁, butter, cream, ELISA

Giriş

Küfler, ortam sıcaklığı ve rutubetin uygun olduğu koşullarda besin maddelerinde üreyerek ürünün bozulmasına neden olmalarının yanı sıra, insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen teratojenik, karsinojenik ve mutajenik etkili toksik metabolitler (mikotoksin) oluşturmaktadırlar (10,24). Bilinen başlıca fungal toksinler; aflatoksinler, okratoksinler, zearalenon, sitrinin, patulin, kojik asit, sterigmatosistin, trikotesenler, *Penicillium roqueforti* toksini (PR toksin), penisillik asit, sporidesmin, ergot alkaloidleri, streoviridin, alternariol, tenuazonik asit, rubratoksinler, sikloklorotin, luteosikrin, tremorin A ve okzalik asittir (14,24). Aflatoksinler kimyasal olarak difurokumarosiklopentenon ve difurokumarolakton grubunda bulunan, bifuran halkası ve lakton bağı içeren nispeten düşük molekül ağırlıklarına sahip kumarin derivatlarıdır (9) ve başta *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*, *Rhizopus* ve bazı *Penicillium* türleri tarafından sentezlenen mikotoksinlerdir. Belirlenmiş 13 tür aflatoksinde 5'i

gıda ürünlerinde tespit edilebilmektedir. İnsan ve hayvanlarda akut ve kronik zehirlenmelere neden olan bu metabolitler, aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂, M₁'dir (10). Aflatoksin M₁ (AFM₁), laktasyondaki hayvanların Aflatoksin B₁ içeren yemleri tüketmesinden sonra karaciğerde metabolize olarak dönüşerek süt ile atılmaktadır (2). Aflatoksinler, süt ürünleri yapımı esnasında uygulanan ısıtma işlemi ya da tuz ilave edilmesi gibi prosedürlerden etkilenmemektedir. Dolayısı ile bu toksin süt ve süt ürünlerinde (sıklıkla peynir, yoğurt, süt tozu, düşük oranla tereyağı) bulunabilmektedir. Yapılan literatür taramalarında tereyağında aflatoksinin suda çözünbilme özelliğinden ve kazeine olan affinitesinden dolayı diğer süt ürünlerine göre daha az bulunduğu belirtilmektedir. AFM₁ ile kontamine olmuş kremadan tereyağı üretimi sırasında mikotoksinin büyük bir çoğunluğunun yıkama suyuna geçtiği belirtilmiştir (8,20,29). Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ'de (28) süt ürünlerinde AFM₁ için belirlemiş olduğu maksimum limit 50 ng/kg olarak bildirilmektedir. Süt ve ürünleri, bebekler, emziren anneler, çocuklar, yaşlılar ile süt ve ürünleri ile beslenen yavru hayvanlar için temel besin kaynağı olduğundan, bu ürünlerdeki AFM₁ miktarları önemlidir.

Geliş Tarihi/Submission Date : 29.01.2019

Kabul Tarihi/Accepted Date : 20.05.2019

*Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen TYL-2015-5810 kodlu projeden özetlenmiştir.

(2,24). Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu (IARC) tarafından AFB₁'in 1. derecede, AFM₁'in ise 2. derecede kanserojen madde sınıfına alınması süt ve ürünlerinin aflatoksinlerle kontamine olmasının halk sağlığı açısından risk oluşturduğunu göstermektedir (13). Yüksek miktarda aflatoksin alımına bağlı olarak oluşan akut formda, şiddetli karaciğer hasarını takiben şiddetli intoksikasyona bağlı solunum güçlüğü, kanlı ishal, doku ve organlarda kanamalar ve ölüm; subakut formda sarılık, bağırsaklarda kanama, trombosit sayısında azalma ve karaciğer hasarı görülmektedir (2,10,24). Bu çalışmada, Kayseri ili ve ilçelerinde tüketilen kaymak ve tereyağı örneklerinde AFM₁ kalıntı düzeylerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Örnekler

Çalışma kapsamında, Kayseri'deki açık pazar yerlerinden rastgele alınan yaklaşık 200-250 gr tereyağı (50 adet) ve kaymak (50 adet) olmak üzere toplam 100 adet yağ örneği materyal olarak kullanıldı. Örnekler soğuk zincir altında laboratuvara getirilerek analiz edildi.

Örneklerin ekstraksiyonu

Çalışmada, analiz edilen örneklerin ekstraksiyon prosedürü kullanılan test kitindeki (RIDASCREEN Aflatoxin M₁, R-Biopharm, Art. No: R1111, Almanya) üretici firma talimatlarına göre gerçekleştirildi. Özetle, 37 °C'ye ayarlanmış su banyosunda (Nüve®, BM401, Türkiye) eritilen 5 gr yağ örneğine 25 mL (%70'lik) metanol ilave edilerek 40°C'de sıcak su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra, karışım yavaşça oda sıcaklığında 10 dakika karıştırılarak ekstrakte edildi.

Tablo 1. AFM₁ analizinde kullanılan standartların absorpsiyon değerlerine göre elde edilen referans aralıkları

| Standart | Konsantrasyonları (ng/L) | Ortalama Absorbans değeri | % Standart Sapma (SS) | %CV | % B/B0 |
|----------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|-----|--------|
| 1 | 0 | 1.339 | 0.009 | 0.5 | 100.00 |
| 2 | 5 | 1.300 | 0.008 | 0.5 | 97.09 |
| 3 | 10 | 1.220 | 0.009 | 0.4 | 89.62 |
| 4 | 25 | 0.955 | 1.00 | 0.5 | 71.32 |
| 5 | 50 | 0.832 | 0.009 | 0.4 | 62.16 |
| 6 | 100 | 0.620 | 0.006 | 0.4 | 46.30 |

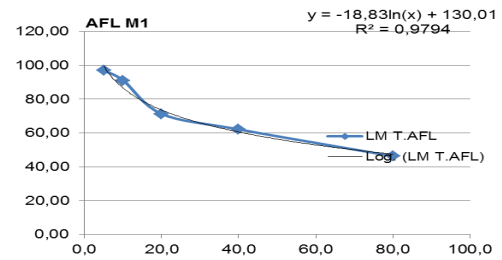
Eksrakt filtre (Whatman No:1, 125 mm) kağıdından süzüldü ve 5 mL süzölmüş çözeltiliye 15 mL damıtılmış su ve 0,25 mL Tween-20 ilavesinden sonra 2 dakika homojenize edildi. Homojenizasyon işleminden sonra, bu karışımın 20 mL'si ticari kitin kullanım kılavuzuna göre kolondan (Rida Aflatoxin Column Art. No: R5001/5002) geçirilerek temizlendi. Elde edilen elüentten kit içerisinde bulunan Buffer 1 ile 1:9 oranında dilüe edildi ve 100 µL'si AFM₁ analizi için testte kullanıldı.

ELISA Test Prosedürü

AFM₁ standart solüsyon ve hazırlanan örneklerden 100'er µL alınarak ayrı mikrotitre plaka kuyucuklarına eklendi ve karanlıkta oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda mikrotitre plaka ELISA otomatik yıkayıcıda (ELX 50, Bio-Tek Instruments, ABD.) iki kez yıkandı. Bir sonraki aşamada, her bir kuyucuğa 100'er µL enzim konjugat ilave edilerek 22-25 °C'de karanlık ortamda 15 dakika bekletildi ve kuyucuklar tekrar otomatik yıkayıcıda üç kez yıkandı. Daha sonra, her bir kuyucuğa 50 µL substrat ve 50 µL kromojen ilave edildikten sonra nazikçe karıştırılarak oda ısısında, karanlık ortamda 15 dakika inkübe edildi. En sonunda, her bir kuyucuğa 100 µL stop solüsyonu koyularak mikrotiter plaka nazikçe iyice karıştırıldı ve ELISA otomatik okuyucuda (Thermo, Finlandiya) 450 nm'de okutularak absorpsiyonlar kaydedildi.

Sonuçların değerlendirilmesi

Standart ve örnekler için elde edilen absorpsiyon değerlerinin ortalama değerleri, sıfır standardın absorpsiyon değeri ile bölündü ve 100 ile çarpıldı. Sıfır standart, % 100'e eşit hale getirildi ve absorpsiyon değerleri, yüzde cinsinden verildi. Standartlar için hesaplanan değerler, semilogaritmik grafik kağıdı üzerine ng/L (ppt) cinsinden AFM₁ konsantrasyonuna karşı koordinatlar sistemine girilmesi, elde edilen konsantrasyonların yağ örnekleri için belirlenen dilüsyon katsayısı ile çarpılması işlemleri, ELISA okuyucusu tarafından otomatik olarak gerçekleştirildi (Tablo1, Şekil 1). Analiz edilen her bir örneğin AFM₁ konsantrasyonu eğri üzerinden ng/L cinsinden okundu. Ekstraksiyonu yapılan tereyağı örnekleri için dilüsyon faktörü 5 olarak belirlendi.



Şekil 1. AFM₁ standartlarının konsantrasyonları (ppt) AFM₁ standartları için kalibrasyon eğrisi (0-80 ppt)

İstatistiksel analizler

Çalışmada, tereyağı ve kaymak örnekleri arasında AFM₁ konsantrasyonu bakımından farklılığın istatistik önem kontrolü Student T test ile yapıldı. Analizlerde SPSS 22.0 paket program kullanıldı.

Bulgular

Çalışma süresince analiz edilen tereyağı ve kaymak örneklerinin tamamında AFM₁ tespit edildi. Tereyağı numunelerinin 1'inde (% 2) ve Türk Gıda Kodeksinin (T GK) süt ürünleri için belirlemiş olduğu maksimum limit olan 50 ng/kg'ın üzerinde AFM₁ tespit edildi (Tablo 2). Çalışmada incelenen kaymak ve tereyağı numunelerinde sırasıyla 5.70 ng/kg - 26.62 ng/kg, 6.58 ng/kg -128.69 ng/kg aralıklarında AFM₁ içerdiği belirlendi. Analiz edilen örnekler arasında AFM₁ konsantrasyonları açısından anlamlı bir farklılık belirlenmedi (P=0.210, Tablo 3).

Tartışma ve Sonuç

Farklı ülkelerde yapılan birçok çalışmada

affinitesinden dolayı %10 düzeylerindeki çok düşük miktarı yağa geçerken yaklaşık %80'lerde olan büyük bölümünün proteine bağlanarak sütte kalmasına (2,8,15,16,19) bağlanabilir. Nitekim, Bakırcı (8) Van'da analiz ettiği 183 süt ve süt ürünü örneklerinden tereyağı ve kaymak örneğinin hepsinde AFM₁ saptadığını, ancak tereyağı örneklerindeki mevcut AFM₁'in 50 ng/kg'ın altında kaldığını vurgulamıştır ve bu durumu; AFM₁'in kimyasal yapısı ve kazeine olan affinitesi ile ilişkilendirmiştir. Bu nedenle, hidrofilik özellikte olan AFM₁'in tereyağında belirlenen düzeyi halk sağlığı açısından önemli olabilir.

Bu çalışmaya benzer olarak Fallah (16), Ashraf (3), Özbek (23), Ayçiçek ve ark. (5) ve Var ve Kabak (29) analiz ettikleri tereyağı örneklerinin AFM₁ bakımından sırasıyla; 3 (%9.6), 4 (%3), 4 (%8), 1(%3.7) ve 2 (% 20)'sinin kabul edilebilir maksimum limiti aştığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Maqbool ve ark. (21) tarafından Pakistan'da 10 adet tereyağı örneğinde son derece düşük düzeylerde (0.007 µg/L) AFM₁ olduğunu bildirirken, Sakuma ve ark. (25), Aksoy ve ark. (1), Ayyıldız (7) ve Demirel ve ark. (12) ise analiz

Tablo 2. Çalışmada incelenen örneklere ait AFM₁ düzeyleri

| Analiz Edilen Örnek | Örnek Sayısı | Örneklere ait AFM ₁ dağılımı/(%) | | |
|---------------------|--------------|---|-------------|----------|
| | | <25 ng/kg | 25-50 ng/kg | >50ng/kg |
| Kaymak | 50 | 49 (%98) | 1 (%2) | - |
| Tereyağı | 50 | 48 (%96) | 1 (%2) | 1 (%2) |
| Toplam | 100 | 97 (%97) | 2(%2) | 1(%1) |

$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$: ortalama±standart hata, min: minimum, max: maksimum

Tablo 3. Analiz edilen örneklerdeki AFM₁ Konsantrasyonları

| Analiz Edilen Örnek | AFM ₁ konsantrasyonları (ng/kg) | | | |
|---------------------|--|--------|---------------------------|------------------------------|
| | Min | Max | $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ | İstatistik önem kontrolü (P) |
| Kaymak (n=50) | 5.70 | 26.620 | 9.870±0.47 | |
| Tereyağı (n=50) | 6.58 | 128.69 | 13.01±2.44 | 0,210 |

(2,4,9,23,26) AFM₁ içeren süt ve süt ürünlerinin insanlarda çeşitli sağlık risklerine neden olduğu bildirilmiştir. AFM₁ içeren süt ve süt ürünlerini tüketen kişilerde (özellikle bebek, çocuk ve yaşlılar) toksikasyon riskinin yüksek olduğu belirtilmektedir (10,11).

Yapılan çalışmada incelenen yağ örneklerinin hepsinde AFM₁ tespit edildi. Ancak, sadece bir (%2) tereyağı örneğinde belirlenen AFM₁ düzeyi (128.69 ng/kg)'nın süt ürünleri için belirlenen maksimum tolerans seviyesinin (50 ng/kg) üzerinde olduğu tespit edildi (28). Bu durum, AFM₁'in yağda çözünmemesi ve kazeine

ettikleri tereyağı örneklerinin hiçbirinde AFM₁ saptamadıklarını rapor etmişlerdir.

Bu çalışmadan farklı olarak Ayçiçek ve ark. (6), inceledikleri 64 tereyağı örneğinin 52'sinde (%81) 10 - 2200 ng/kg aralığında AFM₁ belirlemişlerdir. AFM₁ belirlenen 52 tereyağı örneğinin 20'sinin (%31.25) 50 ng/kg'dan yüksek olduğunu vurgulamışlardır. Ataserver ve ark.(4) ise analiz ettikleri 89 tereyağı örneğinin 66'sının (%82.5) 10-121 ng/kg aralığında toksin içerdiği ve 13 (%16.3) tereyağı örneğindeki toksin düzeyinin yasal limitin üzerinde olduğunu saptamışlardır.

Yine, Tekinşen ve Uçar (27) araştırdıkları 92 tereyağı örneğinin tamamının AFM₁ içerdiğini ve 26 (%28) tereyağı örneğinde AFM₁ konsantrasyonunun kabul edilebilir maksimum limitten fazla olduğunu göstermişlerdir. Fakat, Yılmaz ve ark. (30) analiz ettikleri 27 adet tereyağı örneğinde 5.20-48.22 ng/kg aralığında AFM₁ tespit etmişler ve örneklerinin hepsinin kabul edilebilir maksimum limitin altında olduğunu rapor etmişlerdir.

Daha önce yapılan araştırmalar (1,4,6,7,12,21,25) ile bu çalışma arasındaki farklılıklar, örneklerin alındığı mevsim ve coğrafik koşullardan kaynaklanabilir (8,16,26). Süt ve süt ürünlerinde AFM₁ düzeyleri coğrafik koşullardan ve mevsimsel değişikliklerden etkilenmektedir (8,21). İlkbahar ve yaz mevsiminde merada taze otlarla beslenen hayvanlardan elde edilen süt ve süt ürünlerinin kışın kapalı alanda kesif yemle beslenen hayvanlardan elde edilenlere göre daha düşük düzeyde AFM₁ içerdiği bildirilmiştir (8,15,18,22). Sonuçlar arasındaki çeşitlilik; tereyağı yapımında kullanılan sütlerdeki AFM₁ düzeyleri ve tereyağı yapım yöntemlerindeki farklılıklardan, analiz metotlarındaki farklılıklardan (8,16), mandıra ve satış yapılan yerlerdeki hijyen durumu ve saklama koşullarındaki farklılıklardan kaynaklanabilir (4,27).

Bu çalışmada, incelenen kaymak örneklerinde belirlenebilir düzeyde AFM₁ bulunmuştur fakat örneklerin hiçbirinde AFM₁ konsantrasyonunun 50 ng/kg'ın üzerinde olmadığı gözlemlenmiştir. Yapılan literatür taramalarında konu ile ilgili sadece Bakırcı (8) ve Kara ve İnce (17) inceledikleri kaymak örneklerinde yasal sınırların altındaki düzeylerde AFM₁ belirlemiştir. Bu çalışmada elde edilen sonucun aksine, Bakırcı (8) analiz ettiği örnekler arasında kaymak örneklerinin süttten çok daha az fakat tereyağından biraz fazla oranda AFM₁ içerdiğini saptamıştır. Bu durum kaymak ve tereyağı örneklerinin yapımında kullanılan sütlerdeki AFM₁ düzeylerindeki farklılıklarla açıklanabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada analiz edilen örneklerden sadece birinin AFM₁ içeriği yasal sınırların üzerinde çıkmış olsa da söz konusu örneğin tereyağı olması ve AFM₁ kimyasal yapısı göz önüne alındığında halk sağlığı açısından göz ardı edilemeyecek bir öneme sahip olduğu görülmektedir. Bu nedenle toksinin gıda maddelerine bulaşmasını önleme, süt ve süt ürünlerinin insan tüketimi için güvenliğini sağlamanın tek pratik yoludur. Bu amaçla, tereyağı ve kaymak AFM₁ miktarının minimum düzeylerde tutulabilmesi için, mandıralarda ve süt işletmelerinde yağ yapımında kullanılan sütlerde AFM₁ analizlerinin yapılması, hayvan beslenmesinde kullanılan bitkilerde küf gelişiminin ya da yemlere depolama esnasında aflatoksinlerin bulaşmasını engellemek veya en alt düzeye çekmek için gerekli tedbirlerin alınması gerekmektedir. Hayvan sahiplerine, küflenmiş besin maddelerini hayvanlarına yedirmeleri sonucunda, karşılaşılabilecekleri

ekonomik kayıplar hakkında bilgi verilmelidir. Bunlara ilaveten çiftçilere, işletmecilere ve tüketicilere resmi kurumlar tarafından aflatoksinler hakkında düzenli eğitimler verilerek bilinçlendirilmesi halk sağlığının korunmasında en önemli ve en ekonomik çözüm yolu olacaktır.

Kaynaklar

1. Aksoy A, Atmaca E, Yazıcı F, Güvenç D, Gül O, Dervisoglu M. Comparative analysis of aflatoxin in marketed butter by ELISA and HPLC. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2016; 22(4): 619-21.
2. Applebaum RS, Brackett RE, Wiseman DW, Marth EH. Aflatoxin: Toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products. *J Food Protect* 1982; 45(8): 752-77.
3. Ashraf MW. Determination of aflatoxin levels in some dairy food products and dry nuts consumed in Saudi Arabia. *Food and Public Health* 2012; 2 (1): 39-42.
4. Atasever AM, Adıgüzel G, Atasever M, Ozturan K. Determination of aflatoxin M₁ level in butter samples consumed in Erzurum, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2010; 16(Suppl-A): 159-62.
5. Ayçiçek H, Aksoy A, Saygı S. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. *Food Control* 2005; 16(3): 263-6.
6. Ayçiçek H, Yarsan E, Sarımehtemetoğlu B, Çakmak Ö. Aflatoxin M₁ in white cheese and butter consumed in Istanbul, Turkey. *Vet Human Toxicol* 2002; 44(5): 295-6.
7. Ayyıldız T. Organik süt ve süt ürünlerinde aflatoksin M₁ varlığının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniv, Fen Bil Enst, Manisa 2012; s. 42.
8. Bakırcı I. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control* 2001; 12(1): 47-51.
9. Bbosa GS, Kitya D, Odda J, Ogwal-Okeng J. Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. *Health* 2013;5(10A): 14-34.
10. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(3): 497-516.
11. Creppy EE. Update of survey regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett* 2002; 127(1-3): 19-28.
12. Demirer MA. Süt ve süt mamüllerinde aflatoksin

- M₁ ve B₁ aranması üzerinde araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1973; 4(1): 421- 43.
13. Dragacci S, Glezies E, Fremy JM, Candlish AAG. Use of immuno affinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M in cheeses. Food Add and Cont 19912(1): 59-65.
 14. Nleya N, Adetunji MC, Mwanza. Current status of mycotoxin contamination of food commodities in Zimbabwe. Toxins 2018; 10(89): 1-12.
 15. Fallah AA, Rahnama M, Jafari T, Saei-Dehkordi SS. Seasonal variation of aflatoxin M₁ contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. Food Control 2011; 22(10): 1653-6.
 16. Fallah AA. Aflatoxin M₁ contamination in dairy products marketed in Iran during winter and summer. Food Control 2010; 21(11): 1478-81.
 17. Kara R, Ince S. Presence of aflatoxin M₁ in kaymak produced in Afyonkarahisar province. Fresen Environ Bull 2018; 27(7): 5033-36.
 18. Ketney O, Santini A, Oancea S. Recent aflatoxin survey data in milk and milk product: a review. Int J Dairy Technol 2017; 70(3): 1-12.
 19. Khaniki RJ. Chemical contaminants in milk and public health concerns: A review. Int J Dairy Sci 2007; 2(2): 104-15.
 20. Koçsarı FS, Taşcı F, Mor F. Survey of aflatoxin M₁ in milk and dairy products consumed in Burdur, Turkey. Int J Dairy Technol 2012; 65(3): 365-71.
 21. Maqbool U, Anwar-Ul-Haq, Ahmad M. ELISA determination of aflatoxin M₁ in milk and dairy products in Pakistan. Toxicol Environ Chem 2009; 91(2): 241-9.
 22. Nakajima M, Tabata S, Akiyama H, et al. Occurrence of aflatoxin M₁ in domestic milk in Japan during the winter season. Food Addit Contam 2004; 21(5): 472-8.
 23. Özbek E. Marmara bölgesi askeri birliklerinde tüketime sunulan süt ve süt ürünlerinde aflatoksin M₁ düzeylerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniv, Sağlık Bil Enst, Samsun 2006;s.56.
 24. Peraica M, Radić B, Lucić A, Pavlović M. Toxic effects of mycotoxins in humans. Bull World Health Organ 1999; 77(9): 754-66.
 25. Sakuma S, Kamata H, Sugita-Konishi Y, Kawakami H. Method for determination of aflatoxin M₁ in cheese and butter by HPLC using an immunoaffinity column. Food Hyg Saf Sci 2011; 52(4): 220-5.
 26. Sarımehtemetoğlu B, Kuplulu Ö, Çelik TH. Detection of aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA. Food Control 2004; 15(1): 45-9.
 27. Tekinşen KK, Uçar G. Aflatoxin M₁ levels in butter and cream cheese consumed in Turkey. Food Control 2008; 19(1): 27-30.
 28. Türk Gıda Kodeksi (TGK). Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, Resmi Gazete Tarihi: 29.12.2011/28157, Türkiye Cumhuriyeti Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ankara: 2011;1-19.
 29. Var I, Kabak B. Detection of aflatoxin M₁ in milk and dairy products consumed in Adana, Turkey. Int J Dairy Technol 2008; 62:15-8.
 30. Yılmaz SÖ, Altıncı A. Incidence of aflatoxin M₁ contamination in milk, white cheese, kashar and butter from Sakarya, Turkey. Food Sci Technol 2018; 16: 1-5.



Hasmer Koyunu Mandibula'sı Üzerinde Makroanatomik ve Morfometrik İncelemeler

Zekeriya ÖZÜDOĞRU¹, Ramazan İLGÜN^{1*}, Derviş ÖZDEMİR²

¹Aksaray Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Anatomi ABD, Aksaray-TÜRKİYE

²Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Anatomi ABD, Erzurum-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Ramazan İLGÜN; E-posta: rilgun1980@hotmail.com; ORCID: 0000-0003-0150-3008

Atıf yapmak için: Özüdoğru Z, İlgün R, Özdemir D. Hasmer koyunu mandibula'sı üzerinde makroanatomik ve morfometrik incelemeler. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(3): 218-223.

Özet: Çalışma Hasmer koyunu mandibula'sı üzerinde bazı morfometrik değerleri ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Çalışmada Bahri Dağdaş Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen reforme erişkin 8 adet Hasmer koyunu mandibula'sı kullanıldı. Hasmer koyununun mandibula'sı 19 noktadan ölçülmüş ve elde edilen değerler diğer koyun ırklarıyla karşılaştırılmıştır. Araştırmada mandibula'nın morfometrik incelemeleri dijital kumpas yardımıyla ölçülerek inceleme-ye ait veriler aritmetik ortalama ve standart hata ile belirlenmiştir. Hasmer koyununun mandibula uzunluğu 186.30±9.30 mm., mandibula yüksekliği ise 108.68±2.36 mm. olarak ölçülmüştür. Ölçülen bu değerler diğer koyun ırklarıyla bazı farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, klinik açıdan önemli olan nervus mentalis ve n. mandibularis'in içinden geçtiği for. mentale ve for. mandibula'nın topografik olarak yerleri belirlenmiştir. Hasmer koyununda yapılan uzunluk korelasyon analizi bulgularına göre uzunluk U1 ve U3 arasında, uzunluk U1 ve U12 arasında uzunluk U2 ve U5 arasında, uzunluk U3 ve U6 arasında ve uzunluk U5 ve U6 arasında pozitif yönde güçlü korelasyon mevcut iken, uzunluk U7 ve U18 arasında negatif yönde güçlü bir korelasyon olduğu tespit edildi. Bu çalışma Hasmer koyunu ile ilgili yapılacak çalışmalar için kaynak bir araştırma olacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Hasmer koyunu, mandibula, morfometrik

Investigations of Macroanatomical and Morphometric on the Mandible in Hasmer Sheep

Summary: The study was carried out to reveal some morphometric values on Hasmer sheep mandible. In this study, reformed eight adult Hasmer mandibles which were obtained from Bahri Dagdas Agricultural Research Institute were used. The mandible of the Hasmer sheep was measured at 19 points and the obtained values were compared with the other sheep breeds. Morphometric analysis of the mandible was measured with digital caliper and the data of the study were determined by arithmetic mean and standard error. The height of the mandible was 108.68±2.36 mm. and the length of the mandible was 186.30±9.30 mm. according to these measurements. These measured values showed some differences with other sheep breeds. In this study, the topographic locations of the mental and mandible foramen through which the clinically important mental and the mandible nerve pass are determined. According to the results of length correlation analysis in Hasmer sheep, there was strong positive correlation between length U1 and U3, length U1 and U12 between length U2 and U5, length U3 and U6, and length U5 and U6, while length U7 and U18 had a strong negative correlation. There was a strong correlation. This study is thought to be a source research for the studies on Hasmer sheep.

Key words: Hasmer sheep, mandible, morphometric

Giriş

Binlerce yıldan beri sütü, eti, yapağısı, derisi ve postu ile insanların en önemli gereksinimlerini karşılayan koyunlar, insanların yaşamında bugünde önemli rol oynamaktadır. Koyun eti dünyanın birçok bölgesinde sevilen ve aranan etlerden biri olarak kabul edilir (Sipahi, 2007; Kaymakçı, 2010).

Koyun insanın ilk evcilleştirdiği hayvanlardan biridir. İnsanoğlu kimi verim yönlerinde koyunları seçerek ve bunları birleştirerek koyun tiplerini ve daha sonraları koyun ırklarını oluşturmuştur. Bugün dünyada iki yüzden fazla koyun ırkı vardır ve her gün yenilerini elde etmek üzere de sayısız projeler yürütülmektedir

(Akçapınar, 1994).

Ülkemizde bazı melezleme çalışmalarıyla verim yönü yüksek yerli melez koyun ırkları elde edilmektedir. Bu melez koyun ırklarından, et verimi yüksek Hasmer ırkı koyunlar, Alman Siyah Başlı, Hampshire ve Merinos ırklarının üçlü melezlemesiyle oluşturulmuştur (Tekin ve ark., 2001, 2005a,b; Kaymakçı ve Taşkın, 2008).

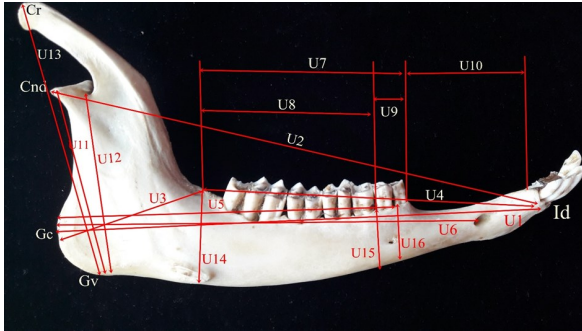
Evcil memelilerde mandibula ramus ve corpus'tan meydana gelmektedir. Corpus mandibulae'nin ön bölümü pars incisiva, yan bölümü ise pars molaris olarak adlandırılmaktadır. Mandibula'nın ramus ile corpus'unun birleştiği yerde oluşan açığa angulus mandibulae denilmektedir (Dursun N, 1996). Ramus mandibulae'nin dorso-caudalinde processus coronoi-

deus, caudalinde serbest olarak sonlanan processus condylaris çıkıntısı mevcuttur. Ramus mandibulae'nın facies lateralis'i üzerinde m. masseter kasının yapışmasına özgü fossa masseterica ve facies medialis'inde ise m. pterygoideus'un insertio yeri fossa pterygoideus çukurlukları bulunmaktadır (Dursun N, 1996; Wensing, 2016)

Koyun ırklarının mandibula'sı üzerine tıp ve diş hekimliğinde dental implant, fikzasyon, osteotomi gibi modelleme çalışmaları (Ünsal, 2016; Carvalho ve ark., 2018), Veteriner Hekimlikte ise makroanatomik ve morfometrik çalışmalar (Yalçın ve ark., 2010; Karimi ve ark., 2011a; Avdic ve ark., 2013; Monfared, 2013; Demiraslan ve ark., 2014; Dalga ve ark., 2017) yapılmasına rağmen Hasmer koyunu mandibula'sının makroskopisi ve morfometrisi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızın amacı Hasmer koyunu mandibula yapısının makro-anatomik ve morfometrik özelliklerini ortaya çıkarmaktır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada Bahri Dağdaş Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen reforme erişkin 8 adet Hasmer koyunu mandibula'sı kullanıldı. Mandibula'lar kafadan ayrılıp deri ve kaba etleri temizlendikten sonra, hidrojen peroksit ile 25-30 dakika masere edildi. Fotoğraf makinası ile fotoğraflandıktan sonra ölçüm aşamasına geçildi. Kullanılan anatomik terimlerde Nomina Anatomica Veterinaria (Nomina, 2012) esas alındı.



Şekil 1. Hasmer koyunu mandibula'sı üzerindeki ölçüm noktaları

U1: Gc ile Id arası uzunluk, U2: Proc. condylaris'in aboral kenarı ile Id arası uzaklık, U3: Gc ile 3. molar dişin arka alveolar kenarı arası uzunluk, U4: 3. molar dişin arka alveolar kenarı ile Id arası uzunluk, U5: Gc ile 2. premolar dişin ön alveolar kenarı arası uzunluk, U6: Gc ile foramen mentalen'in aboral kenarı arası uzunluk, U7: İlk premolar diş ile son molar diş arası uzunluk, U8: İlk ile son molar diş arası uzunluk, U9: İlk ile son premolar diş arası uzunluk, U10: Diestema uzunluğu, U11: Gv ile Cnd arası uzunluk, U12: Gv ile inc. mandibula'nın en derin noktası arası uzunluk, U13: Gv ile Cr arası uzunluk, U14: 3. molar dişin arka alveolar kenarı seviyesindeki mandibula yüksekliği, U15: 1. molar dişin ön alveolar kenarı seviyesindeki

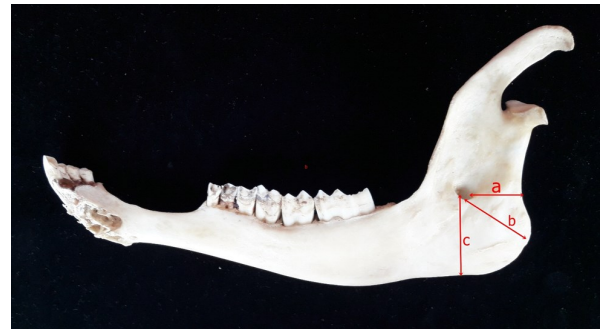
mandibula yüksekliği, U16: 2. premolar dişin ön alveolar kenarı seviyesindeki mandibula yüksekliği

İstatistikî Analizler

Mandibula'lar, Mitutoyo marka dijital kumpas aracılığı ile literatür bilgilere uygun olarak 19 farklı noktadan ölçümleri yapıldı. İki değişken arasında ilişki olup olmadığını, eğer varsa bu ilişkinin ne yönde ve ne derecede olduğunu belirlemek için Korelasyon testi uygulandı. Elde edilen bütün ölçümlerin ortalama, standart sapma ve korelasyon değerleri SPSS (18.0) versiyon programında belirlendi. Ölçüm alınan noktalar; Condylion (Cnd); processus condylaris'in caudal en uç noktası, (coronion) Cr; processus coronideus'un caudal en uç noktası, Gonionventrale (Gv); Angulus mandibulae'nın inferior uç noktası, Gonioncaudale (Gc); Processus angularis'in caudal en uç noktası, Infradentale (Id); İncisiv dişler arasındaki alveolün rostro-superior noktası (Şekil 1).

Bulgular

Makroanatomik olarak Hasmer koyunlarının mandibula'sının vertikal bir ramus ve horizontal bir corpus'tan meydana geldiği ve corpus mandibulae'da margo ventralis ve margo alveolaris olarak iki kenar bulunduğu tespit edildi. Corpus mandibulae üzerine incisive, premolar ve molar dişler için alveoli dentales'ler ve bunlar arasında septa interalveolaria'lar bulunmaktaydı. Bu hayvanlarda köpek dişi bulunmamaktadır. Diş kısımlarının yer aldığı kenar margo alveolaris, dişsiz bölge margo interalveolaris (diestema) olarak isimlendirilmektedir. Koyun mandibula'sında ramus ile corpus mandibulae birleştiği açılanmaya angulus mandibulae denilmektedir (Şekil 2).

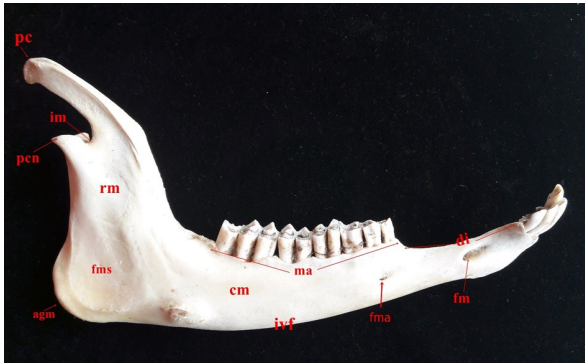


Şekil 2. Hasmer koyunu mandibula'sı medial görünüşü

a: Foramen mandibulae'nın caudal kenara olan uzaklığı, b: Foramen mandibular açığı olan uzaklığı, c: Foramen mandibulae'nın tabana olan uzaklığı

Ramus mandibula üzerinde caudal'de foramen mandibula'dan başlayıp rostral'e doğru uzanarak foramina mentalia'da sonlanan canalis mandibularis kanalı

yer almaktadır. Dorso-caudalinde processus coronoideus, caudalinde serbest olarak sonlanan processus condylaris çıkıntısı mevcuttur. Proccus condylaris'in articulatio temporomandibularis ile eklem yapan caudal kısmı içbükey durumdadır. Ramus mandibulae'nın facies lateralis'i üzerinde kenarları belirgin krista ile çevrelenmiş m. masseter kasının yapışmasına özgü fossa masseterica ve facies medialis'inde ise m. pterygoideus'un insertio yeri fossa pterygoideus çukurlukları yer almaktadır (Şekil 3).



Şekil 3. Hasmer koyunu mandibula'sı lateral görüntüsü

di: Diastema, fm:Foramen mentale, ma:margo alveolaris, ivf: Incisura vasorum facialium, cm: Corpus mandibulae, agm: angulus mandibulae, fms:Fossa masseterica, rm. Ramus mandibulae, pcn:Processus condylaris, im:Incisura mandibulae, pc: Processus coronoideus, fma:Foramen mentale accessoria

Corpus mandibulae üzerine 2. premolar diş hizasında ikinci bir delik foramen mentale accessoria tespit edildi. Ayrıca, corpus mandibulae'nın caudal 1/3'ünde belirgin bir tüberkül mevcuttu. Yapılan çalışmada Hasmer koyununun mandibula'sıyla ilgili ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 1'de, Korelasyon analizi Tablo 2'de gösterilmiştir.

Hasmer koyununun mandibula uzunluğu 186.30 ± 9.30 mm., mandibula yüksekliği ise 108.68 ± 2.36 mm. olarak ölçüldü. Yapılan ölçümlerde hayvanların diastema uzunluğunun 43.54 ± 3.48 mm., ilk premolar diş ile son molar diş arası uzunluğunun ise 74.53 ± 4.34 mm. olduğu tespit edildi. Nervus mentalis ve n. mandibularis'in bloke edilmesi için for. mentale ve for. mandibula'nın morfometrik ölçümleri klinik açıdan çok önemlidir. Buna göre processus angularis'in caudal en uç noktası ile foramen mentale'nin aboral kenarı arası uzaklık 149.40 ± 11.02 mm, foramen mandibula ile processus angularis'in caudal en uç noktası arasındaki uzaklık 30.20 ± 1.26 , foramen mandibula ile mandibula'nın tabanı arasındaki uzaklık 34.19 ± 1.54 ve foramen mandibula ile mandibula'nın caudal kenarı arasındaki uzaklık 23.63 ± 2.55 olarak ölçüldü (Tablo 1).

Sonuç olarak Hasmer koyununda yapılan uzunluk korelasyon analizi bulgularına göre uzunluk U1 ve U3 arasında, uzunluk U1 ve U12 arasında uzunluk U2 ve U5 arasında, uzunluk U3 ve U6 arasında ve uzunluk U5 ve U6 arasında pozitif yönde güçlü korelasyon mevcut iken, uzunluk U7 ve U18 arasında negatif yönde güçlü bir korelasyon olduğu tespit edildi (Tablo 2).

Tablo 1. Hasmer koyunu mandibula ölçülerinin ortalama ve standart sapma değerleri

| Ölçüler | N sayısı | Minimum değer | Maksimum değer | Hasmer koyunu aritmetik ortalamastd. sapma / mm |
|---------|----------|---------------|----------------|---|
| U1 | 8 | 177.35 | 197.10 | 186.30 ± 9.30 |
| U2 | 8 | 185.35 | 214.08 | 200.11 ± 10.55 |
| U3 | 8 | 48.64 | 59.47 | 54.76 ± 4.82 |
| U4 | 8 | 130.59 | 123.00 | 127.51 ± 2.92 |
| U5 | 8 | 130.53 | 112.00 | 124.58 ± 8.42 |
| U6 | 8 | 133.64 | 159.98 | 149.40 ± 11.02 |
| U7 | 8 | 69.00 | 78.55 | 74.53 ± 4.34 |
| U8 | 8 | 47.23 | 54.74 | 49.26 ± 3.11 |
| U9 | 8 | 21.20 | 31.56 | 24.93 ± 5.08 |
| U10 | 8 | 37.71 | 46.49 | 43.54 ± 3.48 |
| U11 | 8 | 72.85 | 77.21 | 74.58 ± 1.75 |
| U12 | 8 | 67.21 | 73.53 | 69.63 ± 2.69 |
| U13 | 8 | 107.41 | 109.99 | 108.68 ± 2.36 |
| U14 | 8 | 34.56 | 42.01 | 37.47 ± 3.25 |
| U15 | 8 | 21.89 | 25.96 | 23.81 ± 1.70 |
| U16 | 8 | 19.44 | 21.13 | 20.65 ± 1.36 |
| U17 | 8 | 28.71 | 30.81 | 30.20 ± 1.26 |
| U18 | 8 | 32.35 | 35.99 | 34.19 ± 1.54 |
| U19 | 8 | 21.90 | 28.09 | 23.63 ± 2.55 |

- U1: Gc ile Id arası uzunluk,
 U2: Proc. condylaris'in aboral kenarı ile Id arası uzaklık,
 U3: Gc ile 3. molar dişin arka alveolar kenarı arası uzunluk,
 U4: 3. molar dişin arka alveolar kenarı ile Id arası uzunluk,
 U5: Gc ile 2. premolar dişin ön alveolar kenarı arası uzunluk,
 U6: Gc ile foramen mentalen'in aboral kenarı arası uzunluk,
 U7: İlk premolar diş ile son molar diş arası uzunluk,
 U8: İlk ile son molar diş arası uzunluk,
 U9: İlk ile son premolar diş arası uzunluk,
 U10: Diastema uzunluğu,
 U11: Gv ile Cnd arası uzunluk,
 U12: Gv ile inc. mandibula'nın en derin noktası arası uzunluk,
 U13: Gv ile Cr arası uzunluk,
 U14: 3. molar dişin arka alveolar kenarı seviyesindeki mandibula yüksekliği,
 U15: 1. molar dişin ön alveolar kenarı seviyesindeki mandibula yüksekliği,
 U16: 2. pemolar dişin ön alveolar kenarı seviyesindeki mandibula yüksekliği,
 U17: Foramen mandibula ile Processus angularis'in caudal en uç noktası arasındaki uzaklık,
 U18: Foramen mandibula ile mandibulanın tabanı arasındaki uzaklık,
 U19: Foramen mandibula ile mandibulanın caudal kenarı arasındaki uzaklık (Şekil 1)

Tablo 2. Hasmer koyunu mandibula ölçülerinin korelasyon değerleri (^{**}P<0.05, ^{***}P<0.01, N:8)

| | U1 | U2 | U3 | U4 | U5 | U6 | U7 | U | U9 | U1 | U1 | U1 | U1 | U1 | U1 | U1 | U1 | U1 | U1 |
|-----|----|----------|------------------------|----------|------------------------|------------------------|----------|----|-----|-----|----------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------|-----|-----|-----|
| U1 | 1 | .89 0 | .96 6 ^{**} | .02 3 | .88 4 | .89 0 | - | .7 | - | .72 | .69 | .97 0 ^{**} | .69 | - | - | .08 | .47 | .51 | .59 |
| U2 | | 1 | .90 7 [*] | .13 4 | .96 3 ^{**} | .91 4 [*] | - | .8 | - | .92 | .86 | .91 6 [*] | .68 | - | - | - | .49 | .44 | .36 |
| U3 | | | 1 | - | .94 7 [*] | .96 1 ^{**} | - | .6 | - | .82 | .63 | .91 1 [*] | .53 | - | - | .12 | .58 | .67 | .68 |
| U4 | | | | 1 | .15 2 | .14 1 | .66 2 | .4 | .38 | - | .11 | .24 0 | .00 | .26 | .32 | .00 | - | - | - |
| U5 | | | | | 1 | .98 7 ^{**} | - | .7 | - | .89 | .70 | .88 7 [*] | .48 | - | - | - | .48 | .54 | .57 |
| U6 | | | | | | 1 | - | .6 | - | .83 | .59 | .87 3 | .39 | - | - | .13 | .46 | .59 | .69 |
| U7 | | | | | | | 1 | - | .81 | - | - | - | - | .69 | .51 | - | - | - | - |
| U8 | | | | | | | | 1 | - | .55 | .86 | .89 6 [*] | .83 | - | - | - | .01 | - | .08 |
| U9 | | | | | | | | | 1 | - | - | - | - | .89 5 [*] | .78 | - | - | - | - |
| U10 | | | | | | | | | | 1 | .78 5 | .70 2 | .51 0 | - | - | - | .72 | .63 | .29 |
| U11 | | | | | | | | | | | 1 | .76 9 | .88 9 [*] | - | - | - | .39 | .14 | - |
| U12 | | | | | | | | | | | | 1 | .73 9 | - | - | - | .30 | .32 | .47 |
| U13 | | | | | | | | | | | | | 1 | - | - | - | .30 | .04 | - |
| U14 | | | | | | | | | | | | | | 1 | .94 3 [*] | .26 | - | - | - |
| U15 | | | | | | | | | | | | | | | 1 | .55 9 | - | - | - |
| U16 | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | - | .26 | .79 |
| U17 | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | .90 | .28 |
| U18 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | .65 |
| U19 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |

Tartışma ve Sonuç

Literatürlerde mandibula uzunluğu ve mandibula yüksekliği ile ilgili olarak sırasıyla Hemşin koyununda (Dalga ve ark., 2017) 167.8 ve 94.2 mm, Morkaraman koyununda (Demiraslan ve ark., 2014) 152.4 ve 87.0 mm, Tuj koyununda (Demiraslan ve ark., 2014) 147.8 ve 85.4 mm, Mehra-ban koyununda (Karimi ve ark., 2011b) 157.6 ve 95.7 mm, Barbados koyunlarda (Mohamed ve ark., 2016) 181.6 ve 107.9 mm, Yankasa koyununda (Shehu ve ark., 2019) 198.0 ±0.28 ve 129.0± 0.57 olduğu bildirilirken, Avdic ve ark. (2013) Saraybosnadaki koyunlar üzerine yaptığı bir çalışmada 176.0 ve 99.6 mm olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada Hasmer koyununun mandibula uzunluğunun 186.30±9.30 mm mandibula yüksekliğinin ise 108.68±2.36 mm olduğu tespit edilmiştir. Bu değerlendirmelere göre Hasmer koyununun mandibula uzunluk ve yükseklik değerlerinin yukarıda bildirilen koyun türlerinden Yankasa koyunu (Shehu ve ark., 2019) hariç diğerlerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Sunulan bu çalışmada Hasmer koyununun 3. molar dişin arka alveolar kenarı seviyesindeki mandibula yüksekliğinin (37.47±3.25 mm.), Hemşin (Dalga ve ark., 2017) (37.93 mm) ve Morkaraman (Demiraslan ve ark., 2014) koyunlarından (38.88 mm) daha düşük olduğu tespit edilirken yukarıda bahsedilen diğer türlerin tamamından daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Yapılan çalışmada Hasmer koyununun Gv ile Cnd arası uzunluğunun 74.58±1.75 mm olduğu belirlenmiştir. Bu değer Mehra-ban koyunlarında (Karimi ve ark., 2011b) ise 77.50 mm olduğu bildirilmiştir.

İlk ve son molar diş arası uzunluk (U8) Hemşin koyununda (Dalga ve ark., 2017) 57.2 mm ve Morkaraman koyununda (Demiraslan ve ark., 2014) 53.12 mm olarak rapor edilmiştir. Çalışmada Hasmer koyununda ise bu değer 49.26±3.11 mm olarak ölçülmüştür.

Yapılan ölçümlerde çalışmada kullanılan hayvanların diestema uzunluğunun (43.54±3.48 mm), Hemşin koyunlarındaki (Dalga ve ark., 2017) değere yakın (43.74 mm) olduğu gözlenmiştir.

Processus angularis'in caudal en uç noktası ile foramen mentale'nin aboral kenarı arası uzunluk Mehra-ban koyununda (Karimi ve ark., 2011b) 137.4 mm, Barbados koyunlarda (Mohamed ve ark., 2016) 152.3 mm, Yankasa koyununda (Shehu ve ark., 2019) 165.0, İran yerli koyunlarında (Monfared, 2013) 112.9 olarak bildirilmiştir. Yapılan çalışmada bu değer Hasmer koyunlarında 149.40±11.02 olarak ölçülmüştür.

Hasmer koyunlarının foramen mandibula ile mandibula'nın caudal kenarı arasındaki uzaklığın (23.63±2.55), Yankasa koyununda (24.0±0.28) (Shehu ve ark., 2019) ve Barbados koyunlarına daha

yakın (23.0±0.25) (Mohamed ve ark., 2016), İran yerli koyunları (8.6±0.3) (Monfared, 2013) ve Mehra-ban koyunlarından (13.5±0.25) ise yüksek olduğu (Karimi ve ark., 2011b) belirlenmiştir.

Sonuç olarak; Hasmer koyununun mandibula'sı 19 noktadan ölçülmüş ve elde edilen değerler Alman Siyah Başlı, Hampshire ve Merinos ırklarında bu konuda çalışma yapılmadığından dolayı bu ırklarla karşılaştırma yapılamamıştır. Fakat diğer koyun ırklarıyla karşılaştırma sonucunda Hasmer koyununun mandibula uzunluk ve mandibula yükseklik değerlerinin çalışmada kullanılan literatürlerdeki koyun ırklarından Yankasa koyun ırkı hariç diğerlerinin tamamından daha yüksek olduğu belirlenirken, ölçülen diğer değerlerin ise bazı farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışma ile Hasmer koyunu mandibulasının makroanatomik ve morfometrik özellikleri ortaya konulmuştur. Elde edilen bulgular, tıp ve diş hekimliği çalışmalarında hayvan modeli olarak koyun kullanılmasında Hasmer ırkına özgü mandibula verilerinin kayıt altına alınmasını sağlamıştır.

Kaynaklar

1. Akçapınar H. Koyun Yetiştiriciliği. Ankara: Medisan Yayınevi 1994; ss. 8-14.
2. Avdic R, Hadziomerovic N, Tandir F, Pamela B, Velida C. Analysis of morphometric parameters of the Roe deer mandible (*Capreolus capreolus*) and mandible of the sheep (*Ovis aries*). Veterinaria 2013; 62: 1-9.
3. Carvalho HP, Saavedra MSFA, Ballester RY, Luz JGC. Biomechanical evaluation of the sheep mandible as a model for studying fixation methods. Int J Morphol 2018; 36(3): 926-30.
4. Dalga S, Aslan K, Kırbaş G. Hemşin Koyunu mandibulası üzerinde morfometrik bir çalışma. Atatürk Üniv Vet Bil Derg 2017; 12(1): 22-7.
5. Demiraslan Y, Gülbaz F, Özcan S, Dayan MO, Akbulut Y. Morphometric analysis of the mandible of Tuj and Morkaraman sheep. J Vet Anat 2014; 7: 75-86.
6. Dursun N. Veteriner Anatomi I. Ankara: Medisan Yayınevi 1996; ss. 104-07.
7. Karimi I, Hadipour M, Nikbakht P, Motamedi S. The lower jawbone of Mehreban sheep: a descriptive morphometric approach. World's Vet J 2011a; 2: 57-60.
8. Karimi I, Onar V, Pazvant G, Hadipour MM, Mazahehi Y. The cranial morphometric and morphologic characteristics of Mehreban sheep in Western Iran. Global Veterinaria 2011b; 6 (2): 111-7.
9. Kaymakçı M. İleri Koyun Yetiştiriciliği. İzmir: Meta

- Basım Matbaacılık 2010; ss. 1-6.
10. Kaymakçı M, Taşkın T. Türkiye koyunculığında melezleme çalışmaları. Hayvansal Üretim 2008; 49: 43-51.
11. Mohamed R, Driscoll M, Mootoo N. Clinical anatomy of the skull of the Barbados Black Belly sheep in Trinidad. Int J Curr Res Med Sci 2016; 2 (8): 8-19.
12. Monfared AL. Clinical anatomy of the skull of Iranian native sheep. Global Veterinaria 2013; 10 (13): 271-5.
13. Nomina Anatomica Veterinaria (NAV). International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. General assembly of the World Association of Veterinary Anatomists. Fifth Edition Gent. Published by the Editorial Committee Hannover (Germany) Columbia. MO (U.S.A.) Ghent (Belgium). Sapporo (Japan) 2012.
14. Shehu SA, Bello A, Sonfada ML, Suleiman HM, Umar AA, Danmaigoro A, Garba S, Abdullahi AU. Morphometrical study of the mandibular bone of female Yankasa sheep. International Journal of Current Science and Multidisciplinary Journal 2019; 2(1): 1-10
15. Sipahi C. Anadolu yaban koyunu. Veteriner Hekimler Dergisi 2007; 78(1): 8-17.
16. Tekin ME, Gürkan M, Karabulut O, Düzgün H. Merinos, Akkaraman ve İvesi ırklarının bazı etçi ırklar ile melezlerinde (Hasmer, Hasak, Haşiv ve Linmer) performans test ve seleksiyon çalışmaları: I. dölverimi ve yaşama gücü. Hayvancılık Araştırma Dergisi 2001; 11(2):1-8.
17. Tekin ME, Gürkan M, Karabulut O, Düzgün H. Performance testing studies and the selection of Hasmer Hasak Hasiv and Linmer crossbreed sheep types II Pre weaning growth. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 2005a; 29(1):59-65.
18. Tekin ME, Gürkan M, Karabulut O, Düzgün H. Performance testing studies and the selection of Hasmer Hasak Hasiv and Linmer crossbreed sheep types III fattening performance. Turk J Vet Anim Sci 2005b; 29(1): 67-73.
19. Ünsal NK. Sagittal split ramus osteotomisinde kullanılan fiksasyon yöntemlerinin deneysel olarak karşılaştırılması. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya 2016; 25-34.
20. Yalçın H, Kaya MA, Arslan A. Comparative geometrical morphometries on the mandibles of Anatolian Wild sheep (*Ovis gmelini anatolica*) and Akkaraman sheep (*Ovis aries*). Kafkas Üniv Vet Fak Derg 2010; 16: 55-61.
21. Wensing DS. Veteriner Anatomi Konu Anlatımı ve Atlas. Çeviri editörü Hazıroğlu M, Çakır A. dördüncü Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri 2016; 41-54.



İneklerde Süperovulasyon Uygulamalarında Son Gelişmeler*

Uğur KARA¹, Tayfur BEKYÜREK²

¹Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Adana-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji ABD, Kayseri-TÜRKİYE

*Sorumlu yazar: Uğur KARA; E-posta: ugunvetkara@hotmail.com; ORCID: 0000-0002-7977-6826

Atıf yapmak için: Kara U, Bekyürek T. İneklerde süperovulasyon uygulamalarında son gelişmeler. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(3): 224-232.

Özet: Süperovulasyon uygulamalarının amacı maksimum sayıda fertilizasyon ve transfer edilebilir embriyo elde etmektir. Süperovulasyon uygulanan sığırlarda ovaryum fonksiyonel cevabındaki farklılıklar ve bu durumun önceden tahmin edilememesi embriyo transfer programlarının karlılığını ve uygulanabilirliğini olumsuz etkilemektedir. Donörlerin süperovulasyon uygulamalarına verdikleri fonksiyonel yanıt farklılıkları gonadotropin uygulamasının başlangıcında ovaryumlar üzerindeki foliküler gelişim aşamalarındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Östrus siklusunun 8-12. günleri arasında uygulamaya başlanılan geleneksel süperovulasyon yöntemlerinin yoğun iş gücü gereksinimi ve donörlerin aynı zaman ve siklus aşamasında uygulamaya alınamaması gibi önemli dezavantajları uygulayıcıları alternatif süperovulasyon yöntemlerinin geliştirilmesi arayışına yöneltmiştir. Süperovulasyon yöntemleri saflaştırılmış hipofiz ekstraktları ve progesteron salınımı yapan intravaginal araçların kullanılmaya başlamasından sonra hızla gelişim göstermiştir. Ovaryumun folikül dinamiğinin belirlenmesi, foliküler dalga oluşumunun ekzojen kontrolü ve dominant folikülün baskılayıcı etkisinin ortadan kaldırılmasını temel alan foliküler dalga senkronizasyonu uygulamalarının gerçekleştirilmesi ile siklusun herhangi bir döneminde istenilen sayıda donör hayvana aynı zamanda süperovulasyon uygulanabilmektedir. Ayrıca geliştirilen bu yeni pratik yaklaşımlardan elde edilen sonuçlar geleneksel süperovulasyon yöntemleri ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılabilir düzeydedir. Sadeleştirilmiş ve optimum sayıda transfer edilebilir embriyo elde edilebilen protokollerin geliştirilmesi embriyo üretimi ve transferi çalışmalarının maliyeti ve uygulanabilirliği üzerine olumlu katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Foliküler dalga, FSH, GnRH, östradiol, süperovulasyon

Recent Advances in the Application Superovulation in Cattle

Summary: The purpose of superovulation applications is to obtain the maximum number of fertilization and transferable embryos. Differences in ovarian functional responses in superovulated cattle and the unpredictability of this condition negatively affect the profitability and applicability of embryo transfer programs. Differential functional responses of donors to superovulatory applications are due to differences in the stages of follicular development on the ovaries at the onset of gonadotropin administration. The traditional superovulation methods which initiated to be applied between 8-12 days of oestrus cycle the important disadvantages such as the inability of the donors to get into practice at the same time and at the same time as the cycle, have led practitioners to search for alternative superovulation methods. Superovulation methods developed rapidly after the use of purified pituitary extracts and intravaginal devices of progesterone release. Superovulation can be applied to desired number of donor animals at any time during the cycle determination of ovarian follicul dynamic, controlling the exogenous follicular wave appearance and the implementation of synchronization of the follicular wave based on removal of the dominant follicle suppressive effect. Furthermore, the results obtained from these new practical approaches developed are comparable to those obtained by traditional superovulation methods. The development of protocols in which simplified and optimal number of transferable embryos can be obtained will contribute positively to the cost and applicability of embryo production and transfer studies.

Key words: Follicular wave, FSH, GnRH, estradiol, superovulation

Giriş

Sığırlarda embriyo transferi uygulamaları kullanımı her geçen gün yaygınlaşmakta ancak süperovulasyon uygulamalarının sonuçlarındaki değişkenlik uygulamaların başarısı üzerine günümüzde en önemli

sınırlayıcı faktör olarak etkisini sürdürmektedir (27). Son 10 yılda süperovulasyon ve embriyo transferi (ET) için kullanılan protokol ve tekniklerde yapılan değişikliklere rağmen transfer edilebilir kaliteli embriyo sayısı nispeten değişmeden kalmıştır (63).

Süperovulasyon protokolleri son 40-50 yılda çok hızlı bir gelişim göstermiştir. 1970'lerde ticari hipofiz ekstraktlarının ve prostaglandinlerin (PG), 1980'lerde kısmen saflaştırılmış hipofiz ekstraktları ve progesteron (P4) salınımı yapan araçların geliştirilmesi ile

Geliş Tarihi/Submission Date : 02.08.2018

Kabul Tarihi/Accepted Date : 04.03.2019

*Bu derleme Tagem / Haysüd / 01-09-02-03 kod numaralı Anadolu Alacası Geliştirme Projesi tarafından desteklenen Doktora Tezinden hazırlanmıştır.

1990'larda günümüzde kullandığımız protokollerin birçoğunun oluşturulmasını sağlamıştır. Ayrıca real-time ultrasonografinin kullanımı ile foliküler dalga dinamiklerinin öğrenilmesi ve foliküler dalga ortaya çıkışının kontrol edilebilmesini sağlayan yöntemlerin gelişimi yeni pratik yaklaşımların oluşturulmasını sağlamıştır (26). Ancak foliküler dalga senkronizasyonu amacıyla yapılan uygulamalarda ultrason rehberliğinde folikül ablasyonunun deneyimli personel, ultrason ve ekipman gerektirmesi, uygulama alanının oldukça zor olması ve embriyo üretim merkezi dışındaki çiftliklerde uygulama güçlüğü gibi önemli dezavantajları bulunmaktadır. Buna ilave olarak foliküler dalga senkronizasyonu için en yaygın kullanılan hormon olan östradiolün ülkemizde ve birçok ülkede kullanımına izin verilmemesi süperovulasyon ve embriyo üretimi konusunda uygulayıcıların yeni arayışlara yönelmesine neden olmuştur. Bu amaçla gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) ya da luteotropik hormon (LH) kullanımı ile ilgili çalışmalar önem kazanmakta ve siklusun değişik dönemlerinde bu iki hormonun farklı zamanlarda uygulanmasıyla dominant folikülün uzaklaştırılması ve yeni foliküler dalga oluşturularak süperovulasyon uygulamalarına başlanması ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (41).

Süperovulasyon

Süperovulasyon donör olarak seçilen dişi hayvanlara ekzojen hormon uygulaması sonucu önceden belirlenen bir zamanda ovaryumlarında birden fazla folikül gelişimi ve bu foliküllerin ovulasyonlarının gerçekleşmesi olarak tanımlanır (6).

İneklerde süperovulasyon uygulamalarının amacı, maksimum sayıda fertilizasyon ve gebelik oluşturma olasılığı yüksek transfer edilebilir embriyolar elde etmektir (10).

Süperovulasyon için donör hayvanların seçimi

Birçok embriyo transfer programlarında donör hayvan seçimi üç ana kritere bağlı olarak yapılmaktadır: genetik üstünlük, üreme yeteneği ve genetiğin pazar değeri (48).

Donör seçiminde; normal bir postpartum dönem geçirmiş olmalı, 18-24 gün aralığında düzenli östrus siklusları göstermeli, vücut kondüsyon skorunun 2,5-4 olmalıdır. Döveler ineklere göre genellikle daha az embriyo üretirler ve embriyo verimi tahmin etmek güçtür bu nedenle verici olarak seçilen döveler 350 kg ve daha fazla olmalı, düzenli östrus siklusu göstermeli ve iyi gelişmiş üreme sistemine sahip olmalı, genellikle genç donörler (3-8 yaş aralığında) tercih edilmelidir (29).

Donör hayvanlar Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency (BLAD) ve Complex Vertebral Malformation (CVM) gibi kalıtsal hastalıkları (34) ve ayrıca fertilitayı etkileyecek BSE, IBR-IPV, Şap, BVD, Lökoz, Tüber-

küloz, Brusellozis gibi enfeksiyöz hastalık etkenlerini taşımalıdır (43).

Süperovulasyon uygulamalarında başarıyı etkileyen faktörler

Süperovulasyon uygulamasının başarısını etkileyen faktörler kullanılan hormon, seçilen donör hayvana bağlı faktörler ve diğer faktörler olarak üç alt başlıkta değerlendirilebilir. Kullanılan hormon bilinen denemiş preparatlar olmalı, dozu, uygulama şekli, uygulama sayısı, muhafazası ve hazırlanmasında prospektüsünde belirtilen hususlara dikkat edilmelidir. Seçilen donörün yaşı, ırkı, vücut ağırlığı, reproduktif geçmişi, uygulamanın başlangıcında ovaryumlarının durumu ve ovaryum üzerinde dominant folikülün varlığı süperovulasyon başarısını etkilemektedir. Diğer faktörler olarak ortam ısısı, çevre ve mevsim sayılabilir (44). Mevsim (11), yaş (37), süt verimi (12), vücut kondüsyon skoru (13), tekrarlanan süperovulasyon uygulamaları (38) ve östrus siklusunun farklı dönemlerinde süperovulasyon uygulamasının (9) embriyo verimi ve kalitesi üzerine etkisiyle ilgili araştırmalar yapılmıştır.

Süperovulasyonda kullanılan hormonlar

Siğirilerde süperovulasyon amacıyla üç farklı tip gonadotropin kullanılmaktadır: Domuz ve diğer evcil hayvan hipofizlerinden elde edilen gonadotropinler, gebe kısrak serum gonadotropini (PMSG) ya da equine chorionic gonadotropin (eCG) ve human menopausal gonadotropin (hMG)'dir (8).

Folikül stimülan hormonun (FSH) ineklerdeki biyolojik yarılanma süresinin çok kısa olduğundan (yaklaşık iki saat) özellikle süperovulasyon çalışmalarında periyodik tekrarlanan dozlar halinde kullanılmalıdır. (6,7,47). Klasik FSH uygulama protokolü 4-5 gün süre ile günlük iki kez intramusküler (i.m.) enjeksiyon şeklindedir. Total doz ham hipofiz ekstraktı için 28-50 mg, NIH-FSH-P1 kısmen saflaştırılmış hipofiz ekstraktı için 260-400 mg'dir. Uygulamanın başlangıcından sonraki 48 ya da 72. saatte lüteolizis için Prostaglandin_{F2α} (PGF_{2α}) uygulanmakta, östruslar uygulamadan sonraki 36-48 saatte oluşmakta ve bundan 24-36 saat sonra ovulasyonlar başlamaktadır (24).

eCG hem FSH hem de LH aktivitesine sahip kompleks bir glikoproteindir (53). Yarılanma ömrü 40 saatir ve siğir dolaşımında 10 günden fazla süreyle kalır; bu nedenle normal olarak bir kez i.m. enjeksiyonu yapılır ve bunu 48 saat sonra yapılan PGF_{2α} enjeksiyonu takip eder (33). eCG'nin yarılanma ömrünün uzun olması nedeniyle devam eden ovaryum aktivitesi, anovulatör folikül gelişimi, anormal endokrin profiller ve embriyo kalitesinde azalma gibi olumsuzluklar oluşmaktadır (51). Bu problemler östrus başlangıcından 12-18 saat sonra ilk tohumlama sırasında anti-eCG'nin intravenöz olarak verilmesi ile büyük ölçüde aşılmıştır (33,36). eCG süperovulasyon amacıyla uygulanan dozu 2500 internasyonal ünite (IU)/

inek'dir. Ancak eCG antikorunun (anti-eCG'nin) ticari olarak bulunmaması önemli bir problemdir (44).

Siğirilerde hMG kullanılarak yapılan süperovulasyon çalışmalarında FSH veya PMSG çalışmalarının sonuçları gibi olumlu ve yeterli sonuç alınamaması, yüksek dozlarında bile ovule olmayan follikül sayısının önemli oranda fazla olması bu hormonun önemli dezavantajlarıdır (7).

Süperovulatör hormonlarla birlikte kullanılan diğer hormonlar

Siğirilerde süperovulasyon uygulamaları öncesi, sırası ve sonrasında; östrus senkronizasyonu, foliküler dalga oluşumunun ekzojen kontrolü ve senkronizasyonu, CL'un luteolizisi, dominant folikülün ovulasyonu ya da regresyonu ve ovulasyonların uyarılması amacıyla süperovulasyonu uyarıcı hormonlarla birlikte birçok hormon kullanılmaktadır. Bunlar GnRH, LH, human koryonik gonadotropin (hCG), P4, PGF₂α, östrojenler ve anti-PMSG'dir (41).

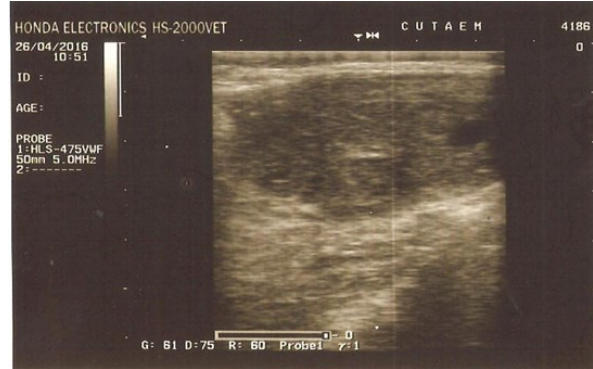
Siğirilerde süperovulasyon yöntemleri

Ticari embriyo transfer programlarının yaygınlaştırılmasından sonra her bir donörden elde edilen embriyo sayısının artırılması amacıyla süperovulasyon yöntemleri sürekli olarak geliştirilmektedir (47). Özellikle 1990'ların başlarında geliştirilen seçilmiş foliküler dalganın ve ovulasyonun kontrolü çiftliklerde yapılan ET çalışmalarında özellikle çok sayıda donör hayvana belirli bir zamanda toplu olarak uygulama yapılabilmesi açısından oldukça önem kazanmıştır (23).

Foliküler dalga ve ovulasyon kontrol programlarının geliştirilmesi süperovulasyon yanıtındaki farklılıkları ortadan kaldırmaya da istenilen zamanda uygulamalara başlanılmasını, donörlerin sabit zamanda tohumlanmasını sağlayarak embriyo transferi çalışmalarına olumlu katkı yapmıştır (24,27,47). Bu gelişmeler doğrultusunda süperovulasyon protokolleri artık daha kullanışlı hale gelmiş, çiftliklerde uygulaması daha kolaylaşmış ve östrus tespit zorunluluğu ortadan kalkmıştır (23).



Şekil 1. Süperovulasyon uygulamasına çok iyi fonksiyonel cevap alınmış bir siğir ovaryumu üzerinde tohumlama öncesi süperfolikülasyon görünümü (41).



Şekil 2. Süperovulasyon uygulanmış bir siğir ovaryumunda flushing öncesi korpus luteumların görünümü (41).

Geleneksel süperovulasyon yöntemleri

Siğirilerde embriyo transferi uygulamalarının ilk zamanlarında, korpus luteumun doğal regresyonuyla (siklusun yaklaşık 16. günü) uyumlu olarak eCG ile süperovulasyon uygulamaları yapılmıştır (46). PGF₂α'nın 1970'ler de kullanılmaya başlanmasıyla araştırmacılar FSH ile süperovulasyon uygulamasına östrus siklusunun herhangi bir döneminde ve özellikle östrustan sonraki 8-12. günler arasında başlamışlardır (25,47). Ultrasonografik muayene bulguları üç dalgalı gösteren ineklerde ikinci foliküler dalganın ovulasyondan sonraki 8.5 günde başladığı (siklusun 9.5 gününde), iki foliküler dalgalı siklus gösteren ineklerde ise ovulasyondan sonraki 9.5 günde (siklusun 10.5 gününde) başladığını göstermiştir (3). Bu nedenle östrustan sonra 8-12. günlerde başlanılan geleneksel süperovulasyon protokolleri iki ya da üç dalgalı sikluslarda ikinci foliküler dalganın başlangıç zamanını kapsayacağından ovaryumda süperovulasyon için bir grup gelişen folikül mevcut olacaktır. Foliküler dalganın başlangıcında başlanılan süperovulasyon uygulamalarında daha yüksek fonksiyonel yanıt elde edilmiştir. Foliküler dalganın ortaya çıkışı ile süperovulasyon uygulamalarına başlanması arasında bir günlük bir senkronizasyon uyumsuzluğu fonksiyonel cevabı önemli derecede azaltmaktadır (56). Birçok uygulayıcı azalan dozlarda FSH uygulaması ve protokolün üçüncü günü (5. ve 6. FSH enjeksiyonları ile aynı zamanda) PGF₂α enjeksiyonunun dördüncü günde 7. ya da 8. FSH enjeksiyonu ile aynı zamanda yapılmasını tercih etmekte, sonraki günde FSH uygulamamaktadırlar (47). Yapılan bir çalışmada süperovulasyon uygulaması sırasında çift PGF₂α uygulamasının embriyo sayısı ve kalitesi üzerine sayısal olarak olumlu etkisinin olduğu belirlenmiştir (42).

Geleneksel süperovulasyon protokollerinin iki dezavantajı bulunmaktadır: birincisi aksatmadan sürekli östrus tespiti yapan yetişmiş ve deneyimli personel ihtiyacı; ikincisi belirli bir zamanda uygulamaya başlamak için tüm donörlerin aynı zaman diliminde östrusta olmaları zorunluluğudur (22).

Foliküler dalga oluşumunun ekzojen kontrolü

Bir foliküler dalganın dominant folikülü diğer gelişen foliküllerden daha büyüktür ve ürettiği steroid ve nonsteroid maddeler aracılığıyla diğer foliküllerin gelişimini ve yeni foliküler dalga oluşumunu engellemektedir (2). Folikül gelişiminin senkronizasyonu için birkaç yöntem mevcuttur. Yapılan araştırmaların çoğu mevcut dominant folikülün fiziksel ya da hormonal uygulamalar sonucu diğer foliküller üzerindeki baskılayıcı etkisinin ortadan kaldırılması ve belirli bir zamanda yeni foliküler dalga oluşumunun ortaya çıkışının senkronizasyonunu temel almaktadır. Bu amaçla fiziksel olarak elektrokoterizasyon ya da ultrason rehberliğinde folikül ablasyonu yöntemleri: hormonal olarak ise GnRH, LH, östradiol ve P4 kullanılarak belirli bir zamanda yeni bir foliküler dalga oluşumu uyarılmaktadır. Gonadotropin sekresyonunu inhibe eden veya follikülogenezise müdahale eden ovaryum faktörlerinin belirlenmesi folikül gelişiminin ekzojen kontrolü için yeni yöntemlerin geliştirilmesinde önemlidir (25).

Süperovulasyon için foliküler dalga senkronizasyonu

Süperovulasyon amacıyla foliküler dalga oluşumunun senkronizasyonu için kullanılan üç yöntem vardır;

Östradiol ve progesteron: Östradiol, FSH ve muhtemelen LH salınımının baskılanması yoluyla FSH ve LH'ya bağımlı foliküllerin gerilemesine neden olur. Folikül regresyonunun başlamasından ve östradiolün metabolize olmasından hemen sonra tekrar FSH salınır ve bir gün sonra yeni bir foliküler dalga ortaya çıkar. Östrus siklusunun dönemi ve foliküler gelişim aşamasına bakılmaksızın progestin implantı uygulanan ineklerde kısa etkili östradiol-17 β 'nin kullanılmasını takiben yaklaşık 3-5 gün (ortalama 4 gün) sonra yeni bir foliküler dalga ortaya çıkmıştır (25). En yaygın kullanılan protokol P4 içeren intravaginal aygıtın uygulanmasıyla birlikte 5 mg östradiol-17 β ya da 2.5 mg östradiol benzoat, 100 veya 50 mg P4'un i.m. enjeksiyonunu içerir (27,47). Uygulamadan sonraki ortalama 4. günde yeni bir foliküler dalga oluşumu görülmektedir. Gonadotropin uygulamalarına bu zaman diliminde yani 4 gün sonra başlanmalıdır. Östrojen ve P4 uygulanarak yapılan foliküler dalga manüplasyonu sonrası süperovulasyon uygulamalarında elde edilen sonuçlarda geleneksel süperovulasyon uygulamalarındaki gibi transfer edilebilir embriyo sayıları yüksek olmasa da fertilizasyon oranları yapılan iki çalışmada da oldukça yüksek bulunmuştur (21,25). Ancak östradiolün kullanımı, östrojenik maddelerin gıda zincirindeki etkileri ile ilgili endişeler nedeniyle dünyanın birçok ülkesinde yasaklanmıştır (45).

Folikül ablasyonu: Bir diğer alternatif yöntem dominant folikülün ultrason rehberliğinde ablasyonu ile

supresif etkisinin ortadan kaldırılmasıdır (17). Başlangıçtaki çalışmalar 5 mm'den büyük tüm foliküllerin ablasyonunu içeriyordu (18), ancak daha sonra dominant folikülün supresif etkisinin ortadan kaldırılması için en büyük iki folikülün ablasyonunun yeterli olduğu sonucuna varılmıştır (14). Foliküler dalganın ortaya çıkışı folikül ablasyonu uygulamasından 24-36 saat sonra çok tutarlı bir şekilde oluşmaktadır ve süperovulasyon uygulamalarına bu zaman diliminde başlanmalıdır. Bu yöntem oldukça etkilidir ve elde edilen sonuçlar bakımından östrojen ve P4 uygulayarak foliküler dalga manüplasyonu ile elde edilen sonuçlardan farkı yoktur (18), ancak folikül ablasyonuna uygun ultrason ekipmanı ve deneyimli personel gerektirir, ayrıca embriyo üretim merkezi dışındaki uygulamalarda kullanımı biraz zordur (26).

GnRH ya da LH kullanımı: Bu yöntem dominant folikülün ovulasyonunu uyararak yeni bir foliküler dalga oluşumunu başlatmak için GnRH ve domuz LH'sının kullanımını içerir. GnRH ile dominant folikülün ovulasyonunun uyarılmasından 1.5-2 gün sonra yeni bir foliküler dalga oluşumu başlamaktadır. Fakat foliküler dalga oluşumu sadece GnRH uygulaması sonrası dominant folikülün ovulasyonu şekillendiğinde ortaya çıkmaktadır (49). Son çalışmalarda östrus siklusunun herhangi bir döneminde GnRH uygulaması sonucu sütçü ineklerde % 44-54 (16), etçi düvelerde % 56 (49) ve etçi ineklerde % 60 oranında ovulasyon elde edildiğini bildirilmektedir (60). Bu nedenle GnRH uygulamasından foliküler dalga oluşumunun başlangıcına kadar geçen süre süperovulasyon uygulamaları için çok tutarlı olmayabilmektedir. GnRH ya da LH'nin temel uygulama şekli olarak P4 içeren bir aygıt kullanılır ve bundan 2-3 gün sonra GnRH enjeksiyonu yapılır, süperovulasyon uygulamalarına ise GnRH enjeksiyonundan 1.5-2.5 gün sonra başlanılabileceği bildirilmiştir. Bir P4 içeren aygıtın olması uygun foliküllerin ovulasyonunu engelleyerek GnRH'nin etkinliğini artırmış olabilir (26).

İlk foliküler dalga sırasında süperovulasyon

Bazı araştırmacılar İkinci dalga folikülleri gibi birinci dalganın foliküllerinde gonadotropin uygulamalarına benzer yanıt verdiği ve süperovulasyon yanıtında fark olmadığını belirtmişlerdir (4). Bununla birlikte ilk foliküler dalga sırasında FSH uygulamasıyla birlikte embriyo kalitesinin olumsuz etkilenmemesi amacıyla P4 içeren bir araç kullanılması gerektiği ifade edilmektedir (55). Bir diğer alternatif PGF $_{2\alpha}$ ve P4 içeren aygıtın aynı zamanda uygulanmasını takiben 7. günde GnRH enjeksiyonu ile foliküler dalga oluşumunun senkronize edilmesidir (2). Bu amaçla tavsiye edilen süperovulasyon protokolü P4 içeren aygıt ve PGF $_{2\alpha}$ 'nın aynı zamanda verilmesinden oluşur. Yedi gün sonra GnRH (P4 aygıtı hala yerinde) persiste folikülün ovulasyonu indüklemek ve foliküler dalga oluşumunu senkronize etmek amacıyla uygulanır. GnRH uygulamasından sonraki 1-2 gün içerisinde

yeni foliküler dalga başlayacaktır. FSH uygulamaları-na GnRH uygulamasından 36 saat sonra başlanılmadır (31). P4 içeren aygıt ve PGF₂α'nın aynı zamanda verilmesini takiben 10. günde ikinci bir PGF₂α uygulanması ve P4 içeren aygıtın uzaklaştırılması, bundan 48 saat sonra GnRH uygulanması ve GnRH uygulamasından 36 saat sonra foliküler dalga ortaya çıkışı sırasında süperovulasyon uygulamasına başlanılan bir diğer çalışmada da östradiol ile foliküler dalga senkronizasyonuna benzer sonuçlar elde edilmiştir (32). Folikül ablasyonu sonrası süperovulasyon sırasında endojen progesteron kaynağının uzaklaştırılmasının (PGF₂α ile) embriyo kalitesi ve sayısı üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, endojen progesteron kaynağı (CL) uzaklaştırılan donörlerin toplam embriyo ve transfer edilebilir embriyo sayılarının uzaklaştırılmayanlara göre düşük olduğu bildirilmiştir (63).

Subordinat foliküllerin kullanımı

Küçük foliküller büyümelerine devam etmek için FSH'ya ihtiyaç duyarlar ve elde edilen bulgular sonucu 1 mm kadar küçük çaptaki foliküllerin FSH'nin etkisi altında büyümeye başlayacağı belirtilmektedir (5). Süperovulasyon için yeni folikül ihtiyacının 4-5 günlük süperovulasyon uygulama protokolünün başlangıç zamanında 3-4 mm çap büyüklüğüne ulaşacak küçük antral foliküller tarafından sağlanabileceği hipotezi öne sürülmüştür. Günde 1-2 mm'lik bir büyüme hızını göz önüne aldığımızda, 1 mm'lik bir folikülün 3-4 mm büyüklüğe ulaşması 2-3 gün süre alabilir bu durumda süperovulasyon protokolüne 2-3 gün ilave edilmelidir. Subordinat foliküllerin büyümesinin uyarılması ve foliküler dalga içerisine daha fazla folikül dahil edilmesi amacıyla süperovulasyon için hormon uygulamasına başlamadan önceki iki gün günde iki kez küçük doz FSH uygulanmış ve sonra toplam verilen FSH miktarında artış olmadan dört gün süre ile günde iki kez düzenli FSH uygulaması ile süperovulasyon protokolüne başlanılmıştır. Bir diğer alternatif uygulama ise FSH ile iki gün günde iki kez yapılan ön uygulamanın yerine düşük dozda tek uygulama eCG enjeksiyonunun yapılmasıdır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda FSH uygulamasına başlanılmadan önce uygulanan eCG'nin foliküler dalga içerisine ilave yeni folikülleri dahil ettiği varsayımı öne sürülmüştür (26). Bir çalışmada etçi donörlere FSH uygulamasına başlamadan iki gün önce 500 IU eCG uygulanmasının süperovulasyon yanıtını olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (30). Diğer bir çalışmada 400 IU eCG ile ön uygulama yapılan etçi donörlerde, eCG uygulanmadan yapılan süperovulasyon uygulamalarına göre embriyo veriminde artış elde edildiği belirtilmiştir (20).

Tek veya iki FSH enjeksiyonu ile süperovulasyon

Süperovulasyon uygulamalarında günde iki kez FSH uygulaması zorunluluğunun sürekli dikkat ve iş gücü gerektirmesi çiftlik personeli ve donörler de yaralan-

ma riskini, çiftlik personelinin hatalı uygulama ve yanlış kullanım olasılıklarını artırmaktadır. Buna ek olarak günde iki enjeksiyon donörlerde aşırı strese neden olabilmekte, süperovulasyon yanıtının azalmasına yol açabilmekte (19) ve preovulatör LH profillerinin değişimine neden olabilmektedir (61). Sadeleştirilmiş süperovulasyon protokolleri ile uygulama maliyetleri azaltılabilir ve uysal olmayan hayvanlarda dahi iyi sonuçlar alınması mümkün olabilir (23,28).

FSH'nin toplam uygulama dozunun tek seferde subkutan enjeksiyon şeklinde uygulanması ile, dört gün boyunca günde iki kez i.m. enjeksiyon yapılan protokollerde elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar alındığı bildirilmiştir (19,28). Bununla birlikte süperovulasyon cevabı vücut kondüsyonuyla da ilişkilidir. Deri altı adipoz dokusu fazla olan ineklerde boyun bölgesinden ziyade omuz gerisine yapılan subkutan enjeksiyonlarda yarılanma ömrü kısa olan FSH'nin yağ dokusu içerisinde yavaş emilimi ile oldukça yüksek bir süperovulasyon cevabı alınmıştır. Aslında FSH'nin hızlı emilimine neden olan tüm faktörler (örneğin yağsız hayvanlarda boyun bölgesinden i.m. enjeksiyon gibi) süperovulasyon cevabının azalmasına neden olmuştur (23). Holştayn ineklerde subkutan yağ dokusunun azlığından kaynaklanan tutarsız sonuçlar FSH dozlarının bölünerek %75'nin uygulamanın başlangıcında, kalan %25'nin 48 saat sonra azda olsa adipoz yağ dokusu bulunan omuz bölgesinden yapılmasıyla kısmen aşıldığı bildirilmiştir (28). Son yıllarda birkaç gün boyunca yavaş ve sürekli salınımını sağlayan bir polimer kullanılarak (20 mg/ml hyaluronan) seyreltilmiş FSH'nin tek bir i.m. enjeksiyonu ile çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar bakımından günde iki kez düzenli FSH enjeksiyonu yapılan donörlerin verileriyle karşılaştırıldığında farklılık bulunmamıştır (22,28,62).

Uzun FSH uygulama protokolleri

Son zamanlarda etçi donörler ile yapılan bir çalışmada FSH uygulamasının uygulanan toplam doz miktarı değişmeden sadece uygulama sayısı ve süresi artırılarak (7 gün, 14 enjeksiyon) yapılmasının süperovulasyon fonksiyonel cevabını artırdığı ve oosit/embriyo gelişimi üzerine herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı bildirilmiştir (35). Uzamış FSH enjeksiyon uygulamalarının folikül gelişimini devam ettirdiği, oosit/embriyo gelişiminde bir azalma olmadan ovulasyon sayısını artırdığı ve daha fazla sayıda foliküle ovulasyon yeteneğini kazandırdığı anlaşılmıştır (23).

Süperovulasyonun final aşamasında eCG kullanımı

Süperovulasyon sırasında farklı zamanlarda FSH ve LH'ya olan ihtiyaç tartışılmıştır. Folikül gelişimine ilişkin temel çalışmalar FSH'nin folikül oluşumu ve gelişimi için gerekli olduğunu göstermiştir (1). Dominant foliküller seçildikten sonra LH reseptörleri gelişir

ve LH'ya bağımlı hale gelirler (50). Bu nedenle süperovulasyon protokolünün sonuna doğru protokole LH'nın dahil edilmesi süperovulasyon uygulanan donörlerde foliküller gelişime katkı sağlayabilir. eCG hem FSH hem de LH etkisine sahip olduğu için geleneksel FSH süperovulasyon protokollerinin sonlarına doğru büyüyen ve gelişen foliküllerde LH reseptörleri için sürekli bir uyarım oluşturabilir (23).

Süperovulasyon amacıyla FSH uygulamasının dördüncü günü son iki FSH enjeksiyonu yerine 200'er IU eCG enjeksiyonu uygulanan çalışmada toplam ovum/embriyo sayısında ve transfer edilebilir embriyo sayısında kontrol grubuna göre artış olduğunu bildirmiştir (15). Brangus ırkı donörler ile yapılan diğer bir çalışmada kontrol grubunda dört gün boyunca günde iki kez sadece FSH, birinci gruba ilk dört FSH enjeksiyonundan sonra tek doz 400 IU eCG ve ikinci gruba ilk altı FSH uygulamasından sonra 7. ve 8. FSH enjeksiyonu yerine aynı günde iki kez 200'er IU eCG uygulanmıştır. Sonuç olarak 200 IU eCG uygulanan grupta transfer edilebilir embriyo sayısında artış olduğu bildirilmiştir (57). Donör hayvanlarda potansiyel fonksiyonel cevabın istenilen düzeyde olmadığı ve artırılmasının istendiği durumlarda FSH uygulamalarından sonra yapılan eCG uygulamaları ile süperovulasyon fonksiyonel cevabında ve embriyo üretiminde artış elde edilebileceği bildirilmiştir (23).

Folikül sayıları, AMH düzeyi ve süperovulasyon yanıtı

AMH transforming growth factor- β familyasına ait glikoprotein yapıda bir hormondur. Gelişen tüm foliküllerin granuloza hücreleri tarafından üretilir, sağlıklı antral foliküllerde maksimum seviyededir (52). İneklere farklı foliküler dalgalarında gelişen folikül sayısı hayvanlar arasında oldukça değişkenlik gösterir (39). Ayrıca folikül sayılarının dolaşımdaki anti-müllerian hormone (AMH) düzeyi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (40). İneklere üzerinde yapılan bir çalışmada 3-5 mm çapında 30'dan fazla foliküle sahip donörler ile 30'dan az foliküle sahip donörler arasında süperovulasyon sonuçlarında farklılık tespit edildiği bildirilmiştir (59). Benzer şekilde etçi düveler ile yapılan başka bir çalışmada foliküler dalga oluşumu sırasında az sayıda folikül (<15 folikül, >3 mm çapında) bulunan donörlerde çok sayıda folikül (>25 folikül) bulunan donörlerden daha düşük süperovulasyon sonuçları elde edildiği bildirilmiştir (39). Japon siyah inekleri üzerinde yapılan bir çalışmada tohumlama öncesi AMH düzeyleri ile embriyo verimi arasında pozitif bir korelasyon olduğu, yetiştirme döneminde plazma AMH düzeylerinin donör seçiminde süperovulasyon fonksiyonel cevabı ve embriyo verimliliği için başlangıç kriteri olarak kullanılabilirliğini bildirilmiştir (54). Holştayn donörler üzerinde yapılan çalışmada AMH üretimi ile embriyo verimi arasında pozitif bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (58).

Sonuç

Sonuç olarak Embriyo Transferi uygulamaları için sadeleştirilmiş ve optimum sayıda embriyo elde edilebilen protokollerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Son yıllarda geliştirilen foliküler dalga ve ovulasyon kontrol programları süperovulasyon cevabının değişkenliğini ortadan kaldırmaya da istenilen zamanda uygulamalara başlanılmasını sağlayarak embriyo transferi çalışmalarına olumlu katkı sağlamışlardır.

Kaynaklar

1. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 1992; 94: 177-88.
2. Adams GP, Kot K, Smith CA, Ginther OJ. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates. *Can J Anim Sci* 1993; 73: 267-75.
3. Adams GP. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle; Implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology* 1994; 4: 19-24.
4. Adams GP, Nasser LF, Bó GA, Garcia A, Del Campo MR, Mapletoft RJ. Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology* 1994; 42: 1103-13.
5. Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Mahli P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 2008; 69: 72-80.
6. Alaçam E. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun'i Tohumlama, Doğum ve Infertilite (1.Baskı). Konya 1994; ss. 1-385
7. Akyol N. Sığır embriyo transferinde hormon kullanımı. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg* 2001; 41 (1): 95-105.
8. Alkemade S, Murphy B, Mapletoft R. Superovulation in the cow: effects of biological activity of gonadotropins. In: Proceedings of the 12th Annual Meeting of the American Embryo Transfer Association, Portland, Maine, 1993, pp. 1-19.
9. Andrade JC, Oliveira MA, Lima PF, Guido SI, Bartolomeu CC, Tenório Filho F, Pina VM, Iunes-Souza TC, Paula NR, Freita JC. The use of steroid hormones in superovulation of Neloro donors at different stages of estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 2003; 77: 117-25.
10. Armstrong DT. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology* 1993; 39: 7-24.
11. Ayaşan T, Hızlı H, Gök K, Kılıçalp N, Kara U,

- Çamlıdağ A, Karakozak E, Mutlu H, Çoban S, Seğmenoğlu MS. Effect of season upon the embryo quality in donor cows. *J Fac Vet Med Univ Erciyes* 2011; 8(3): 181-6.
12. Ayaşan T, Hızlı H, Çamlıdağ A, Kara U, Gök K, Karakozak E, Çoban S, Mutlu H, Kılıçalp N, Seğmenoğlu MS. The determination of relationship between milk production and the quality of embryo of donor cows. *Indian J Anim Sci* 2011; 81(9): 912-4.
13. Ayaşan T, Asarkaya A, Hızlı H, Gök K, Tekgül A, Karakozak E, Kara U, Seğmenoğlu MS, Çoban S, Mutlu H, Kılıçalp N. The Effect of body condition score on embryo quality of holstein cows. *J Fac Vet Med Univ Kafkas* 2012; 18(1): 91-4.
14. Baracaldo MI, Martinez M, Adams GP, Mapletoft RJ. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology* 2000; 53: 1239-50.
15. Barros CM, Barcelos ACZ, Gouvea LM, Meneghel M, Barcelos DS, Barcelos LN, Trinca LA. Improvement of a superovulatory protocol in Nelore cows: replacing the last two doses of pFSH by eCG. *Reprod Fertil Dev* 2008; 20: 152 (Abstract).
16. Bello NM, Steibel JP, Pursley JR. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2006; 89: 3413-24.
17. Bergfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP. Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology* 1994; 42: 895-907.
18. Bergfelt DR, Bó GA, Mapletoft RJ, Adams GP. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the estrous cycle in cattle. *Anim Reprod Sci* 1997; 49: 1-12.
19. Biancucci A, Sbaragli T, Comin A, Sylla L, Monaci M, Peric T, Stradaoli G. Reducing treatments in cattle superovulation protocols by combining a pituitary extract with a 5% hyaluronan solution: Is it able to diminish activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis compared to the traditional protocol? *Theriogenology* 2016; 85: 914-21.
20. Bó GA, Carballo Guerrero D, Adams GP. Alternative approaches to setting up donor cows for superovulation. *Theriogenology* 2008; 69: 81-7.
21. Bó GA, Pierson RA, Mapletoft RJ. The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Syncro Mate B implants. *Theriogenology* 1991; 36: 169-83.
22. Bó GA, Guerre DC, Tribulo A, Tribulo H, Tribulo R, Rogan D, Mapletoft RJ. New approaches to superovulation in the cow. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22: 106-12.
23. Bó GA, Mapletoft RJ. Recent Advances in The Control of Follicular Development and Superovulation Protocols in Cattle, 28th Annual Meeting A.E.T.E., September, 7-8, 2012; Saint Malo-France.
24. Bó GA, Baruselli P, Chesta P, Martins C. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology* 2006; 65: 89-101.
25. Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 1995; 43: 31-40.
26. Bó GA, Mapletoft RJ. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* 40th Anniversary Special Issue 2014; 81: 38-48.
27. Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 2002; 57: 53-72.
28. Bó GA, Rogan DR, Mapletoft RJ. Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle: What we have learned. *Theriogenology* 2018; 112: 26-33.
29. Bova-Tech Ltd. Web Site, General Information Donors. http://www.bova-tech.com/general_donor_cows.php. Erişim Tarihi: 28 06 2018.
30. Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Bó GA. Effect of eCG pretreatment on superovulatory response in CIDR-B treated beef cattle. *Theriogenology* 2000; 53: 495.
31. Carballo Guerrero D, Tribulo A, Tribulo R, Tribulo H, Bó GA. Superovulatory response in beef donors treated during the first follicular wave or four days after progesterone and estradiol administration. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22: 358.
32. Carballo Guerrero D, Tribulo A, Tribulo R, Tribulo H, Bó GA. Superstimulation in the first follicular wave, without the use of estradiol in bonsmara cattle. *Reprod Fertil Dev* 2008; 20: 294 (Abstract).
33. Dieleman S, Bevers M, Vos P, de Loos F. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. *Theriogenology* 1993; 39: 25-42.

34. Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Bovine Embryo Technologies. *Theriogenology* 2003; 59: 599-616.
35. García GA, Tribulo A, Yapura J, Singh J, Mapletoft RJ. Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology* 2012; 78(2): 353-60.
36. Gonzalez A, Wang H, Carruthers T, Murphy B, Mapletoft R. Increased ovulation rates in PMSG-stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. *Theriogenology* 1994; 41: 1631-42.
37. Hızlı H, Ayaşan T, Gök K, Kara U, Kılıçalp N, Çamlıdağ A, Karakozak E, Seğmenoğlu MS, Mutlu H, Asarkaya A. The determination of relationship between age and the quality of embryo of donor cows. *J Fac Vet Med Univ Kafkas* 2011; 17(3): 493-7.
38. Hızlı H, Ayaşan T, Kılıçalp N, Kara U, Karakozak E, Özcan BD, Gök K, Çamlıdağ A, Çoban S, Mutlu H, Seğmenoğlu MS. The effects of repeated superovulations on the quality of embryo of donor cows and heifers. *J Fac Vet Med Univ YY* 2012; 23(1): 11-4.
39. Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Smith GW, Lonergan P. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod* 2007; 22: 1687-95.
40. Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JLH. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2011; 23: 1-14.
41. Kara U. Östrus senkronizasyonu ve süperovulasyon öncesi gonadotropin uygulamasını takiben kısa süreli ekzojen progesteron verilen ve süperovulasyon uygulanan donörler ile klasik süperovulasyon metodu uygulanan donörlerin elde edilen embriyo sayısı ve kalitesi yönünden karşılaştırılması, Doktora Tezi, Erciyes Üniv Sağ Bil Enst, Kayseri 2018; s.1-124.
42. Kara U, Bekyürek T. The effect of double PGF_{2α} administrations applied to donor before oestrus with synchronized CIDR on the number and quality of obtained embryos during embryo transfer in cattle. *Journal of Health Sciences* 2017; 26(3): 204-10.
43. Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N. *Manual of Bovine Embryo Transfer*. National Livestock Breeding Center MAFF, JICA-Japan. 1995.
44. Kaymaz M. Yardımcı Üreme Teknikleri. Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rışvanlı A, Köker A. eds. In: *Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji*. Malatya: Medipres 2015; ss. 695-811.
45. Lane E, Austin E, Crowe M. Estrus synchronisation in cattle. Current options following the EU regulations restricting use of estrogenic compounds in food-producing animals: a review. *Anim Reprod Sci* 2008; 109: 1-16.
46. Mapletoft R, Bó GA. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2012; 24: 278-83.
47. Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. Recent advances in superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42(6): 601-11.
48. Mapletoft, RJ. Embryo transfer in the cow: general procedures. *Rev Sci Tech off int Epiz* 1985; (4): 843-58.
49. Martinez MF, Adams GP, Bergfelt D. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Anim Reprod Sci* 1999; 57: 23-33.
50. Mihm M, Evans AC. Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: A comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. *Reprod Dom Anim* 2008; 43 (Suppl 2): 48-56.
51. Mikel-Jenson A, Greve T, Madej A, Edqvist L. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF_{2α}-treated cow. *Theriogenology* 1982; 18: 33-4.
52. Monniaux D, Drouilhet L, Rico C, Estienne A, Jarrier P, Touzé JL. Regulation of anti-Mullerian hormone production in domestic animals. *Reprod Fertil Dev* 2013; 25: 1-16.
53. Murphy B, Martinuk S. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Rev* 1991; 12: 27-44.
54. Nabenishi H, Kitahara G, Takagi S, Yamazaki A, Osawa T. Relationship between plasma anti-Müllerian hormone concentrations during the rearing period and subsequent embryo productivity in Japanese black cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 2017; 60: 19-24.
55. Nasser L, Sá Filho M, Reis E, Rezende C, Maple-

- toft R, Bó GA, Baruselli PS. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 2011; 76: 320-7.
56. Nasser L, Adams GP, Bó GA, Mapletoft RJ. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 1993; 40: 713-24.
57. Reano I, Carballo D, Tribulo A, Tribulo P, Balla E, Bó GA. Efecto de la adición de eCG a los tratamientos superovulatorios con Follitropin-V en la producción de embriones de donantes de embriones. In 'Proceedings VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal - IRAC 2009', 2009; 1: 54 (Abstract).
58. Rico C, Drouilhet L, Salvetti P, Dalbiès-Tran R, Jarrier P, Touzé JL, Pillet E, Ponsart C, Fabre S, Monniaux D. Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reprod Fertil Dev* 2012; 24: 932-44.
59. Singh J, Dominguez M, Jaiswal R, Adams GP. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 2004; 62: 227-43.
60. Small JA, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effects of progesterone pre-synchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology* 2009; 71: 698-706.
61. Stoebel DP, Moberg GP. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *J Dairy Sci* 1982; 65: 92-6.
62. Tríbulo A, Rogan D, Tribulo H, Tribulo R, Alasino RV, Beltramo D, Bianco I, Mapletoft R J, Bó GA. Superstimulation in beef cattle with a single intramuscular injection of Follitropin-V. *Anim Reprod Sci* 2011; 129: 7-13.
63. Wiley C, Jahnke M, Redifer C., Gunn PJ, Dohman T. Effects of endogenous progesterone during ovarian follicle superstimulation on embryo quality and quantity in beef cows, *Theriogenology* 2019; 15; 129: 54-60. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.01.024.



Inhalation Anesthesia: Technical Information and Inhalant Anesthetics

Nusret APAYDIN

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

*Corresponding author: Nusret APAYDIN; E-mail: nusretapaydin@gmail.com; ORCID: 0000-0003-0447-1216

How to cite: Apaydin N. Inhalation anesthesia: Technical information and inhalant anesthetics. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(3): 233-237.

Summary: General anesthesia in cats and dogs is the factor that directly affects the quality and comfort of the surgery. Inhalation anesthesia is an anesthetic technique that has been successfully used in veterinary surgery in recent years. Anesthesia complications can be reduced to minimum level with this anesthesia technique. The patient's introduction to anesthesia and recovery time from the anesthesia goes on without any problem. Inhalation anesthesia technique is more successful and advantageous than other techniques. However, equipment and used drugs are not economical. In this review the latest information about the technique of inhalation anesthesia and used drugs to provide general anesthesia in cats and dogs was evaluated.

Key words: Inhalation anesthesia, inhalant anesthetics, technical information

İnhalasyon Anestezisi: Teknik Bilgi ve İnhalant Anestezikler

Özet: Kedi ve köpeklerde genel anestezi; yapılacak olan cerrahinin kalite ve konforunu direk etkileyen faktördür. İnhalasyon anestezisi veteriner cerrahide son yıllarda başarılı bir şekilde kullanılmaya başlanmış bir anestezi tekniğidir. Anesteziye bağlı komplikasyonlar bu anestezi tekniği ile minimum seviyeye düşürülebilmektedir. Hastanın anesteziye girişi ve anesteziden uyanışı sorunsuz bir şekilde olmaktadır. İnhalasyon anestezisi tekniği diğer tekniklere göre daha başarılı ve avantajlıdır. Ancak ekipman ve kullanılan ilaçlar ekonomik değildir. Bu derlemede; kedi ve köpeklerde genel anestezi sağlamak için uygulanan inhalasyon anestezisi tekniği ve kullanılan ilaçlar hakkındaki son bilgiler değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: İnhalant anestezikler, inhalasyon anestezisi, teknik bilgi

Introduction

Inhalation anaesthesia is a popular and reasonably safe technique for providing anaesthesia for surgery and medical diagnostic procedures (7,8). Inhalation anesthesia is one of the anesthesia method which provides general anesthesia. This type of anesthesia is applied easily in all animal species. With inhalation anesthesia, gas anesthetics are given directly to the respiratory system by vaporizer which is mounted to the anesthesia machine. To provide the general anesthesia anesthetic agents should be penetrated to the alveolar epithel, distributed with the blood and reached to the brain (3,5,13).

Inhalation agents produce anaesthesia via their effects in the central nervous system. Depth of anaesthesia depends upon the concentration of the agent in the brain. A better term than concentration would be partial pressure or tension, because these agents are gaseous, and we usually measure their concentration in units of pressure (8,14).

The inhalation and elimination of the anesthetic agents which are used in inhalation anesthesia are

rapid and depth of anesthesia can be controlled. The patient should be monitored during the anesthesia (2,9,12).

Inhalation anesthesia should be particularly preferred for the surgical operations which last more than 60 minutes. Many of the injectable anesthetic agents provide same duration of anesthesia. Anesthesia quality decreases in the case of extension of the anesthesia by additional doses. But with the inhalation anesthesia, because the depth of anesthesia can be controlled these kind of complications are not occurred (1,15,18).

In this anesthesia method, the anesthetic agent is given to the patient by mask or endotracheal intubation (18). For the short duration of surgical operations, the continuance of anesthesia can be provided easily by the inhalation anesthetic agents which are given by mask to the patients who are not intubated (13,15). Inhalation anesthetic agent combined with O₂ are inhaled to the patient by the tubes of inhalation anesthesia machine. In this technique expiration air is not inspired again. Therefore, high rate of gas flow is required. It is the disadvantage of this technique to apply over dose anesthetic agents (4,14,16).

In the technique of endotracheal intubation, endotracheal tubes are used (2,12,15). The anesthetic agent combined with O₂ is administered to the lungs by the endotracheal tube which is connected to the anesthesia machine. In this way, secure and stable anesthesia is provided by less dose of anesthetic agent. Intubation is the placement of endotracheal tubes into the trachea. For this procedure premedication is essential. For induction, short term injectable anesthetic agents are applied (ketamine, propofol, thiopental sodium) (8, 18).

For high dosage of inhalation anesthetic agents the mask technique can be used for induction. With the assistance of a laryngoscope, an endotracheal tube which is correct for the diameter of trachea is passed through the oropharynx, glottis, and larynx into the trachea (13). For possible complications of larynx edema or irritation local anesthetics are applied to the endotracheal tube or larynx (12). Endotracheal tube cuff is inflated by an injector. It should be certain that the tube is placed into the trachea (5). A cervical collar is sometimes used to prevent motion of the airway. Tube placement should be confirmed after each inspiration-expiration movements of the patient. If there is no spontaneous respiration after the pressure to the thoracic cage, motion of the airway can be confirmed. After the intubation endotracheal tube is placed to the anesthesia machine (4,17).

When the anesthesia process is done, vaporizer is closed and O₂ is administered to the system. When the spontaneous respiration of the patient is normal, proximal end of the tube is removed from T-piece of the anesthesia machine. When the recovery from anesthesia begins and glottis reflex occurs the air in the high-pressure cuff is released by an injector and tube is removed from trachea. This is referred to as extubation of the trachea (12,13).

Breathing systems

The circle breathing system is the most common circuit used and is standard equipment on most anesthesia machines. Pediatric, standard adult (small animal), and large animal circuits differ primarily in their internal diameters, rebreathing bag, and overall volume and size of the carbon dioxide absorbent canister. Pediatric and adult circuits have the same size absorbent canister and differ only in the size of the breathing tubes and rebreathing bag used (9).

Nonrebreathing systems have no chemical absorbent and depend on a high fresh-gas flow rate to remove exhaled CO₂ from the breathing system. They are less efficient than the rebreathing system; the oxygen and anesthetic agent are wasted; more anesthetic agent must be scavenged, with a greater potential for environmental contamination; and patient heat and humidity is not conserved, so that patient cooling due

to convective heat loss is greater (8,9).

Ideal inhaled anesthetics

- Should not have an irritating and unpleasant smell.
- Should provide a quick induction and rapid recovery from anesthesia.
- Should provide good analgesia, muscle relaxation, quick changes and easy maintenance of anesthesia for the surgical access.
- Should be secure and provide emergence from anesthesia and should be monitored easily.
- Should cause minimum complications.
- Should not have any toxic effect.
- Biotransformation level of the agent should be low.
- Should be easily and cheaply obtained.
- Should not be explosive.
- Should not be decomposed during retention period.
- Should be used safely with other medications.
- Should dull the reflexes.

According to the researches up till now, it is not mentioned that there is a precisely ideal anesthetic. Therefore, with minimal effect on the cardiovascular and respiratory systems, non-toxic effect of volatile anesthetics should be used. Currently used inhalation anesthetics isoflurane, sevoflurane and desflurane (7,11).

Isoflurane

Isoflurane can be used in all animal species. The blood/gas coefficient is 1.4. Therefore induction, recovery from anesthesia and metabolism of the agent occur quickly. This indicates the minimum toxic effect of isoflurane. Its own vaporizer (Isotec) is used (17). Induction of anesthesia can be achieved by using 2,5 to 4.5 % enflurane in air or in oxygen, and prolonged with 1 to 3 %. To prevent depression of the respiratory system and irritation of the respiratory tract premedication is suggested. In spite of its side effects on respiratory system its prevention on bronchial vasoconstriction is considered as an important advantage. Therefore isoflurane is suggested in patients with bronchospasm (9,19). 0.2 % of isoflurane is metabolized (2). This is considered as an important advantage of isoflurane. Isoflurane does not have any functional or pathological effects on kidneys. Therefore it can be used safely in patients with kidney problems (6,7,11).

The different levels of liver function tests during

anesthesia returns to the reference levels after recovery. Because isoflurane has a minimum effect on liver and hematologic parameters compared with other volatile anesthetics it can be safely used in patients with liver failure (1,2).

Isoflurane does not contain preservatives and is not broken down by sunlight. Isoflurane has a pungent odor and tends to cause breath holding in non-premedicated animals. Depresses cardiovascular (reduction in cardiac output and induces vasodilation) and respiratory (reduces respiratory rate and tidal volume) functions in a dose-dependent manner (3,16,19). Isoflurane is approximately 7-8 times less expensive than sevoflurane (2). The close similarity in vapor pressure between halothane and isoflurane allows isoflurane to be administered in a halothane vaporizer, once the halothane preservative (thymal) has been properly cleaned from the vaporizer (1,17)

Sevoflurane

The blood/gas coefficient is 0.59. Therefore it provides quick induction and recover. Must be used with a vaporizer designed specifically for sevoflurane (Sevotec). When 5% sevoflurane is administered for induction, anesthesia occurs in 2 minutes, and is prolonged with 1 to 4% (7,10,11).

Sevoflurane has a high alveolar concentration which provides a quick equilibrium in the blood and brain. Anesthesia recovery period is quick and calm. Therefore for the long duration of surgical operations sevoflurane is preferred. Sevoflurane is metabolized by the liver microsomal enzymes and the rate is 2%. With isoflurane it is 0.2% (2,8,18).

Sevoflurane has a lower blood gas solubility than isoflurane, resulting in a faster induction of anesthesia, changes in depth of anesthesia, and recovery from anesthesia. Sevoflurane is slightly less depressive on ventilation than isoflurane (14).

The anesthetic index is the apneic inhalant anesthetic concentration divided by the MAC. The anesthetic index of sevoflurane in dogs is 3.45, while the index of isoflurane in dogs is 2.61. This indicates that sevoflurane is less likely to inhibit respiratory function than isoflurane at equal anesthetic concentrations (10).

Sevoflurane has similar cardiovascular sideeffects to isoflurane; both inhalants cause dose-dependent cardiovascular depression. It is less potent than isoflurane and is minimally metabolized by the liver and kidneys. Sevoflurane is more expensive than isoflurane. It may react with desiccated soda lime, causing chemical instability and heat production (2,5).

Desflurane

Desflurane is It requires the use of electrically heated

vaporizers. Desflurane has a very high vapor pressure and therefore requires a special temperature-controlled, pressurized vaporizer to deliver an accurate anesthetic concentration to the patient (7,11).

The temperature-controlled, pressurized vaporizer must be plugged into an electrical outlet to supply exogenous heat to the vaporizer during operation (8).

Because it's blood/gas coefficient is very low (0.42) it provides the quickest induction and recovery. However, the anesthetic effect of desflurane is lower than other volatile agents. This is considered as a disadvantage for surgical operations (13).

Desflurane is the least potent of the modern anesthetic gases (apart from nitrous oxide) with a MAC of 7.2 % in dogs. It has similar cardiovascular effects to isoflurane. Desflurane is limited in the veterinary practise (7).

Anesthetic machine

Basic components of an anesthesia machine include a compressed gas source, pressure-reducing valve (pressure regulator), flowmeter, and vaporizer. Compressed gas sources are oxygen and N₂O. While N₂O commonly is used in human anesthesia, use in veterinary medicine is limited mainly to dogs and cats to spare requirements for the more potent inhalant agents (12).

In addition to liquid bulk tanks for oxygen, sources include large tanks connected by high-pressure, color-coded (green for O₂, blue for N₂O) hose known as DISS (diameter index and safety system) and small tanks which may be connected, via a hanger yolk with a self-contained pressure regulator and pressure gauge, directly to a small animal machine (9).

Pressure regulators reduce the pressure exiting the compressed gas source to a constant and safe pressure of 50-60 psi to provide a constant pressure to the flowmeter. Flowmeters control and indicate the rate of flow of oxygen and N₂O delivered to the common gas outlet or through an out-of-system vaporizer. Gas moves from bottom to top around a float, which indicates flow rate in L (or ml)/min. Most flowmeter floats are cylindrical and read in the middle; alternate-shaped floats are read at the top. Flowmeters are calibrated at 20°C and 760 mmHg. Flow knobs usually are color coded and oxygen flowmeter knobs usually are larger than other knobs on the machine to minimize human error.

Vaporizers deliver a controlled concentration of potent inhalant to the patient breathing system. Currently, the safest vaporizers are out of (breathing) circle (VOC; Figure 5-2), precision, agent specific, concentration calibrated, and variable bypass, which are temperature, flow, and back-pressure compensated. Because vaporizers different than those just

described remain in use in veterinary practice, we provide a brief review of these (8,12).

Paired one-way valves (inspiratory and expiratory), which prevent rebreathing of exhaled gases before they pass through the absorbent canister.

Fresh gas inlet (site of entry of gases from the common gas outlet).

Pop-off (relief) valve, which vents gases to the scavenger system and prevents excessive ressure within the system.

Rebreathing bag, which provides peak demands during inspiration, a mechanism for manually assisting ventilation, and a method for observing spontaneous ventilation.

Pressure manometer, usually attached at absorbent canister and calibrated in cm H₂O to assess pressure achieved during assisted ventilation.

The absorbent canister is filled with either soda lime or barium lime granules (calcium hydroxide is the primary component of both), which neutralize exhaled CO₂. The reaction is exhaustive and produces a change in the granules, including heat generation, soft to hard, and a color change (most often white to violet). As a general rule, absorbent granules should be changed after 6-8 hr of use or when the color reaction is apparent in approximately (12).

Result

The surgery in veterinary medicine is highly developed. Operations using advanced techniques have increased. Therefore, the duration of operation was prolonged and quality anesthesia techniques were preferred. There are many problems in general anesthesia provided by injectable anesthetics. Inhaled anesthesia is a preferred anesthetic technique in veterinary surgery in recent years. Technical information and qualified staff are needed for the anesthesia equipment's using. The anesthetic drugs used in inhalation anesthesia are more expensive than injectable anesthetic drugs. Complications are less common in inhalation anesthesia. Anesthesia and recovery time from anesthesia are very fast and comfortable. As a result, inhalation anesthesia is an ideal anesthetic technique and its use is very widespread. For this reason, many veterinary clinics prefer this anesthesia technique.

Referance

1. Apaydın N, Sarıtaş ZK, Şenel O, Özgencil E, Koç B. Atlarda uzun süreli ve derin halothan anestezisinin hemodinamik parametrelere etkisi. *Vet Cer Derg* 2005; 11: 15-8.
2. Apaydın N, Koç B. Köpeklerde isoflurane ve se-

voflurane anestezisinin hemodinamik ve biyokimyasal parametrelere olan etkilerinin karşılaştırılması. *Vet Cer Derg* 2005; 11: 31-5.

3. Apaydın N, Öztamur İ, Sarıtaş KZ, Dal A, Koç B. Comparison of cardiopulmonary effects of halothane and sevoflurane anaesthesia in racehorses. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2007; 2: 79-84.
4. Apaydın N, Kibar M. Deneysel laparotomi uygulan köpeklerde sevoflurane ve isoflurane anestezisinin kardiyovasküler sistem üzerine etkileri. *Erciyes Üniv Sağ Bil Derg* 2008; 3: 162-7.
5. Apaydın N. İdeal Anestezi? Onikinci Küçük Hayvan Veteriner Hekimleri Derneđi Uluslararası Katılımlı Sürekli Eğitim Kongresi. Kasım, 3-5, 2017; İstanbul-Türkiye.
6. Bustamante R, Aguado D, Cediel R, Gómez de Segura IA, Canfrán S. Clinical comparison of the effects of isoflurane or propofol anaesthesia on mean arterial blood pressure and ventilation in dogs undergoing orthopaedic surgery receiving epidural anaesthesia. *Vet J* 2018; 233: 49-54.
7. Clarke KW. Desflurane and sevoflurane. New volatile anesthetic agents. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1999; 29(3): 793-810.
8. Clarke KW, Trim CM, Hall LW. *Veterinary anaesthesia*. Eleventh Edition. London: Elsevier Ltd 2014; 155-65.
9. Dugdale A. *Veterinary Anaesthesia Principles to Practice*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd 2010; pp. 76-92.
10. Ferguson AJ, Filippich LJ, Keates HL. Delivery of sevoflurane to dogs using a Stephens anaesthetic machine. *Vet Anaesth Analg* 2014; 41(1): 54-63.
11. Granone TD, de Francisco ON, Killos MB, Quandt JE, Mandsager RE, Graham LF. Comparison of three different inhalant anesthetic agents (isoflurane, sevoflurane, desflurane) in red-tailed hawks (*Buteo jamaicensis*). *Vet Anaesth Analg* 2012; 39(1): 29-37.
12. Janyce L. *Veterinary Anesthesia (The Practical veterinarian)*. Massachusetts: Butterworth-Heinemann (Elsevier group), 2001; pp. 73-109.
13. Jeff KC. *Anesthesia and Pain Management in Dogs and Cats*. London: Manson Publishing Ltd 2013; 105-13.
14. Koç B, Sarıtaş KZ. Veteriner anesteziyoloji ve reanimasyon. Malatya: Medipres A.Ş 2004; 101-3.

15. Ünsaldı S. Veteriner Anestezi. İstanbul: Nobel Matbaacılık 2011; 35-40.
16. Sarıtaş KZ, Pamuk K, Apaydın N, Coşkun M, Korkmaz M. Torakotomi yapılan köpeklerde izofloran ve sevofloranın hemodinamik parametrelere olan etkisinin karşılaştırılması. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2006; 1: 79-85.
17. Sarıtaş KZ, Apaydın N, Koç B, Şenel OO, Bilgihan B. Comparison of the effects of isoflurane and halothane anaesthesia on haemodynamic balance in canine thoracic surgery. Kocatepe Vet J 2008; 1: 33-6.
18. Topal A. Veteriner Anestezi. Bursa: Nobel&Güneş Yayınları 2005; ss. 131-47.
19. Williamson AJ, Soares JH, Henao-Guerrero N, Council-Troche RM, Pavlisko ND. Cardiovascular and respiratory effects of two doses of fentanyl in the presence or absence of bradycardia in isoflurane-anesthetized dogs. Vet Anaesth Analg 2018; 45(4): 423-31.



Bir Martıda (*Larus cachinnans*) Türkiye Faunası için İki Yeni Nematod Türü; *Cosmocephalus obvelatus* (Creplin, 1825) ve *Paracuarria adunca* (Creplin, 1846)*

Şinasi UMUR¹, Gökmen Zafer PEKMEZCİ², Cenk Soner BÖLÜKBAŞ¹, Celil ATEŞ¹

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Samsun -TÜRKİYE

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun -TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Şinasi UMUR, E-posta: sumur@omu.edu.tr; ORCID: 0000-0001-9766-2817

Atf yapmak için: Umur Ş, Pekmezci GZ, Bölükbaş CS, Ateş C. Bir martıda (*Larus cachinnans*) Türkiye faunası için iki yeni nematod türü; *Cosmocephalus obvelatus* (Creplin, 1825) ve *Paracuarria adunca* (Creplin, 1846). Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(3): 238-241.

Özet: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına getirilen ölü bir Hazar martısı (*Larus cachinnans*) parazitolojik açıdan tekniğine uygun olarak muayene edilmiştir. Rastlanan parazitler usulüne uygun toplanıp, tespit edilmiş ve saydamlaştırılarak morfolojik özelliklerine göre *Cosmocephalus obvelatus* ve *Paracuarria adunca* olarak tanımlanmıştır. Tanıda önemli bölgelerin ölçümleri yapılmış ve fotoğrafları çekilmiştir. Her iki nematod türü de Türkiye parazit faunası için ilk bildirimdir.

Anahtar kelimeler: *Cosmocephalus obvelatus*, *Larus cachinnans*, martı, nematod, *Paracuarria adunca*,

Two New Nematode Species for Turkey Fauna in a Seagull (*Larus cachinnans*); *Cosmocephalus obvelatus* (Creplin, 1825), and *Paracuarria adunca* (Creplin, 1846) *

Summary: A dead Caspian gull (*Larus cachinnans*) submitted to the parasitology laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine in Ondokuz Mayıs University was examined in accordance with the standard techniques in the laboratory. The parasites were fixed, clarified and identified as *Cosmocephalus obvelatus* and *Paracuarria adunca* according to morphological characteristics. Some specific morphological characters were measured and photographed by microscopically. To our knowledge, both nematode species are the first record for parasite fauna in Turkey.

Key words: *Cosmocephalus obvelatus*, *Larus cachinnans*, nematod, *Paracuarria adunca*, Seagull

Giriş

Hazar (Karadeniz) martısı (*Larus cachinnans* Pallas, 1811) martıgiller (Laridae) familyasından 55-67 cm boyunda deniz kıyılarında yaşayan iri bir martı türüdür. Bu tür Karadeniz, Akdeniz ve Hazar denizi sahillerinde yaygın olup Polonya'dan Çin'e kadar geniş bir dağılım gösterir. Martılar, zeki ve cesur hayvanlar olup insanların yerleşim alanlarına yakın yerlerde yaşarlar, besinlerini yumuşakça, yengeç ve küçük balıklar oluştursa da her şeyi yiyebilirler. Dolayısıyla sucul canlılar ile su kaynaklı birçok parazite ev sahipliği yapmaktadırlar.

Türkiye'de 12 martı türü olmasına karşın, kayıtlara göre martı parazitleri ile ilgili tek bir çalışma mevcuttur. İlgili çalışma (7) Van yöresinde dışkı bakışıyla yapılmış olup martılara ait parazit faunası ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ancak dünyada yapılan çalışmalarda martıların yüzlerce parazite ev sahipliği yaptığı bilinmektedir (11,13). Bu makalenin amacı, Türkiye faunası için yeni kayıt olan iki nematod türü-

nün Türkiye'nin biyolojik varlıkları olarak literatüre kazandırılmasıdır.

Olgu tanımı

Samsun Karadeniz sahilinde bulunan ölü bir Hazar martısı (*L. cachinnans*), 2015 yılı Nisan ayında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi parazitoloji laboratuvarına getirilmiş, laboratuvarında ekto ve endo parazit açısından tekniğine uygun olarak muayene edilmiştir. Rastlanan parazitler usulüne uygun toplanıp, tespit edilmiş ve saydamlaştırılarak tanımlanmıştır (1,3,4,10,15).

Martının ölümü üzerinden bir günden fazla zaman geçtiği için ektoparazite rastlanmamış, sindirim sisteminden Acuaridae ailesinde yer alan ve ülkemizde daha önce bildirilmemiş olan *Cosmocephalus obvelatus* (iki erkek) ve *Paracuarria adunca* (dokuz erkek, altı dişi) olmak üzere iki yeni nematod türü saptanmıştır (Şekil 1, 2).

Tartışma ve Sonuç

Acuariidae ailesi çok geniş bir aile olup 40 cinsten yer alan ve çoğu kanatlılarda parazitlenen yaklaşık 300 tür içerir. Cinslerin ayrımı ve sınıflandırılmasında vücudun ön bölümünde bulunan kütiküler kordonların

Geliş Tarihi/Submission Date : 15.04.2019

Kabul Tarihi/Accepted Date : 24.06.2019

*19. Ulusal Parazitoloji Kongresinde (5-9 Ekim 2015, Erzurum) poster bildiri olarak sunulmuştur.

yapısı ve şekli (uzun, kısa, sürekli, kesintili olması) önemli rol oynar (1).

Bu aileden ülkemizde kanatlılarda *Acuaria hamulosa* (6,9), *Dyspharinyx nasuta* (Gıcık, 1997), *Echinuria uncinata*, *Streptocara crassicauda* (9) ve *Synhimantus laticeps* (14) olmak üzere beş tür kaydedilmiştir.

Paracuaria cinsinin özelliği, ağız kenarında, her iki tarafta ikişer olmak üzere, kısa, parmak şeklinde, rudimenter 4 kordon olmasıdır (2,12). Bu nedenle primitif Acuarid cins olarak kabul edilir. Ancak bu yapılar derin gömüldüğü için ışık mikroskopunda görmek çok zordur, ancak filogenik olarak Acauariene grubunda olduğu kanıtlanmıştır. *Paracuria* cinsinde geçerli iki tür olup bunlar *P. adunca* ve *P. hispanica*'dır (1). *Paracuaria adunca* cinsin tip türü olup Asya, Avrupa ve Amerika'da balıkçıl kuşlarda, *P. hispanica* ise küçük memelilerde parazitlenir (4).

Martıda bulduğumuz *P. adunca* erkekleri 9.15 mm uzunlukta ve 128.5 µm genişliktedir. Ağız kapsülü uzunca, özefagus çok uzun, ön kassal ve arka bezsel olarak iki kısma ayrılır. Ucu üç çatalı olan servikal papilin (deirid) ön uca uzaklığı 195.0 µm olup bundan yaklaşık 20 µm önde sinir halkası yer almaktadır. Erkeklerde 9-10 çift kaudal papil bulunmakta olup, bunların dördü preanal, beşi post analdır. Bazı papiller, pedunkul (saplı) şeklinde olup bunların uzunluğu 28-30 µm'ye ulaşır (Şekil 1.A,B,C). Spikülümleri eşit olmayıp sağ spikülüm kısa (118.4 µm), baş kısmı kalın yapılı ve yaklaşık 29.3 µm çapındadır. Sol spikülüm ise ince ve diğerinin yaklaşık dört katı uzunlukta (466.1 µm) olup uç kısmı kıvrık, zıpkın ucuna benzer (Şekil 1.C).

Dişileri daha büyük olup 17.3 mm uzunlukta ve vücut ortasında 231.5 µm kalınlıktadır. Ağız kapsülü erkeklerle yakın büyüklükte ve 154.6 µm uzunlukta. Muskuler özefagus 0.1 mm, glanduler özefagus ise 1.96



Şekil 1. *P. adunca*, A) Erkek, ön uç, B) Erkek, servikal papil, C) Erkek, arka uç, D) Dişi, arka uç, E-F) Uterustaki yumurtalar (Ölçü, 50 µm)

mm uzunlukta ölçülmüştür. Servikal papilin ön uca uzaklığı 202.3 µm olarak saptanmıştır. Vulva ortadan sonra yer alır ve arka uca uzaklığı 7.76 (7.5-8.0) mm, anüs arka uca yakın yer alır ve kuyruk uzunluğu 182 (176-192) µm'dir. Uterustaki yumurtalar 37.8 x 18.8

µm çapında ölçülmüştür (Şekil 1). Tablo 1 de dişi ve erkek parazite ait bazı morfolojik bölgelerin karşılaştırılmalı ölçüleri verilmiştir.

Tabloda görüldüğü üzere araştırmacı ve martı türüne göre (4,15) parazitin çeşitli ölçüleri arasında bazı küçük farklar bulunmaktadır. Bunun nedeni martı türlerinin büyüklüklerinin farklı olmasına ve parazitlerdeki bireysel farklılıklara bağlanabilir. Çünkü birçok parazit türünün büyüklüğü ile konak büyüklüğü arasında doğru orantı bulunmaktadır.

Cosmocephalus türleri balık yiyen kuşların özefagus, kursak ve midelerinde parazitlenen, balıkları arakonak olarak kullanan orta boy nematodlardır. Bu cinste geçerli yedi tür olsa da, en yaygın ve bilineni *C. obvelatus*



Şekil 2. *C. obvelatus*, Erkek, A) Ön uç, B) Servikal papil, C) Arka uç, (Ölçü 100 µm)

latus'dur (8). Parazitin ön ucunda dorsal ve ventral olarak yerleşmiş, birbiriyle anastomoz yapan, devamlı seyreden enine çizgili ve iç kısımları dantela gibi olan iki çift kütiküler kordon vardır. Deirid büyük olup ucu iki çatalı olup bunun hafif gerisinde, lateralde boşaltım deliği yer alır. Erkeklerin arka ucu kıvrık olup kaudal kanat ile dört çift preanal ve beş çift postanal papile sahiptir. Spikülümleri eşit değildir (3,8,10).

Bulduğumuz erkekler 11.1 (10.5-11.7) mm uzunlukta ve 275 (270-280) µm kalınlıktadır. Dış kütiküler kordonların uzunluğu 362.5 (340-385) µm, iç kütiküler kordonların uzunluğu ise 257.6 (240-275) µm olarak ölçülmüştür. Deiridin ön uca uzaklığı 435 (420-450) µm, sinir düğümünün ön uca uzaklığı 420 (415-425) µm, boşaltım deliğinin ön uca uzaklığı 540 (530-550),

ağız kapsülü 390 (380-400) µm'dir. Özofagus çok uzun olup toplam uzunluğu 4.07 (4.55-4.79) mm'ye ulaşır. Bunun 1.01 (1.0-1.02) mm kassal, geriye kalan 3.66 (3.55-3.77) mm'lik kısmı ise bezsel özofagustan oluşur. Muskuler özofagusun son kısmında kalınlık

Tablo 1. *P. adunca*'nın bazı morfolojik karakterlerinin karşılaştırılması

| | <i>L. dominicanus</i> Ort. (Min.-Max.) (Diaz ve ark., 2004). | <i>L. delaverensis</i> Ort. (Min.-Max.) (Wong, ve Anderson, 1982) | <i>L. cachinnas</i> Ort. (Min.-Max.) (Bu çalışma) |
|-----------------------------------|--|--|---|
| Erkek (n:9) | | | |
| Toplam uzunluk, mm, | 6.38 (5.3-7.2) | 7.8 (5.8-8.8) | 9.15 (8.25-9.88) |
| Maksimum genişlik, µm | 118 (102-149) | 114 (100-140) | 128.5 (110-141) |
| Ağız kapsülü, µm | 119 (105-140) | 165 (130-190) | 153.4 (135-170) |
| Sinir halkası, ön uca uzaklık, µm | 130 (118-148) | 195 (170-230) | 172 (160-190) |
| Deiridlerin ön uca uzaklığı, µm | 116 (86-146) | 210 (180-230) | 195.0 (180-205) |
| Boşaltım deliği, µm | 160 (122-208) | 254 (220-270) | 420 (415-425) |
| Kassal özefagus, mm | 0.63 (0.42-0.75) | 0.8 (0.6-1.1) | 1.010 (1.0-1.02) |
| Bezsel özefagus, mm | 1.45 (1.24-1.92) | 1.8 (1.4-1.9) | 3.66 (3.55-3.77) |
| Bezsel/kassal özefagus oranı | 2.3 | 2.2 | 2.26 |
| Sağ spikülüm, µm | 107 (92-125) | 137 (120-150) | 118.4 (111-145) |
| Sol spikülüm, µm | 371 (308-448) | 484 (420-500) | 466.1 (428-500) |
| Dişi (n:6) | | | |
| Toplam uzunluk, mm | 13.21 (8.06-16.7) | 13.7 (11-17.6) | 17.35 (15.0-19.5) |
| Kalınlık, vücut ortası, µm | 190 (150-234) | 186 (130-230) | 231.5 (220.0-252.5) |
| Kassal özefagus, mm | 0.629 (0.42-0.75) | 0.8 (0.6-1.1) | 0.995 (0.99-1.05) |
| Bezsel özefagus, mm | 1.45 (1.24-1.92) | 1.8 (1.4-1.9) | 1.95 (1.70-2.30) |
| Bezsel/kassal özefagus oranı | 2.03 | 2.0 | 1.96 |
| Deiridlerin ön uca uzaklığı, µm | 135 (100-200) | 245 (185-275) | 202.3 (188-225) |
| Boşaltım deliği, ön uca uzaklık | 185 (140-260) | 284 (270-307) | 289 (280-310) |
| Yumurta uzunluk, µm | 37 (33-40) | 41 (39-42) | 37.8 (35-40) |
| Yumurta genişlik, µm | 19 (17-21) | 22 (20-25) | 18.8 (17.5-20.0) |
| Kuyruk, µm | 127 (100-145) | 136 (100-150) | 182 (176-192) |

175 (170-180) µm iken, bezsel özofagusun son kısmı daha kalın olup 205 (165-245) µm kadardır. Spikülümleri eşit olmayıp kısa olan sağdaki 150 (145-155) µm, soldaki ise 530 (490-570) µm ölçülmüştür (Şekil 2). Örnek sayısı az ve sadece iki erkek parazit olmakla birlikte, morfolojik ölçüm sonuçları literatür verileriyle (8,10) uyum göstermiştir.

Türkiye'de martı parazitlerine ilişkin tek bir çalışma (7) mevcut olup dışkı bakışıyla Van yöresinde yapılmıştır. Bu çalışmada incelenen martıların %49.41'inin *Echinostoma revolutum* ve %19.41'inin *Capillaria* spp. ile enfekte olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla martıda saptadığımız *P. adunca* ve *C. obvelatus* türleri Türkiye için ilk kayıt olmaktadır.

Sonuç olarak, Türkiye'nin üç kıtanın ortasında ve kuşların göç yolları üzerinde yer alması yanında Samsun'da Kızılırmak ve Yeşilirmak deltaları, göçmen kuşlar için önemli üreme alanlarıdır. Dolayısıyla yabani hayvanlarda yapılan çalışmalarda Türkiye parazit faunası için yeni türlere rastlanmaktadır. Bu nedenle Türkiye parazit faunasının belirlenmesi için, yaban hayvanları başta olmak üzere, daha çok araştırma yapılması gereklidir.

Kaynaklar

1. Alvarez F, Gijon-Botella H, Quinteiro P, Rey J, Lopez-Roman F, Sanmartin ML. *Paracuaria hispanica* n. sp. (Nematoda: Acuariidae), a stomach parasite of the pyrenean desman *Galemys pyrenaicus* Geoffr. (Insectivora: Talpidae), with a re-definition of the genus *Paracuaria* Rao, 1951. Syst Parasitol 1994; 29 (2): 105-12.
2. Anderson RC, Wong PL. The transmission and development of *Paracuaria adunca* (Creplin, 1846) (Nematoda: Acuarioidea) of gulls (Laridae). Can J Zool 1982; 60 (12): 3092-104.
3. Azuma H, Okamoto M, Ohbayashi M, Nishine Y, Mukai T. *Cosmocephalus obvelatus* (Creplin, 1825) (Nematoda: Acuariidae) collected from the esophagus of Rockchopper penguin, *Eudyptes crestatus*. Jpn J Vet Res 1998; 36(1): 73-7.
4. Diaz JI, Cremona F, Navone GT. First record of the Acuarioid nematode *Paracuaria adunca* from South America, with new morphological details and discussion of cordons. Comp Parasitol 2004; 71(2): 238-42.
5. Gıcık Y. Yabani bir güvercinde (*Columba livia*) *Dispharynx nasuta* (Rudolphi, 1819) olgusu. An-

- kara Univ Vet Fak Derg 1997; 44(1-3): 93-5.
6. Güçlü F. Ankara civarında tavuk, hindi, ördek ve kazlarda helmint faunası. Doktora Tezi, Ankara Üniv Sağlık Bilim Enst, Ankara 1992; s.33-7.
 7. Kılınç Ö, Çiçek M, Akkaş Ö. Van Gölü çevresinde yaşayan gümüşi martı (*Larus michahellis*) dışkılarının helmintolojik yönden incelenmesi. YYU Vet Fak Derg 2011; 22(2): 101-3.
 8. Kim SM, Park BK, Jung BD, Kim HC. First record of *Cosmocephalus obvelatus* (Acuariidae) in common gulls (*Larus canus*) from Gangneung, Korea. Korean J Parasitol 2015; 53(1): 101-4.
 9. Merdivenci A. Türkiye'nin Marmara Bölgesinde Evcil Tavuk, Hindi, Ördek ve Kazlarda Görülen Trematod, Sestod ve Nematodlara Dair Araştırmalar. İstanbul: Kutulmuş Matbaası, 1967; s.74-80.
 10. Mutafovchiev Y, Halajian A, Georgiev BB. Two new nematode species of the genus *Cosmocephalus* Molin, 1858 (Spirurida: Acuariidae), with an amended generic diagnosis and an identification key to *Cosmocephalus* spp. Zootaxa 2010; 2349: 1-20.
 11. Parejo SH, Martinez-Carrasco M, Diaz JI, Chitimia L, Ortiz J, Mayo E, de Ybanez RR. Parasitic fauna of a yellow-legged gull colony in the island of Escombreras (South-eastern Mediterranean) in close proximity to a landfill site: potential effects on cohabiting species. Acta Parasitol 2015; 60(2): 290-7.
 12. Rao NSK. *Paracuaria macdonaldi* n.g., n.sp. (Family Acuariidae, Subfamily Acuariinae) from the sea gull (*Larus argentatus*). Can J Zool 1951; 29(3): 167-72.
 13. Santoro M, Mattiucci S, Kinsella JM, Aznar FJ, Giordano D, Castagna F, Pellegrino F, Nascetti G. Helminth community structure of the Mediterranean Gull (*Ichthyophaga melanocephalus*) in Southern Italy. J Parasitol 2011; 97(2): 364-6.
 14. Umur Ş, Beyhan YE, Pekmezci GZ, Açıcı M, Gürler AT. First record of *Synhimantus* (*S.*) *laticeps* (Rudolphi, 1819) Railliet, Henry et Sisoff, 1912 (Nematoda, Acuariidae) in *Accipiter nisus* (Aves, Accipitridae) in Turkey. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2010; 57(2): 139-42.
 15. Wong PL, Anderson RC (1982). Redescription of *Paracuaria adunca* (Creplin, 1846) (Nematoda: Acuarioidea) from *Larus delawarensis* Ord (Laridae). Can J Zool 1982; 60(2): 175-9.

Yazım Kuralları

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

Instructions to Authors

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

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

Makale Türü/ Article Type:

.../.../20..

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

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

Makale Başlığı/Article

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

Sayın Editör,

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

Dear Editor,

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

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

Yazar/ Yazarların Adı

Author's/Authors' Printed Name

1).....İmza/Signature:.....

2).....İmza/Signature:.....

3).....İmza/Signature:.....

4).....İmza/Signature:.....

5).....İmza/Signature:.....

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

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

SON KONTROL LİSTESİ

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

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

FINAL CHECKLIST

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

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