

30165

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FERMENTE TÜRK SUCUKLARINDA
ET ORJİNİNİN ELISA İLE BELİRLENMESİ**

Ufuk KAMBER
Araştırma Görevlisi

DOKTORA TEZİ

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ergün ÖZALP
T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ
1993-ANKARA

ANKARA ÜNİVERSİTESİ ARAŞTIRMA FONU
Proje No:90.30.00.23

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİ	3
2.1. Et türlerinin orjinlerinin belirlenmesinin önemi	3
2.2. Et türlerinin belirlenmesinde kullanılan metodlar	4
2.2.1. Organoleptik niteliklerine göre.....	5
2.2.2. Anatomik özelliklerine göre:.....	5
2.2.3. Histolojik yapılarına göre.....	6
2.2.4. Yağ özelliklerine göre	6
2.2.5. Proteine dayalı metodlar	7
2.2.5.1. Kromatografik metodlar	7
2.2.5.2. Elektroforetik metodlar	7
2.2.6. İmmunolojik metodlar	8
2.2.6.1. Presipitan halka metodu	13
2.2.6.2. Agar jel immundiffuzyon metodu	13
2.2.6.3. İmmunelektroforez metodu	13
2.2.6.4. ELISA teknikleri.....	14
2.2.6.4.1. Kompetatif direkt ELISA	19
2.2.6.4.2. Kompetatif indirekt ELISA	20
2.3. ELISA tekniğinde kullanılan malzemeler	21
2.3.1. Solid faz	21
2.3.2. Antijenler	21
2.3.3. Antikorlar	22
2.3.4. Konjugat	22
2.3.5. Substrat	22

2.3.6.	Yıkama basamakları.....	23
2.3.7.	Durdurucu reaktif.....	23
2.4.	Affinite kromatografi	24
2.4.1.	Affinite kromatografide kullanılan malzemeler	25
2.4.1.1.	Fraksiyon kollektör.....	25
2.4.1.2.	Peristaltik pompa	26
2.4.1.3.	Rekorder.....	26
2.4.1.4.	UV Monitör.....	26
2.4.1.5.	Kolonlar	26
2.4.1.6.	Sefaroz	27
3.	MATERYAL VE METOT	31
3.1.	Deneysel sucuk numunelerinin yapılması.....	31
3.2.	Antiserumların elde edilmesi	33
3.3.	Antikor titrelerinin ölçülmesi	34
3.4.	Türe özgü antiserumların elde edilmesi.....	35
3.4.1.	İmmunoadsorbant jel süspanسیونlarının hazırlanması	35
3.4.2.	Kolonların doldurulması.....	38
3.4.3.	Antiserumların saflaştırılması	39
3.4.4.	Monospesifik antikor titrelerinin ölçülmesi	42
3.5.	Numune ekstraktlarının hazırlanması	46
3.6.	İndirekt kompetatif ELISA testi.....	46
3.7.	Monospesifik antikorların titrelerinin indirekt ELISA ile saptanması	50
4.	BULGULAR	54
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	69
6.	ÖZET	74
7.	ALMANCA ÖZET (ZUSAMMENFASSUNG)	75
8.	KAYNAKLAR	76
9.	TEŞEKKÜR	90
7.	ÖZGEÇMİŞ	91
EK-1	84

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil-2.1. :	Antijen molekülünün yapısı9
Şekil-2.2. :	İmmunglobulin molekülünün yapısı 10
Şekil-2.3. :	Komperatif direkt ELISA..... 19
Şekil-2.4. :	Komperatif indirekt ELISA.....20
Şekil-2.5. :	Affinite kromatografinin prensibi25
Şekil-2.6. :	Agar jelin yapısı27
Şekil-3.1. :	Serum dilusyonlarının hazırlanması35
Şekil-3.2. :	Affinite kromatografide kolon düzeneği40
Şekil-3.3. :	İndirekt kompetatif ELISA ile etlerin identifikasyon metodu49
Şekil-3.4. :	Monospesifik antiserum titrelerinin ölçüm şeması50
Şekil-3.5. :	Monospesifik antiserum titrelerinin indirekt ELISA ile belirlenmesi52

GRAFİK LİSTESİ

	Sayfa
Grafik-3.1. : Serumun kromatografide ayrıştırılması sırasında elde edilen pikler	41
Grafik-4.1. : Nonspesifik reaksiyonları önlemek amacıyla kullanılan PBST,% 0,1 jelatin ve YSP de okunan optik dansite değerleri	56
Grafik-4.2. : Domuz antikoru ile at ve sığır etleri arasındaki kross reaksiyon	56
Grafik-4.3. : At antikoru ile domuz ve sığır etleri arasındaki kross reaksiyon	56
Grafik-4.4. : Domuz 1. yapıma ait örnekler ve standartlarda okunan optik dansite değerlerinin eğrileri.....	64
Grafik-4.5. : Domuz 2. yapıma ait örnekler ve standartlarda okunan optik dansite değerlerinin eğrileri.....	65
Grafik-4.6. : At 1. yapıma ait örnekler ve standartlarda okunan optik dansite değerlerinin eğrileri.....	66
Grafik-4.7. : At 2. yapıma ait örnekler ve standartlarda okunan optik dansite değerlerinin eğrileri.....	67

TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo-3.1. : Antiserumların antikor titreleri.....	36
Tablo-4.1. : Standart at ve domuz antiijenlerinde okunan optik dansite değerleri.....	58
Tablo-4.2. : Örneklerdeki dilusyonların standart grafiğine göre okunabilirlikleri	55
Tablo-4.3. : Standart eğrilerin $Y = a+bx$ doğru formülü ile hesaplanmasından sonraki optik dansite değerleri	60
Tablo-4.4. : Standartların doğru grafiklerinin hesaplanmasında elde edilen a ve b katsayı değerleri.....	62
Tablo-4.5. : Örneklerde hesaplanan karışım miktarları, standart sapmaları ve beklenen miktarlar arasında yapılan 't' değeri sonuçları.....	68
Tablo-Ek1. : Domuz ve at eti karıştırılmış sucuk örneklerinde okunan optik dansite değerleri, hesaplanan 'x' değeri logaritmaları, antilogaritmaları ve sulandırma katsayısı çarpımı ile elde edilen mg karışım miktarları	84

RESİM LİSTESİ

	Sayfa
Resim-2.1. : Fraksiyon kollektör	29
Resim-2.2. : Peristaltik pompa.....	29
Resim-2.3. : Rekorder	30
Resim-2.4. : UV Monitör	30
Resim-3.1. : Jelin vakum altında yıkanma şekli	43
Resim-3.2. : Fraksiyon kollektör, UV monitör, rekorderin kuruluş şekli	43
Resim-3.3. : Jel doldurulmuş kolon.....	44
Resim-3.4. : Affinite kromatografide kolon düzeneği.....	44
Resim-3.5. : Antiserumun diğer hayvanların antiijenlerini içeren kolonlardan geçirilmesi.....	45
Resim-3.6. : Antiserumun kendi antiijenini içeren kolonlardan geçirilmesi.....	45
Resim-3.7. : Mikroplakaların yıkanması.....	53
Resim-3.8. : ELISA okuyucusu	53
Resim-4.1. : ELISA plakalarında yabancı etin varlığında görülen renk değişiklikleri	59

1.GİRİŞ

Nüfusun aşırı artması, hızlı kentleşme, ekonomideki istikrarsızlıklar, tarım kesiminde çalışanların azalması gibi etmenler dünyada hayvansal protein açığının büyük ölçüde artmasına neden olmuştur. Bunun sonucunda da toplumun gelir düzeyi düşük kesimlerinin yetersiz ve dengesiz beslenmesi büyük boyutlara ulaşmıştır.

Gıda üretiminin yetersiz kalması protein kalitesi yüksek gıdaların pahalılaşmasına yol açmış, bundan dolayı da dar gelirli toplum kesimi, ucuz ve kalitesi düşük et tüketmeye itilmişlerdir. İşte bu gerçeğin bilincinde olan bazı gıda üreticileri, durumdan yararlanarak yasal olarak tüketilmeleri yasaklanan ucuz hayvan etlerini, kaliteli et ürünlerine karıştırarak veya doğrudan karıştırmadan satmaya başlamışlardır (17,42,73).

Et ve ürünlerinin, kötü kaliteli ucuz etler kullanılarak hileli üretimleri eskiden olduğu gibi günümüzde de çoğu ülkede gıda kontrol hizmetlerini zorlaştıran ve halk sağlığını tehdit eden en önemli sorunlardan birisidir (31). Ülkemizde de boyutları belli olmamakla birlikte yabancı hayvan etlerinin et ürünlerine katılması sorunuyla karşılaşmaktadır. Gıda analizlerinde ender de olsa daha çok tek tırnaklı hayvan etlerinin et ürünlerinde kullanıldığı tesbit edilmektedir. Yine yakın tarihlerde belediye ekipleri tarafından çöplüklerde kedi ve köpek iç organ ve artıklarının bulunması, ayrıca piyasada yabani domuz etlerinin yakalanması, zaman zaman bu hayvan etlerinin de tüketime sunulduğu düşüncesini ortaya koymaktadır.

Et endüstrisinde belirtilen hileli uygulamaların net şekilde saptanmasında uygulanabilecek duyarlı yöntemlerin bulunmaması nedeniyle bu sorunun daha ciddi boyutlara ulaştığı da bildirilmektedir (56,61).

Ancak son yıllarda et türlerinin ayrımı, geliştirilen elektroforetik yöntemlerle (40) ve ELISA teknikleri ile (42,60,74) daha duyarlı ve pratik olarak yapılmaktadır. Ülkemizde bu konuda yeterince araştırma yapılmadığı ve yapılan çalışmaların ise klasik immunolojik metodlarla (10,15,17) sınırlı kaldığı görülmüştür.

Ülkemizde üretilen toplam 240 bin ton büyük baş hayvan etinin (8) yaklaşık 22 bin tonunun sucuğa işlendiği tahmin edilmektedir(6,19). Et ürünlerimiz içerisinde en fazla üretim payına sahip olan bu ürünün parasal değeri ise günümüz fiyatlarına göre yaklaşık 1 trilyon TL dir. Bu araştırma, gelişmiş ülkelerde son yıllarda yaygın olarak kullanılan ELISA ile sığır etinden yapılması gereken fermente sucuklarda at ve domuz etinin varlığını belirleyebilecek yöntemi geliştirmek amacıyla yürütülmüştür.

2.LİTERATÜR BİLGİ

2.1.Et Tür Orjinlerinin Belirlenmesinin Önemi

Ülkelerin çoğunda et ürünlerinin hangi hayvan etlerinden yapıldıklarının etiketlerinde belirtilmesi yasal zorunluluktur. Bunun gıdaların hijyenik kontrolleri içinde önemli bir yeri vardır. Ülkemizde de et ürünlerinin yapımında kullanılan etlerin tür isimlerinin etiketlerinde belirtilmesi Gıda Maddeleri Tüzüğü'nün 137. maddesine göre zorunlu kılınmıştır. Üreticiler tarafından daha fazla kâr amacıyla, değişik etiketler altında başka türe ait etlerin satılması Gıda Maddeleri Tüzüğünce "Taklit ve Tağşiş" kapsamında yer almıştır. Kimi üretici kişi ve kuruluşlar, ticari kazanç sağlamak için kötü kaliteli etleri kaliteli etler olarak doğrudan veya diğer et ürünlerinin yapımında kullanarak hileli satışlara başvurmaktadırlar. Bunun sonucunda tüketicilerin hem ekonomik yönden zarara uğramalarına hem de sağlık yönünden çeşitli sorunlarla karşılaşmalarına neden olmaktadır. Bununla birlikte et ve et ürünlerinde identifikasyonunun yapılmaması aşağıda belirtilen şu sorunları da beraberinde getirmektedir (2,17,28,42).

1- Eti yenen ve yenmeyen hayvanların bilinçsizce avlanarak ticaretlerinin yapılması sonucu yabani hayvan türlerinin yok olması, dolayısıyla ekolojik dengenin bozulması;

2- Kaçak olarak kesilen çeşitli hayvan türlerine ait etlerin kontrollerinin yapılmaması nedeniyle zoonoz enfeksiyonların artması; örneğin ruam ile kuduzun yayılması gibi.

3- Et endüstrisinin gelişmesiyle orantılı olarak dış ticarete, hileli et ve ürünlerinin satışlarının artması; örneğin Almanya'nın, Avustralya'dan ithal ettiği etlerde kanguru etinin çıkması (21).

4- Farklı et ve ürünlerin ithali vasıtasıyla değişik enfeksiyonların ülkemize girmesine neden olması;

5- Kalitesiz düşük ve ucuz hayvan etlerinin yüksek kaliteli etler olarak satılmalarından dolayı tüketicinin aldatılması;

6- İnsanların dini, etnik kaynaklı düşünce değerlerinin hiçe sayılarak başka orjinli hayvan etlerinin yedirilmeye zorlanması;

7- Çeşitli hayvan etlerinin bazı insanlarda allerjik reaksiyonlara neden olması.

Yukarıda bildirilen sorunları önlemek ancak etlerin orjinlerinin saptanmasıyla gerçekleştirilir. Bunun içinde bu sorunun çözümü yönünde daha duyarlı yöntemlere gereksinim vardır.

2.2. Et Türlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Metodlar

Etlerin türlerine göre ayrımı oldukça eski bir sorundur. Et endüstrisinin bu önemli sorununun çözümü için 19. yüzyılın başlangıcından günümüze dek yoğun araştırmalar yapılmış ve bunların sonucunda da çok sayıda çeşitli metodlar geliştirilmiştir.

Bu konuda ilk kez 1900 yılında Uhlenhut tarafından immunolojik metodlar üzerinde çalışmalar yapılmış ve genetik bakımdan birbirlerinden farklı hayvanlara ait çiğ etlerin ayırt edilebildiklerini, buna karşılık genetik bakımdan yakın olan hayvan türlerine ait etlerin çiğ de olsalar benzer antijenik niteliklere sahip olmalarından dolayı belirlenemediğini bildirilmiştir. Uhlenhut ayrıca ısı işlemine tabi tutulmuş et ve et ürünlerinde antijenik niteliklerin kaybolmasından ötürü ayırt edilemeyeceklerini bildirmiştir. Nitekim Uhlenhut'tan sonra aynı yöntemleri kullanarak araştırma yapan Griebel ve Montari'de genetik olarak yakın tür etlerinin tam olarak ayrılamadıklarını bildirmişlerdir (17,43).

Et ve et ürünlerine katılan yabancı etlerin, ısı işlemleri uygulanması ve genetik yakınlık gibi nedenlerden ötürü tam olarak ayırt edilememesi, bu sorunun çözümünde çeşitli prensiplere dayanan yöntemlerin geliştirilmesine yol açmıştır. Thompson 1960'lı yıllarda elektroforez ile, Payne 1963'te Polyacrylamid jel ile ve Kaiser 1980'li yıllarda İzoelektrik odaklama metodu ile bazı hayvan etlerini birbirlerinden ayırmışlardır (40,47). Bu metodlar serolojik metotlardan daha net sonuçlar vermesine karşın pahalı, uzun zaman alıcı, yeteri kadar duyarlı olmamaları ve ayrıca birden fazla et karışımlarında sonuç vermedikleri için rutin analizlerde kullanımları sınırlı kalmıştır (37,42,66,74). Bunun üzerine sorunun çözülmesi için araştırmalar son yıllarda daha da duyarlı, hızlı ve ekonomik yöntemlerin geliştirilmesi yönünde yoğunlaşmıştır. Bu çalışmaların sonucunda geliştirilen immunokimyasal teknikler hızlı, duyarlı ve spesifik olmaları nedeniyle rutin analizlerde daha çok kullanım alanı bulmuşlardır. Bu tekniklerin başlıcaları klasik Ouchterlony double İmmundiffüzyon (AGİD) ve Enzim Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemleridir.

Et türlerinin belirlenmesinde şimdiye kadar şu metodlar uygulanmıştır (33,63).

2.2.1. Organoleptik niteliklerine göre

Etler, karkas veya büyük parçalar halinde iken görünüş, renk ve koku gibi bazı nitelikleri ile birbirlerinden ayırt edilebilirler (13,63) . Fakat bu değerlerin subjektif karakterli olması, beslenmeye ve bireysel faktörlere göre değişmesi, parçalanmış et ürünlerine uygulanamaması (63) etlerin organoleptik niteliklerle ayrımını mümkün kılmamaktadır.

2.2.2. Anatomik özelliklerine göre

Karkas ve büyük parçalar halindeki etlerin anatomik yapı farklılıklarına göre orjinlerini tayin etmek mümkündür (13,46,63). Fakat anatomik

farklılıkların karkas ve büyük et parçaları ile sınırlı olması nedeniyle parçalanmış, kıyılmış ve ürün halindeki etlerin ayırımında yararlanılamamaktadır. Anatomik farklılıkların daha çok kemiklerde bulunması, zoolojik yönden birbirine yakın hayvanların anatomik benzerlik göstermesi, evcil ve yabani hayvanların komperatif anatomilerini gösteren kaynakların yeterli olmaması, uzman kişilere ihtiyaç göstermesi gibi faktörler etlerin anatomik olarak ayırımını sınırlı veya kullanılmaz hale getirmiştir (13,63).

2.2.3. Histolojik yapılarına göre

Et türlerinin histolojik olarak ayırımı, daha çok karkas veya etlerin üzerine yapışan kılların muayenesi ile yapılmaktadır (13,63,72). Kılın yapısındaki öz, kabuk ve kutikula tabakası hücrelerinin özellikleri ve kalınlıkları, hayvan türlerine göre ayırım göstermektedir. Fakat etin üzerinde bulunan kıl, o etin elde edildiği hayvana ait olduğunun kanıtı değildir. Bu nedenle histolojik araştırmalar güvenilir değildir (63). Ayrıca hemal lenf yumrularının farklı histolojik yapı göstermesi ile de bazı hayvan türlerini (koyun ile keçi) ayırt etmek mümkündür (23).

2.2.4. Yağ özelliklerine göre

Daha çok doku yağlarının kimyasal özelliklerinin (donma ve erime noktaları; iyot,sabunlaşma, Reichert-Meissl sayıları, refraktometre indisleri, içermiş oldukları yağ asitlerinin miktar ve çeşitleri) analizi ile türlerin ayırımı mümkün olabilmektedir. Ancak bu analizlerin çok hantal olması, bütün ürünlerde uygulanamaması ve analiz değerlerinin türlere göre çok yakınlık göstermesi nedeniyle hayvan türlerinin ayırımı kesin olarak ortaya konulamamaktadır. Ayrıca et ürünleri içerisine bitkisel yağların karıştırılması analiz sonuçlarının yanlış çıkmasına neden olabilmektedir. (13,15,63).

2.2.5. Proteine dayalı metodlar

2.2.5.1. Kromatografik metodlar

Kaslardan filtre edilerek hazırlanan et ekstraktları kromatografide kullanılarak et türlerinin identifikasyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır. Samy ve arkadaşları (66), kas proteinlerinin yapısının türlere göre farklı olması nedeniyle likit kromatografide, her türe özgü spesifik pikler elde ederek, etlerin identifikasyonunu yapmışlardır. Fakat hayvanların yaşı, cinsi, yetiştirme şekli, coğrafik ve mevsimsel faktörlerin türe özgü pik şekillerini etkilediklerinden, aynı türün farklı yerlerinden alınan etlerde bile değişik sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bununla beraber yöntemin yalnızca taze ve donmuş etler için uygulanabileceğini belirtmişlerdir.

2.2.5.2. Elektroforetik metodlar

Elektroforetik metodlardan elektroforez ve izoelektrik fokuslama (IEF) teknikleri etlerin orjinlerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Elektroforezde, etlerin yapılarındaki türlere özgü iyonize gruplar taşıyan yüklü kas proteinlerinin, belli bir pH derecesine sahip elektriksel alandaki hareket yeteneklerine veya kas protein moleküllerinin büyüklüklerine bağlı olarak ortamdaki hızlarının farklı olmalarına göre etler ayırt edilmektedirler. Elektroforezde genellikle numune olarak albumin kullanılmaktadır (35). Bunun nedeni ise albuminin hem anoda yakın olması ve hem de en koyu band oluşturması ile kolayca teşhis edilebilmesidir. Albuminden başka myoglobin, kreatinkinaz, alkalin fosfataz (43), esteraz (29), transferaz, dehidrogenaz (45), adenilatkinaz (44), laktat dehidrogenaz (68) enzimleri de kullanılmaktadır.

Izoelektrik fokuslama metodunun prensibi, elektroforez metodunun prensibi ile aynı olup burada jelin pH'sı geniş tutulmuştur. Proteinlerin, geniş

pH derecesine sahip taşıyıcı amphotitte izoelektrik noktalarına göre elektroforetik olarak ayrılmalarına dayanır. Yabancı etlerin teşhisinde elektroforetik metodlardan izoelektrik fokuslamayı et orjinlerinin belirlenmesinde 1980'de Kaiser ve arkadaşları (40), Polyakrilamid jel izoelektrik fokuslamayı da 1983'de Hoffman kullanmıştır (35).

Elektroforetik tekniklerin; numunelerdeki % 2-10 arasındaki yabancı et karışımlarını tesbit edebilmesi, dondurulmuş, çok küçük parçalara ayrılmış(69), kürlenmiş (18), 75° C ye kadar ısıtılmış (35,71) ürünlerde uygulanabilmesi ve genetik olarak birbirine yakın hayvan türlerinin etlerini ayırt edebilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Elektroforetik teknikler ayrıca balık türlerinin belirlenmesinde de kullanılabilir (40). Fakat elektroforetik tekniklerin kullanımında, laboratuvarında bütün hayvan türlerine ait referans protein veya enzim bulundurulması zorunluluğu (29,63), birden fazla ve düşük düzeyde et karıştırılmış örneklerde uygulanamaması (18,68), et ekstraktının (albumin veya enzim) hazırlanmasının güç olması, hızlı olmaması (37,61,69,73) ve aynı hayvan türünün değişik kaslarında farklı elektroferogramlar göstererek (34,69) sonucun yanlış çıkması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bununla birlikte yine elektroforetik tekniklerin, yerleşik kurulu bir laboratuvara ve sistemin korunması için özel bakıma gereksinim duyması, testi yapanların teknik düzeyde uzman olması, yüksek fiyatlı oluşu da dezavantajlarıdır (49).

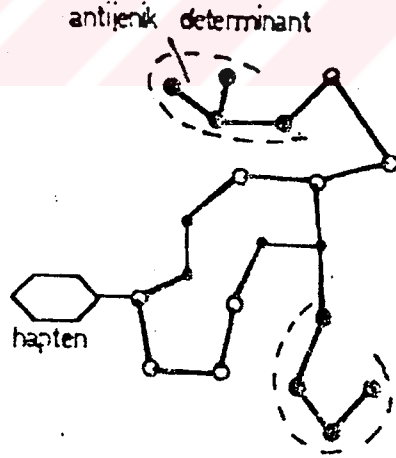
2.2.6. İmmunolojik Metodlar

Deney hayvanlarına, hayvan türlerine ait proteinlerin parenteral olarak enjekte edilmesinden sonra bu maddelere karşı oluşan antikorların invitro ortamda et antijenleriyle karşılaştırılması esasına dayanır (17,33,65). Fakat antijen antikor birleşmesinde genetik yönden yakın olan türlerde benzer determinant grupları nedeniyle çapraz reaksiyon oluşumu gözlenmektedir.

Ancak son yıllarda çapraz reaksiyon oluşumunu engellemek için yakın tür hayvanlar (örneğin koyun antikorunu elde etmek için keçi gibi) deney hayvanı olarak kullanılmaktadır (67).

Antijen, kendine özgül bir bağışık yanıtı yol açan ve oluşan bağışık yanıt ile invitro ve invivo ortamlarda tepkimeye giren maddelere denir. Antijen molekülünün yüzeyindeki, antijenin özgüllüğünü belirleyen kimyasal yapıya epitop (determinant = belirten grup) denir. (Şekil-2,1) Epitopa uyan ve antikor molekülünde bulunan kovuk kismada paratop adı verilir.

Türler arasında antijen farklılıkları vardır. Aynı işleri yapan organ veya dokularda dahi antijenite farklı bulunur. Örneğin insan kas dokusu ile sığır kas dokusunun farklılığı gibi. Türler arasında antijen farklılığı olmasına rağmen türlerin evrimsel yakınlığına göre antijen benzerlikleri de vardır.



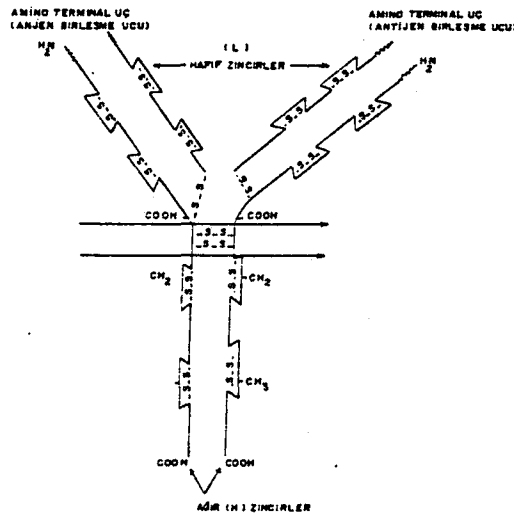
Şekil-2.1: Antijen molekülünün yapısı

Antikor, genel anlamda kimyasal olarak globulin yapısında olan antijenik uyarımlar sonucu vücutta lenfoid plazma hücreleri (metomorfoza uğramış B-lenfositleri) tarafından sentezlenen ve homolog antijenlerle spesifik reaksiyonlar verebilen protein molekülleri olarak tanımlanır.

Serumun gama globulin kısmında bulunan antikorlar genel olarak aralarında disülfid bağlarla birleşmiş 4 tane polipeptit zincirden (2 L zinciri=hafif, 2 H zinciri=ağır) oluşmuştur.

Elektron mikroskobunda incelendiğinde immunoglobulinler "Y" harfi şeklindedir. (Şekil-2.2) Antijenler bu "Y" harfinin uç kısımlarına bağlanırlar. Bu suretle bir immunoglobulin iki molekül antijen bağlayabilme kapasitesine sahiptir.

İki hafif zincirinin değişken bölgelerinde antijenlerle birleşen antijenik determinant uçlar (aminotermal uçlar) bulunur. Değişken bölgedeki aminoasitlerin sterik yapıları ve dizilişleri özgüllüğünü oluşturmaktadır. Determinant uçların dışında kalan kısımlar ile gövdenin yapısı, antikorlar için değişiklik göstermezler.



Şekil-2.2: Immunglobulin molekülünün yapısı

Çapraz reaksiyon (Kross reaksiyon): Özgül antikorların özgül antijen dışında, başka antijenler ile determinant gruplarının benzerlikleri nedeniyle reaksiyon vermesi olarak tanımlanır. Bir antijenin özgül antikoru ile reaksiyonunda bütün determinantlar arasında birleşme olurken çapraz reaksiyonda antikor ile antijenin bazı determinantları arasında birleşme olur. Çapraz reaksiyon oluşumu evrimsel gelişmede akrabalık gösteren türlerin antijenleri arasında, yakınlık oranıyla doğru orantılıdır (9,48,65).

İmmunolojik metotlarda kullanılan antiserumların elde edilmesinde aşağıda belirtilen işlemler yapılmaktadır.

a) Deney hayvanlarına antijenik maddelerin enjeksiyonu

Hayvan türlerine ait çeşitli antijenik maddeler (et ekstraktı, kan, kan serumu, albumin gibi) belirli aralıklarla çeşitli yollardan deney hayvanlarına (tavşan, kobay vb.) enjekte edilerek vücutlarında antikorlar oluşturulur. Belli bir süre sonra kanda antikorların kullanılabilir bir yoğunlukta bulunduğu tesbit edilmesiyle hayvanın bütün kanı alınır ve kan serumu ayırt edilir. Yalnız kan enjeksiyonunda alyuvarların olumsuz etkileri olduğundan antijen olarak daha çok albumin tercih edilmektedir. Ayrıca immunizasyonda antijenle birlikte antijenin antijenik gücünü artıran, organizmadan atılmasını geciktiren ve onu absorbe eden adjuvantlar kullanılmaktadır.

b) Antiserumun titresinin tayini

Antiserumun içindeki antikorlar saf olarak ayrılıp elde edilemediğinden miktarı bilinen ölçü birimlerinden biriyle ifade edilememektedir. Bundan dolayı antiserumdaki antikorlar, onu elde etmek için kullanılan antijenlerle vermiş olduğu reaksiyonun kuvvetine göre ifade edilir. Bu amaçla standart yoğunluktaki antijen çözeltisine, azalan miktarlarda ilave edilen antiserum ile reaksiyon oluşturduğu en yüksek sulandırma antiserumun titresini kabul edilir (17,24).

c) Antiseruma spesifite kazandırılması

Elde edilen antiserumun içerisinde değişik determinantlara karşı oluşmuş immunglobulinler bulunduğu için poliklonal özellik taşır. Bu yüzden antiserumlar, antikor elde edilen antijenin yakın tür antijenleri ile de reaksiyona girerler. Antiserumlara monospesifiklik kazandırmak için şu teknikler kullanılmaktadır.

1- Saturasyon: Antiserumların, elde edilen antijenin yakın tür antijenleri ile deney tüplerinde karşılaştırılarak benzer determinanta sahip antikorların elimine edilmesi tekniğidir (17).

2-Affinite kromatografi ile saflaştırma: Antiserum, zoolojik yönden kendisine yakın hayvan türlerinin antijenleri ile aktive edilmiş sefaroz içeren kolonlardan geçirilerek kross reaksiyon gösteren grupları giderilir (41).

3- Monoklonal antikor kullanımı: Bir antijenin üzerindeki değişik antijenik determinantların her birinin uyardığı B-lenfosit hücreleri, vücuttan alınarak ayrı ayrı üretildiğinde sadece bir determinanta karşı özgül olan monoklonal antikorlar elde edilir (9). Deney hayvanlarına et ekstraktı enjeksiyonu yapıldıktan sonra antikor yapan B-lenfosit hücreleri vücuttan alınarak monoklonal antikorlar elde edilirler.

Hayvan etlerinin identifikasyonunda Goerlich (26), nativ ve 70°C de ısıtılmış kanguru ve sığır kas proteinlerine karşı farelerde ürettiği monoklonal antikorları ELISA testinde kullanmıştır. Üretimi çok pahalı olan monoklonal antikorlar genellikle araştırmalarda kullanılmaktadır.

İmmunolojik Metodlar

2.2.6.1. Presipitan halka metodu (Uhlenhut metodu)

Antikora karşı antijen bulunduğunu göstermek için bir tüpteki antijen üzerine antiserum konularak bu iki sıvının birbirine değdikleri yüzeyde presipitasyon oluşturma tekniğidir (36,65)

2.2.6.2. Agar jel immundiffuzyon metodu (AGID)

Metod, donmuş agar veya jelatinin diffuzyon yeteneğinden yararlanılarak antijenle antikor karşı karşıya getirme tekniğine dayanır. Antijen ile kendisine homolog olan antikor agar jelinde birbirlerine doğru yayıldıkları zaman optimal birleşme bölgesinde bir presipitasyon çizgisi oluştururlar. İmmundiffuzyon metodunun basit diffuzyon (Oudin metodu), tek yönlü diffuzyon (Mancini metodu), çift yönlü diffuzyon (Ouchterlony) şeklinde 3 uygulama tekniği vardır (58,65).

Et türlerinin identifikasyonunda agar jel immundiffuzyon metodunu 1971 yılında Fugate ve Penny (25), 1982 yılında Doberstein ve Greuel (27), Swart ve Wilks (70) kullanmışlardır.

2.2.6.3. İmmunelektroforez metodu

Bu metotta elektroforez ile immün presipitasyon ilkeleri bir arada kullanılır. Antijen ile antikor arasındaki reaksiyon süresini azaltan çift immundiffuzyon ve elektroforezin bir kombinasyonudur. Agar jel içerisinde antijenler elektroforetik mobilitelerine göre diğer antijenlerden ayrılarak kendisine homolog antikorlarla direkt temasa gelerek presipitasyon bant oluştururlar (36,65). İmmunelektroforezde deney süresi (en az 36 saat) oldukça uzundur. Fakat agar jel immundiffuzyon metoduna göre hassas ve hızlı olup daha az antiseruma gereksinim duymaktadır (2).

Pratikte oldukça yaygın bir şekilde uygulanan immunolojik tekniklerin, monospesifik antiserumlar kullanılmadığı için yakın türlerin ayrımında çapraz reaksiyonların görülmesi (25), % 10'un altındaki karışımların tesbit edilememesi nedeniyle güvenilir olmaması (70,73) fazla antiserum kullanılmasından dolayı maliyetinin yüksek olması, deneylerin uzun zaman alması (örneğin immun difüzyon metodunda 72 saat gibi) ve fazla çalışmayı gerektirmesi (73) olumsuz yönleridir.

2.2.6.4. Enzim Linked Immuno Assay (ELISA) Teknikleri

Bu yöntem, tür orjini tayininde 1982'den bu yana giderek artan bir kullanım alanı bulmuş ve günümüzde de en emin yöntemlerden birisi olarak pratikte kullanılmaya başlanmıştır. ELISA, yalnızca antijen ve antikor kompleksinin presipitasyonuna dayanan klasik bir immuno-kimyasal yöntem değildir. ELISA, solid faz üzerinde antijenin bazı determinantlarına kendine spesifik antikorların, diğer bazı determinant gruplarına da enzim işaretli antikorların bağlanması ve substrat aracılığıyla enzim aktivite düzeyinin fotokolorimetreye ölçülmesi prensibine dayanır (11,20,38,42,60,74).

ELISA, teşhis metodu olarak rutin analizlerde ilk kez 1971 yılında Enguall ve Perlmann ile Van Weeman ve Schuurs tarafından kullanılmıştır(64). ELISA'nın gıda analizlerinde kullanılması ise Hitchcock ve arkadaşları (32), tarafından 1981 yılında et ürünleri içerisinde soya proteini aramasıyla başlamıştır. Etlerin identifikasyonunda ise ELISA, 1982 yılında ilk kez Kangethe (42), tarafından kullanılmıştır.

Affinite kromatografi yöntemiyle saflaştırarak elde edilen antiserumlarla çiğ et türlerinin ayrımında ELISA 'yı 1982 yılında Whittaker ve arkadaşları (74), 1983'de Patterson ve Spencer (61), 1985'de Johnston ve arkadaşları (37) ile Jones ve Patterson (38) kullanmışlardır. Kangethe ve arkadaşları (42) ilk defa

1982 yılında etlerin ayırt edilmesinde ve orjin tayininde indirekt ELISA'yı kullanarak sığır, at, koyun ve domuz etlerinin identifikasyonunu yapmışlar ve % 3'lük karışımları ayırt ettiklerini bildirmişlerdir. Whittaker ve arkadaşları (73), çiğ etlerin ayırımında ELISA testinde sığır, koyun, kanguru, at, deve, domuz etleri üzerine çalışmışlar ve % 10 nun altındaki karışımların tesbit edilebileceğini bildirmişlerdir. Patterson ve Spencer (61), yakın türlere ait çiğ etlerin ayırımında at eti içerisinde eşek, koyun eti içerisinde % 0,1 oranındaki keçi etini, dana eti içerisinde % 1 oranındaki bufalo etini ayırt ettiklerini bildirmişlerdir.

Double sandwich ELISA ile et türlerinin ayırımı konusunda yapılan çalışmalarda, Jones ve Patterson (39) dana eti içerisinde % 1-3 oranındaki domuz etini tesbit etmişlerdir. Testde monospesifik domuz serum albumini kullanmışlar ve bu metodun daha önce tanımlanan ELISA tekniklerinden 10 kez daha duyarlı olduğunu saptamışlardır. Patterson ve arkadaşları (62) ise işlenmemiş etlerde at, kanguru, domuz, deve, bufalo, koyun vb. türlerin ayırımında, % 1' den daha az karışımları tesbit ettiklerini bildirmişlerdir.

Monospesifik antiserum elde edilmesinde değişik teknikler üzerinde çalışan araştırmacılardan Johnston ve arkadaşları (37), sığır etine karşı antiserumları, tavşan ve koyundan elde ettikten sonra saflaştırmışlar ve ELISA'da kullanmışlardır. Testlerin sonucunda tavşanlardan elde ettikleri antiserumların daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Yine Martin ve arkadaşları (52,53) ise tavşanlarda at ve domuz sarkoplazmik proteinlerine karşı spesifik antiserumlar üretmişler ve bu antiserumları, çiğ dana eti içerisinde % 1-50 oranında bulunan at ve domuz eti karışımlarını tesbit etmek için double sandwich ELISA'da kullanmışlardır. Kas proteinlerine karşı elde ettikleri spesifik antikörlerin daha önceki araştırmalarda serum proteinlerine karşı elde edilen spesifik antikörlardan daha iyi olduğunu ve albuminlerden ileri gelen bazı non-spesifik reaksiyonların görülmediğini bildirmişlerdir.

Jones ve Patterson (38), çiğ etlerin identifikasyonu için türe özgü monospesifik antiserumlar kullanarak indirek ELISA'yı geliştirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar ham ve saflaştırılmış sığır, at ve domuz antiserumlarını sığır, at, domuz, hindi ve koyun etleri ile karşılaştırmışlardır. İşlenmemiş ham antiserumlarda kross reaksiyonun saf antikora karşı daha yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir.

Et türlerinin belirlenmesinde ELISA'nın farklı teknikleri üzerinde çalışan Ayob ve arkadaşları (11) indirek kompetatif ELISA ve direkt nonkompetatif ELISA'yı, Dinçer ve arkadaşları (20), kompetatif ve indirekt ELISA'yı karşılaştırmışlardır. Ayrıca et ürünlerinde kütleme ve pişirmenin etkisini incelemişlerdir. Dinçer ve arkadaşları (20), her iki ELISA ile işlenmiş ve çiğ etlerde domuz ve koyun eti ayrımının % 1 e kadar mümkün olduğunu, fakat her iki metodla pişirilmiş dana eti içerisinde koyun etinin ayrımının ise mümkün olmadığını, ısı işlemi görmüş dana eti içerisinde domuz etinin teşhisinin ise ancak kompetatif ELISA ile % 25 oranında mümkün olduğunu belirtmişlerdir. İşlemenin ELISA için olumsuz etki göstermediğini ve kross reaksiyonların indirekt ELISA'ya nazaran kompetatif ELISA'da daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Ayob ve arkadaşları (11) ise sığır eti içerisinde domuz eti karışımlarının analizini yaptıkları indirekt kompetatif ELISA'da kross reaksiyonun daha az görüldüğü ve metodun daha hızlı (30 dakika) ve hassas olduğunu bildirmişlerdir.

Isı işlemi görmüş etlerin idendifikasyonu ile ilgili araştırmalarda Manz (50), 80°C' de 60 dakika ısıtıldığında denatüre olmayan ve elektroforezde de α -2 globulin bölgesinde bulunan sığır ve domuz kas proteinlerini tavşanlara enjekte ederek elde ettiği spesifik antiserumlar ile ELISA'da 80°C' de ısıtılmış sığır ve domuz etlerini ayırt etmiştir. Ancak araştırmacı 115 °C'de ısıtılmış sığır ve domuz etlerinden, elektroforezde proteine rastlamadığı için antiserum elde edemediğini bildirmiştir. Fakat Sawaya ve arkadaşları (67), 100° C' nin üzerinde ısı

uygulanmış domuz kas ekstraktına karşı koyunda ürettikleri antiserumları kullanarak geliştirdikleri kompetatif ELISA ile 70, 100 ve 120°C' lerde 30 dakika süreyle ısıtılan sığır eti içerisinde % 1'lik, koyun eti içerisinde % 0,5' lik domuz eti karışımını tesbit etmişlerdir. Yapılan kross reaksiyon tesbitleri sonucunda hatalı pozitiflik ya da negatifliğin % 5'i geçmediğini bildirmişlerdir.

Berger ve arkadaşları (12), dondurulmuş ve konserve edilmiş ürünlerde domuz ve kanatlı etlerinin identifikasyonunda ELISA kullanmışlardır.

Et türlerinin identifikasyonunun dışında Griffiths ve Billington (27), indirek ELISA ile Beef joint ve model mixtures et ürünlerinde sığır eti miktarlarının kantitatif olarak tayinini, Hitchcock ve arkadaşları (32) ile Olsman ve arkadaşları (56) ise etlerdeki soya proteini gibi bitkisel proteinlerin teşhisini araştırmışlardır. Griffiths ve Billington (27), araştırmalarında olumlu sonuçlar alamamışlar, bunun nedenini ise antiserum elde etmek için kullandıkları kan serumuna bağlamışlardır.

Ülkemizde ise et türlerinin ayırımı ile ilgili ilk çalışma, 1959 yılında Omurtag tarafından (57), salam ve sosislerde presipitasyon testi ve glikojen miktarı tayini ile at etinin ayrılması konusunda yapılmıştır. Araştırmacı çalışmasında glikojen miktarı tayini ile at etinin ayırt edilemeyeceğini bildirmiştir.

Berkmen ve Demirer (14), çalışmalarında deve antijenine karşı antiserum elde etmişler ve bu presipitan serumu sığır, koyun, keçi, at, köpek, kedi, tavşan, kobay kan serumları ve et maserasyonları ile Uhlenhut metodu dahilinde karşılaştırmışlar ve bu türler ile herhangi bir reaksiyon oluşturmadığını bildirmişlerdir. Deve antijeninin diğer hayvanların presipitan serumları ile reaksiyon vermemesini deve antijenine has bir özellik olarak tanımlamışlardır. Yine Berkmen ve Demirer (15), sığır ve manda etlerini, Demirer (17), koyun ve

keçi etlerini presipitasyon metodları ile ayırt edilmeleri üzerine yaptıkları çalışmalarında, nativ presipitan serumlarla sığır ve manda etlerinin Uhlenhut metodu ile koyun ve keçi etlerinin tüpte presipitasyon ve agar jel immundiffuzyon testleri ile ayrılmadığını ancak saturasyon yoluyla elde ettikleri spesifik antiserumlarla iki türü birbirlerinden ayırmanın mümkün olduğunu bildirmişlerdir.

Et türlerinin belirlenmesinde son yıllarda rutin olarak daha çok kullanılmaya başlanan ELISA'nın oldukça fazla duyarlılığa sahip olması, genetik olarak birbirine yakın hayvan tür etlerinin (at eti içerisinde eşek, koyun eti içerisinde keçi etinin % 0,1 lik karışımı, sığır eti içerisinde % 1'lik bufalo etini (61)) tesbit edilebilmesi (11,20,27,39,59,62,74), yağ oranı yüksek (61,62) ve çok farklı et karışımları içeren örneklerde uygulanabilmesi (62), hızlı (30 dakika-2 saat), pratik ve güvenilir (11,20,27,53,61,62,74) olması özellikleri ile Ouchterlony ve elektroforetik metodlara karşı üstünlük göstermektedir. Yine ELISA ile dondurulmuş (61) ve ısı işlemi görmüş ürünlerdeki düşük düzeylerdeki yabancı etlerin saptanması da mümkün olmaktadır.

ELISA'da saflaştırılmış antiserum kullanılması nedeniyle kross reaksiyonların çok az olması, az miktarda antikora gereksinim duyması ve böylelikle oldukça fazla numune işlenebilmesi ve dolayısıyla güncel sorunlardan biri olan maliyetin düşük olması yine diğer metodlardan üstün taraflarıdır (27,39,53,61,62,73,74).

Örnek hazırlama işinin daha basit olması, sonucun gözle ya da basit araçlarla (spektrofotometre) okunabilmesi, diğer yöntemlerdeki gibi uzman veya fazla sayıda personele gereksinim duymaması (60,74), test sonuçlarının testi yapan kişiye göre değişmemesi (73), sistemin otomatik hale getirilebilmesi (11,20,53,60,74) gibi özellikleri de ELISA'nın laboratuvarlara uygulanması kolaylığını sağlamaktadır.

ELISA' nın diğer metotlara karşı bu üstün tarafları yanında, çok yüksek duyarlılığa sahip olması (1), kesin sonucu söylemek için monospesifik antiserum kullanma zorunluluğu (29,42,61,73,74), antiserumların duyarlı ve monospesifik hale getirilmesinin pahalı ve çok zaman gerektiren bir iş olması (61,73,74), sistemin yerleştirilmemiş olduğu ülkelerde pahalı oluşu dezavantajlı yönleridir.

Araştırmacılar diaagnozun daha duyarlı ve daha pratik hale getirilebilmesi için direkt,indirekt,kompetatif ELISA tekniklerini geliştirmişlerdir (75).

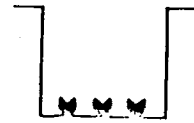
2.2.6.4.1.Kompetatif direkt ELISA

Kompetatif ELISA, numunede var olduğu düşünülen antijenin saptanması ve ölçülmesini ortaya koymayı amaçlayan bir yöntemdir. Spesifik antijene karşı bilinen standart antijen ile test antijeninin yarışılması prensibine dayanır. Bu testin direkt ve indirekt olmak üzere iki uygulama şekli vardır. Kompetatif indirekt ELISA'da izlenen basamaklar Şekil-2.3'de gösterilmektedir.

Şekil-2.3: Kompetatif direkt ELISA

1- Antikorlar plakaya adsorbe edilir.

İnkubasyon, Yıkama



2- Enzim işaretli antijen (A) ile

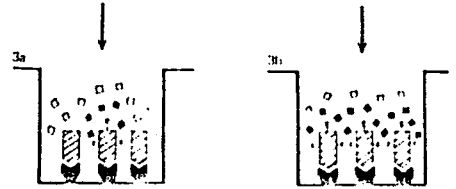
numune antijen (B) ilave edilir

İnkubasyon, Yıkama



3- Substrat ilave edilir

İnkubasyon, Yıkama



4- Okuma

Test sonunda oluşan renk, ortamdaki enzim işaretli antijenin miktarı ile orantılı olarak değişir. Yani numunedeki antijen miktarı ne kadar çok olursa mikroplakaya kaplanmış antikörlerle birleşen enzim işaretli antijen (konjugat) miktarı da o kadar az olur. Ve bu durumda substrat ilavesinden sonra numune-
deki antijenin miktarına bağlı olarak renk oluşmaz.

2.2.6.4.2. Kompetatif indirekt ELISA

Şu basamaklar izlenir (Şekil-2.4).

Şekil-2.4: Kompetatif indirekt ELISA

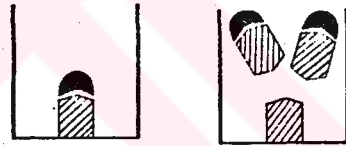
1- Spesifik antijenler plakaya adsorbe edilir

İnkubasyon, Yıkama



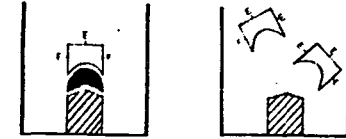
2- Spesifik antikor ve test numuneleri ilave edilir

İnkubasyon, Yıkama



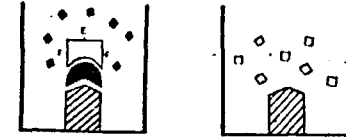
3- Enzim işaretli antikor (Konjugat) ilave edilir

İnkubasyon, Yıkama



4- Substrat ilave edilir

5- Okuma



Test materyalindeki antijen miktarı ne kadar çok olursa mikroplakaya kaplanmış antijenlerle birleşen antikörler o oranda az olur. Enzim işaretli antikörlerde mikroplakaya az bağlanacağından substrat ilavesinde renk oluşumu görülmez.

2.3. ELISA Tekniğinde Kullanılan Malzemeler

2.3.1. Solid faz (Taşıyıcı yüzeyler)

Solid-faz immunassay da prensip, kullanılan ilk reaktantın (antijen veya antikor) solid faza bağlanması ve izleyen reaktantlarında birbirlerine bağlanarak bir blok oluşturmalarıdır (1).

Genelde solid faz, immunosorbent özelliğine sahip maddeler olarak tanımlanır. Polystren, plastik, mikro kristalin cam, silikon, dekstran immunolojik reaksiyon gösterebilen maddelerdir. Fakat bu amaç için daha çok polystren, polypropilen ve polyvinyl'den yapılan mikropalakalar kullanılır. Bu maddelere immunoadsorbent özellikler kazandırmak için örneğin polystren önce nitratlanır ve ondan sonra polysosiyanat polystrene dönüştürmek için diazotize edilebilen polyaminopolystrene redüklenir. Böylece izosiyonat grupları ile reaksiyona girebilen diazo grupları oluşturulur ve bu gruplar da proteinleri bağlama yeteneğine sahiptirler (3,64).

2.3.2. Antijenler (Test örnekleri)

Yüksek molekül ağırlıklı antijenlerin kullanılmasında non-spesifik reaksiyon oluşumu daha çok gözlenir. Bu nedenle böyle materyaller tween içeren fosfat buffer salin (PBS) ile sulandırılmaları gerekir. Bununla beraber non-spesifik reaksiyonların önlenmesi için heterolog proteinler (örneğin albumin, yağsız süt tozu proteini, jelatin gibi) kullanılabilir. ELISA'da eğer test örnekleri solid faza kaplanmış iseler aranan komponentler dışında reaksiyon verebilen diğer maddeler de solid faza bağlanırlar.

2.3.3. Antikorlar

ELISA çok duyarlı olduğundan non-spesifik reaksiyonların oluşumunu önlemek için antikorların çok spesifik olması gereklidir. Bu yüzden monoklonal antikor veya affinite kromatografi ile saflaştırılmış antikorlar kullanılır (1).

2.3.4. Konjugat (Enzim işaretli antijen veya antikor)

Enzimin, antikor yada antijene bağlanması ile elde edilmiştir. İlk kez 1930 da Renner ve 1933 de Heidelberger, doku ve hücrelerdeki antijeni görünür hale getirmek için işaretli antikorların kullanılabilceği fikrini savunmuşlardır. Antikor ya da antijenin enzimlerle işaretlenmesi ise 1961 yılında Nakane ve Pierce tarafından ortaya konmuştur (55,64). ELISA'da kullanılan enzimlerin başlıcaları glukoz, glukozamylaz, laktoperoksidaz, ribonükleaz ve tirozinazdır. Ucuz ve konjugasyonu kolay olması nedeniyle alkalin fosfataz ve horseradischperoksidaz en fazla tercih edilenidir. Peroksidaz ELISA'da oldukça yaygın kullanılan 40.000 molekül ağırlığında bir hemogluko proteindir. Alkalin fosfataz ise 100.000 molekül ağırlığında bir enzimdir. Peroksidaz enziminin alkalin fosfataza karşı; konjugat spesifitesinin çok geniş olması, fiyatının ucuz olması, bazı substratlarla çok koyu renk oluşturması nedeniyle gözle okunabilmesi gibi üstün yanları vardır. Peroksidaz kullanımındaki başlıca sakınca ise spesifik substratlarının kanserojen özelliklere sahip olmasıdır. Oysa alkalin fosfatazın spesifik substratı olan p-nitrofenilfosfat (p-NPP) ise toksik etkiye sahip değildir (64).

2.3.5. Substrat

Enzimle reaksiyona girerek immün kompleksin varlığını ortaya koyan maddelerdir. Enzim-substrat reaksiyonu ortamdaki enzim miktarına bağlıdır. Tek bir alkalin fosfataz veya horseradisch peroksidaz enzim molekülü, 1 dakikada substratın 100.000 molekülü ile reaksiyona girerek gözle görülebilen

bir ürün oluşturmaktadır. Bu büyütme çok küçük antijen miktarlarının ölçümünü bile sağlar. Reaksiyon sonucunda antijen ya da antikor miktarı, oluşan rengin kontrol ile karşılaştırılması sonucunda gözle değerlendirilir ya da fotokolorimetreye ölçülür. Bu yüzden kullanılan substratın reaksiyon sonucu oluşturduğu renk önemlidir. Örneğin p-NPP açık sarı renkli ürün oluşturduğundan gözle değerlendirmede zorluk yaratmaktadır. Peroksidaza spesifik reaksiyon veren substratlar ise daha koyu renkli ürünler oluşturmaktadırlar.

Substratlar her enzimle bağlanabilme özelliğine sahip değildir. Daha önce de belirtilmiş olduğu gibi alkalen fosfataza karşı spesifik substrat p-NPP olduğu halde peroksidaz enzimi ortho-fenilfosfat, ortho-fenildiamin (OPD) (portakal sarısı), O-dianisidin (pembe), Orthotolidin (mavi), sodyum perborat (yeşil) ve 5-aminosalisilik asit (kahverengi) ile reaksiyon oluşturur. Peroksidaza spesifik olan substratlar birbirleriyle karşılaştırıldığında en duyarlı olanı ise OPD'dir (64).

2.3.6. Yıkama basamakları

Bir basamaktan diğerine geçerken kullanılır. Mikroplaka boşaltıldıktan sonra tween içeren PBS solüsyon ile 4-5 kez yıkanır ve kurutulur. Yıkamanın dikkatle yapılması non-spesifik reaksiyonların önlenmesi bakımından önemlidir (1).

2.3.7. Durdurucu reaktif

Enzim substrat reaksiyonu substratın ilavesinden bir süre sonra durdurulur. Bu amaçla p-NPP için 1N NaOH, peroksidaza spesifik substratlarda ise % 12,5 luk H_2SO_4 kullanılır (1).

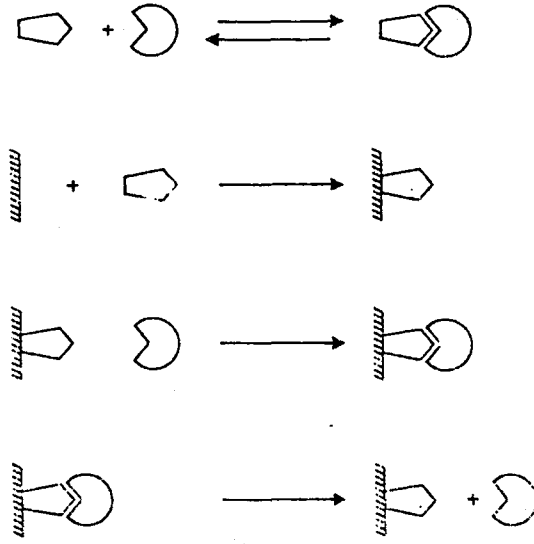
OKUMA: Enzim-substrat reaksiyonu sonucu oluşan renk göz ya da fotokolorimetre ile ölçülerek değerlendirilir. Gözle değerlendirmede, sonuçlar kontrole karşılaştırılarak "pozitif" ya da "negatif" şeklinde belirtilir. Test materyalinin dilusyonları kullanılmış ise, en son renk değişiminin olduğu sulandırma, o test materyalinin sonucunu ifade eder. Fotokolorimetrik değerlendirmede, mikroparka maksimal absorbans değerine ayarlanmış spektrofotometreye yerleştirilerek okuma yapılır. Maksimal absorbans değeri p-NPP için 405 nm, peroksidaza spesifik substratlar için 492 nm'dir (1,5).

2.4. Affinite Kromatografi (İmmunoadsorbant kromatografi=İAC)

Affinite kromatografi metodunda proteinler, adsorbe edebilen maddeler kullanılarak separe edilmektedir. Bu prensip altında antikorları, solid faza bağlanmış spesifik antiijenlerle reaksiyona sokarak, özgül antikorlarını diğer serum proteinlerinden ayırmak mümkündür (Şekil-2.5).

Seluloz, sefaroze ve agar gibi solid faz olarak kullanılan maddeler ilk önce p-aminofenil-azo -p-fenilarsenik asit ile (veya p-nitrobenzil klorid, karbomid gibi maddeler) işleme sokularak, proteinlerle birleşebilecek özeliğe sahip diazo gruplar oluşturulur. Bu diazo bağı ile antiijenler solid faza bağlanır. Antikorlar bu kompleks ile reaksiyona sokularak saflaştırılır (3,22).

Seluloz, sefaroze gibi polimerlere bağlanmış antiijenlerle antikorların izolasyonu için kolon tekniği kullanıldığında işlem önemli derecede otomatikleşir ve kolonlardan fraksiyonlar halinde kolaylıkla yüksek konsantreli antikorlar elde edilir(3,4). Poliklonal özellik taşıyan bir antiserum, immunoabsorbent içeren bir kolondan geçirildiğinde, immunoabsorbente bağlanmış antiijene spesifik antikorlar kolon içinde kalırken, dışarı çıkan fraksiyonlarda sadece heterolog antikorlar bulunur. Daha sonra pH'sı 2,5-3,0 olan solüsyonların kullanılması ile



Şekil-2.5: Affinite kromatografinin prensibi

bağlanmış antikorlar dissosiyeye edilir. Kolondan ince tüplerle (tubing) dışarı alınan tampon içindeki antikorlar, numune toplayıcısı olan kollektör yardımıyla otomatik olarak tüplerde belli hacimlerde toplanabilirler. Numune toplayıcısına bağlanmış bir spektrofotometre ve kayıt aleti ile kolondan çıkan antikorların hangi tüplerde toplandığı, kayıt aletinin çizdiği eğrilerden bulunabilir.

İmmunoadsorbentlerle izole edilen antikor preparatları, yüksek derecede saflığa sahiptirler. Antikorların immunolojik aktiviteleri ekstraksiyon sırasında azalmamaktadır (3).

2.4.1. Affinite kromatografide kullanılan malzemeler

2.4.1.1. Fraksiyon kollektör

Kolon kromatografi sisteminin bir parçası olan "Fraction Collector " (ayrılan antiserumun fraksiyonlarını toplayan alet) bütün sistemin beynini

oluşturmaktadır (Resim-1). Fraksiyon kollektörde bulunan bilgisayara zaman, miktar, tüpsayısı ve boşa akıtma gibi değişik veriler yüklenebilmektedir. Peristaltik pompa ve rekorder ile bağlantıları sayesinde sistemi tekelden yönetmek mümkündür (7).

2.4.1.2. Peristaltik pompa

Kolondaki akış hızını ayarlayan Peristaltik pompa bağımsız ya da fraksiyon kollektörde bulunan bilgisayar yönetimine bağlı olarak çalışabilmektedir. Sıvıyı ileri ve geri hareket ettirme yeteneğine sahip olan pompanın, çalıştırılmadan önce usulüne uygun olarak kalibre edilmesi gerekir (Resim-2) (7).

2.4.1.3. Rekorder

Bağımsız olarak çalışabildiği gibi fraksiyon kollektör yönetiminde de işlevini sürdürebilmektedir. U.V. Monitör serum proteinlerine ait piklerin ortaya çıkmasını sağlar. Çift kalemli olup kalemlerden birisi tüp sayısını belirler, diğeri ise pikleri çizer (Resim-3) (7).

2.4.1.4. UV Monitor

Ayrımı yapılan numunenin absorbansını ölçer ve rekorder de piklerin oluşmasını sağlar. 280 nm olan UV filtresi mevcuttur (Resim-4) (7).

2.4.1.5. Kolonlar

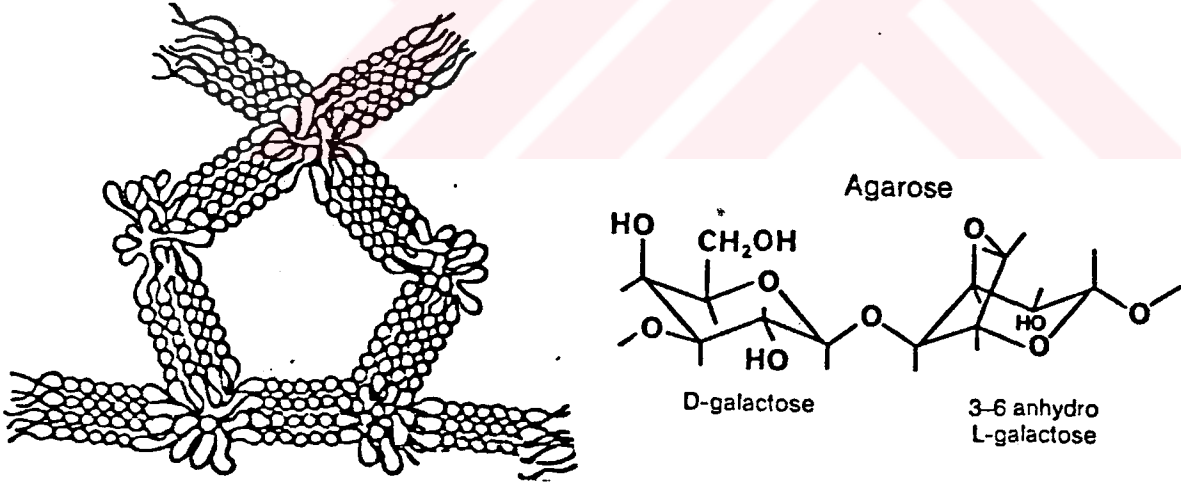
Çalışmanın özelliğine göre değişik çap ve uzunluktaki kolonlar kullanılır.

2.4.1.6. Sefaroz

Poligalaktopiranoz yapısında bir polisakkarit olan sefaroz agardan üretilir. İçerdiği D-galaktoz ve 3-6 anhidro-1-1 galaktoz ünitelerinin zincir şeklinde olması nedeniyle lineer bir polisakkarit yapı gösterir (Şekil-2.6).

Polisakkarit zincirinde fazla miktarda bulunan hidroksil grupları nedeniyle yüksek derecede hidrofilik özelliğe sahiptir. Bu nedenle sefaroz su içine konulduğu zaman partikülleri içine su dolarak genişler ve büyür.

Sefarozun bağlama kapasitesini arttırmak için Cyanobromür (CNBr) ile aktif hale getirilmektedir (16,51). CNBr ile aktive edilmiş sefaroz üzerindeki -OH grupları ligantların bağlanma yerleridir. CNBr-aktive edilmiş sefaroz 4B, biyolojik aktif maddelerin immobilizasyonu için mükemmel bir yataktır.



Şekil-2.6: Agar jelin yapısı

Sefaroz jelleri tüm sıvı tamponlarına uygundur. 95°lik alkol ve yüksek tuz konsantrasyonlarından etkilenmez, pH 4-10 arasında tamamen stabil ve 0-30 °C'ler arasında işlevsel özelliklerini kaybetmezler. 30°C'nin üzerindeki ısılarda yumuşar, 0°C'nin altında ise kollabe olurlar. Su ile jelin şişirilmesi sırasında elektrostatik güçlere bağlı olarak jel tanecikleri birbirine yapışabilir. Bu yüzden zayıf tuz solüsyonu içerisinde şişirilmesi tercih edilir. Tüm jel tipleri hızla şişer ancak dengeye ulaşmak için belirli bir zaman alırlar (3,4,22).



Resim-2.3: Rekorder**Resim-2.4: UV Monitör**

3.MATERYAL ve METOD

Materyal olarak içerisinde % 1, 3, 5, 10 ve 15 oranlarında domuz ve at eti karıştırılarak hazırlanmış deneysel Türk fermente sucuklar (19) kullanılmıştır. Sucuklarda kullanılan domuz eti; kürsümüze muayene için getirilen yabancı domuz etlerinden, at eti; patoloji kürsümüzün otopsi salonundan sığır eti; Altındağ Belediyesi Et Satış Merkezinden temin edilmiştir. Herbir karışım için 0.5'er Kg sucuk hamuru hazırlanmış ve sucuk yapımı iki kez tekrar edilmiştir.

ELISA'da kullanılan antiserumlar ise tarafımızca deney hayvanlarından üretilmiştir. Türe özgü domuz, at ve sığır antiserumların üretimi, Ayob ve arkadaşları (11), Herbert (30), Minden ve Fair'in (54) önerilerine göre Yeni Zeland tavşanlara kristal albuminlerin enjeksiyonu ile önce ham antiserumlar elde edilmiş sonra da adsorbent madde olarak CNBr aktveli sepharoz 4B nin kullanıldığı affinite kromatografide (4,41) saflaştırılmıştır.

Sığır etinden yapılmış sucuklardaki at ve domuz etlerinin varlığı Ayob ve arkadaşlarının (11), önerdiği indirekt kompetatif ELISA ile aranmıştır. ELISA için sucuk numunesi ekstraktları ise Patterson ve arkadaşlarının (62), bildirdiği şekilde hazırlanmıştır.

3.1. Deneysel Sucuk Numunelerinin Yapılması

Bu amaçla;

-Uygun kalitede sığır, domuz, at eti ve sığır böbrek yağı

-Sucuk kılıfı ve baharatlar

(Sarımsak, kırmızı biber, karabiber, kimyon) .

-Katki maddeleri (Tuz, şeker, glikoz, nitrat)

-Sucuk yapımı için gerekli aletler (Kuter, doldurma makinası, atmosfer cihazı ve kesim aletleri. Anabilim Dalımız Et Ünitesinden sağlanmıştır). kullanılmıştır.

Sığır etinden hazırlanan sucuk hamuruna % 1,3,5,10,15 oranlarında domuz ve at eti karıştırılarak 0,5'er kg sucuk yapıldı. Kontrol grupları için de ayrıca domuz, at ve sığır etlerinden de 0,5'er kg sucuk yapıldı.

Aşağıda bildirilen karışıma göre hazırlanan sucuk hamuru barsaklara doldurulduktan sonra 20 °C'de 1.gün % 100, 2.3. gün % 95, 4.gün % 90, 5.gün % 85, 6.gün % 80 ve 7.gün % 75 rutubette olgunlaştırıldı ve daha sonra deneylerde kullanılmak üzere buzdolabında muhafazaya alındı.

Sucuk hamurunun karışımı

Et.....	425 gr
Böbrek yağı75 gr
Sarımsak (konsantre).....	3 gr
Kırmızı biber.....	2,5 gr
Karabiber.....	2,5 gr
Kimyon	5 gr
Tuz	2,5 gr
Nitrat.....	% 0,02
Glikoz	1,25 gr
Sakkaroz	1,25 gr

Domuz ve at eti karışımları % 1 (420 gr sığır eti+ 5 gr domuz veya at eti), % 3 (410 gr sığır eti+15 gr domuz veya at eti), % 5 (400 gr sığır eti + 25 gr domuz veya at eti), % 10 (375 gr sığır eti+50 gr domuz veya at eti), %15 (350 gr sığır eti+75 gr domuz veya at eti) olarak hazırlanmıştır.

3.1. Antiserumların Elde Edilmesi

Gerekli Materyaller

- Tavşan (Beyaz Yeni Zeland, 14 haftalık, 3,5 kg ağırlığında)
- Kristal serum albuminler (Domuz serum albumini Sigma A-2764, Sığır serum albumini Sigma A-8022, At serum albumini Sigma 9888)
- Freund's complete adjuvant, Sigma F-5881
- Freund's incomplete adjuvant, Sigma F-5506
- 0,15 M NaCl çözeltisi

Tavşanlardan antiserum elde etmek için ikişerli üç deney grubu oluşturuldu. Birinci gruptaki tavşanların herbirine 5 mg domuz, ikinci gruptaki tavşanların herbirine 5 mg at, üçüncü gruptaki tavşanların herbirine 5 mg sığır antijeni enjekte edildi. Örneğin birinci gruptaki tavşanların enjeksiyonu için 10 mg domuz antijeni 2 ml 0,5 M NaCl'ün içerisinde emülsifiye edildi. Bu emulsifiyon 2 ml Freund's complete adjuvantla enjektör içerisinde karıştırıldı. Toplam 4 ml emülsifiyenin 2 ml'si bir tavşana, 2 ml'si diğer tavşana enjekte edildi. Enjeksiyon tavşanlara 4 yerinden 0,5 ml intramuskular olarak uygulandı. At ve sığır antijenleri de aynı şekilde hazırlanarak diğer gruptaki tavşanlara enjekte edildi.

İmmünizasyona 4. 8. ve 12. haftalarda aynı işlemler tekrarlanarak devam edildi. Yalnız bu enjeksiyonlarda antijenler Freund's incomplete adjuvantı ile emülsifiye edilerek hazırlandı. Her enjeksiyondan 10 gün sonra tavşanlardan

intrakardial olarak tekniğine uygun bir şekilde 10 ml kan alınıp antikor titreleri ölçüldü. 12. hafta enjeksiyonu sonunda istenilen düzeyde antikor titresi elde edilemediği için 16. hafta enjeksiyonları yapıldı. Bu enjeksiyondan sonra yeterli düzeyde antikor titreleri olduğu saptanınca aynı gün tavşanlardan intrakardial olarak yaklaşık 25 ml kan alınarak immunizasyon işlemine son verildi. Bu kanlar geniş tüpler içerisine boşaltılarak yaklaşık 1-2 saat ortam ısısında bekletildi. Sonra, tüpler çizildi ve buzdolabında (+4° C) bir gece bekletilerek serumları ayrıştırıldı. Ayrılan serumlar 5 ml'lik tüplere alınarak 2500 x g. devirde +4° C de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra serumun üst kısmı başka tüplere alınarak ağzı kapatılıp -20° C de muhafazaya alındı.

3.3. Antikor titrelerinin ölçülmesi

Gerekli Malzeme

-Durheim tüpleri

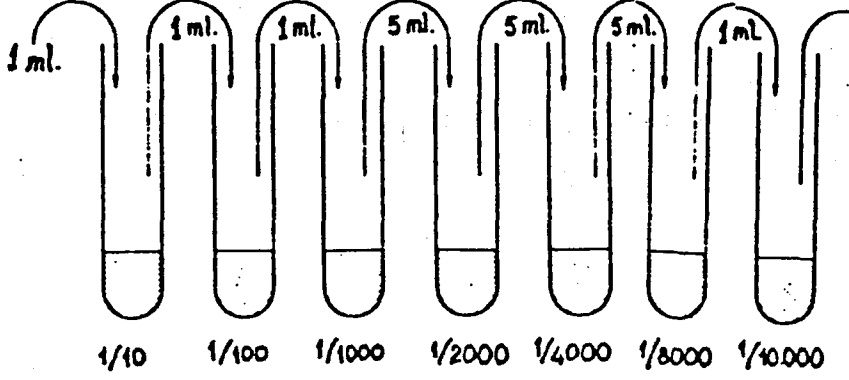
-Pastör pipetleri

-Domuz, at ve sığır antiserumları ile kan serumları

7 adet tüpün ilk üçüne 9'ar, daha sonraki 4 tüpe de 5'er ml serum fizyolojik kondu. Birinci tüpe 1 ml domuz kan serumu konularak 1/10'luk dilusyonu yapıldı. Bundan 1/100, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000 ve 1/10000'luk dilusyonlar hazırlandı (Şekil-3.1).

Daha sonra bu dilusyonlardan durheim tüplerine (yaklaşık tüpün 1/3 ne kadar) kondu. Üzerlerine konulan dilusyon sıvıları kadar domuz antiserumundan ilave edildi. Yanlış durheim tüplerine antiserum koyarken pastör pipetlerinin ucu tüpün dibine kadar batırıldı ve yavaş yavaş bırakıldı. Antiserumu koyarken dilusyon sıvısı ile antiserumların birbirlerine karışmamasına dikkat edildi. Daha sonra tüpler 37° C'de 20 dakika inkubasyona

Antiserum



Şekil-3.1: Serum dilusyonlarının hazırlanması

bırakıldı. 20 dakikanın sonunda tüpler siyah bir fon önünde değerlendirildi. Antiserumlar ile dilusyon sıvısı tabakası arasında belirgin gri bulanık halka oluşan en son dilusyon, o antikorun titresini olarak kabul edildi. Aynı işlem tavşanlardan elde edilen at ve sığır antiserumları içinde yapıldı.

Antikor titrelerinin tayini her immunizasyondan 10 gün sonra alınan bütün kan örneklerinde yapıldı. Antiserumların antikor titreleri Tablo-3.1 de gösterilmiştir.

3.4. Türe Özgü Antiserumların Elde Edilmesi

3.4.1. İmmunoadsorbant jel süspansiyonlarının hazırlanması

Kullanılan Solüsyonlar

- 1 mM HCl çözeltisi

(1 mM HCl asit hazırlamak için $36,47/1,19 \times 0,367 = 83,5$ ml/: $1000 = 0,00835$ ml HCl alınıp litreye tamamlanır.)

Tablo-3.1: Antiserumların antikor titreleri

Enjeksiyon	Tavşan KODLAMA	Antikor Titreleeri							Titreler
		1/10	1/100	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/10.000	
I.Hafta	I Sığır(=)	+	+	⊕	-	-	-	-	1/1000
	I Sığır (-)		Y A	P I	L M	A D	I		Y
	I Domuz (=)		T İ	T R A	S Y O	N	V E R	M E D İ	T.V
	I Domuz (-)		Y A	P I	L M	A D	I		Y
	I At (=)								
	I At (-)	+	Y A	P I	L M	A D	I		1/4000
4.Hafta	II Sığır (=)	+	+	+	⊕	-	-	-	1/2000
	II Sığır (-)		T İ	T R A	S Y O	N	V E R	M E D İ	T.V
	II Domuz (=)	+	+	+	⊕	-	-	-	1/2000
	II Domuz (-)	+	+	+	⊕	-	-	-	1/2000
	II At (=)	+	+	+	+	⊕	-	-	1/4000
	II At (-)	+	+	+	+	⊕	-	-	1/4000
8.Hafta	III Sığır (=)	+	+	+	+	+	+	⊕	1/10.000
	III Sığır (-)	+	+	+	+	+	⊕	-	1/8000
	III Domuz (=)	+	+	+	⊕	-	-	-	1/2000
	III Domuz (-)	+	+	+	⊕	-	-	-	1/2000
	III At (=)	+	+	+	+	+	+	⊕	1/10.000
	III At (-)	+	+	+	+	+	⊕	-	1/8000
12.Hafta	IV Sığır (=)	+	+	+	+	+	⊕	-	1/8000
	IV Sığır (-)	+	+	+	+	+	⊕	-	1/8000
	IV Domuz (=)	+	+	+	+	⊕	-	-	1/4000
	IV Domuz (-)	+	+	+	+	⊕	-	-	1/4000
	IV At (=)	+	+	+	+	+	⊕	-	1/8000
	IV At (-)	+	+	+	+	+	⊕	-	1/8000
16.Hafta	V Sığır (=)	+	+	+	+	+	+	⊕	1/10.000
	V Sığır (-)	+	+	+	+	+	+	⊕	1/10.000
	V Domuz (=)	+	+	+	+	+	⊕	-	1/8000
	V Domuz (-)	+	+	+	+	+	⊕	-	1/8000
	V At (=)	+	+	+	+	+	⊕	-	1/8000
	V At (-)	+	+	+	+	+	+	⊕	1/10.000

- Kaplayıcı solüsyon (0,1 M NaHCO₃; 0,5 M NaCl pH:8,3)

(8,401 gr NaHCO₃ ve 29,225 gr NaCl tartılıp balon joje içerisinde distile suda eritilip litreye tamamlanır. Litreye tamamlanmadan önce 0,1 M asit veya alkali ile pH'sı 8,3'e ayarlanır.)

- 0,1 M Tris-HCl solüsyonu pH:8,0

(12,114 gr Tris 800 ml distile suda iyice eritilir. 1 M HCl asit ile pH sı 8,0'e ayarlanır. Distile su ile litreye tamamlanarak +4°C de muhafaza edilir.)

- 0,1 M Sodyum klorürlü asetat solüsyonu pH: 4,0

(8,203 gr Na-Asetat, 29,229 gr NaCl balon jojeye tartılıp yaklaşık 800 ml distile suda eritilir. 0,1 M HCl ile pH'sı 4,0 e ayarlanarak litreye tamamlanır.)

- 0,1 M Sodyum klorürlü Tris solüsyonu pH:8,0

(12,114 gr Tris 29,229 gr NaCl balon joje içinde yaklaşık 800 ml distile su ile eritilir. pH'sı 0,1 M HCl asit ile 8,0'e ayarlanıp litreye tamamlanır. +4°C de muhafaza edilir.)

- CNBr-aktifli sefaroze 4B (Pharmacia 52-1153-00)

- Domuz, at ve sığır kristal albuminleri

Her kolon için 3 gr lyofilize CNBr- aktifli sefaroze 4B, 250 ml lik beherglas içerisine tartıldı ve üzerine 1 mM HCl asitten 50 ml konarak yaklaşık 5 dakika süspanse edildi. Bu jel 3 nolu cam filtre içerisine aktarılarak 1 mM HCl asit çözeltisi ile 15 dakika kadar yıkandı. Yıkama sırasında her gr sefaroze için 200 ml 1 mM HCl asit çözeltisi kullanıldı. Yıkama işleminden sonra jel yine beherglas içine alındı. Diğer taraftan her ml jel için 5-10 mg domuz antijeni 15 ml kaplayıcı solüsyon içerisinde çözündürüldü. Bu çözelti daha önce hazırlanan jel halindeki CNBr- aktifli sefaroze 4B üzerine eklenerek karıştırıldı. Karıştırma

işlemi oda ısısında schaecker üzerinde 2 saat sürdürüldü. Bu zaman sonunda jel tekrar cam filtre içine alınarak bağlanmayan antijenler vakum altında kaplayıcı solüsyon ile yıkanarak uzaklaştırıldı (Resim-3.1). Yıkamadan sonra geri kalan aktif gruplar 0,1 M Tris HCl (pH:8,0) çözeltisi ile vakum altında oda ısısında 2 saat yıkandı. Daha sonra jel 100 er ml 0,1 M Asetat ve 0,1 M Tris çözeltisi ile yıkandı. Asetat ve tris çözeltileri ile jelin yıkanma işlemi 2 kez daha tekrarlandı. Aynı şekilde at ve sığır antijenleri de CNBr-aktifli sefaroze 4B ile birleştirilerek hazırlandı. Hazırlanan ürünler kolonlara dolduruldu.

3.4.2. Kolonların doldurulması

Gerekli Malzeme

- Domuz, at, sığır antijenleri ile birleştirilmiş CNBr-sefaroze 4B jel süspansiyonları
- 10 ml kapasiteli kolonlar ve aksesuarları (Pharmacia 19-5002-01 Column C 10/20)
- Fosfat buffer saline (PBS) pH:7,2

(8.75 gr NaCl (0.15 M) ile 3.58 gr Na₂HPO₄ (0.01 M) bir litre distile suda eritilerek A solusyonu hazırlanır. 4.36 gr NaCl (0.15 M) ile 0.69 gr NaH₂PO₄ (0.01 M) 500'ml distile suda eritilerek B solüsyonu hazırlanır. Daha sonra 500 ml'lik B çözeltisi bir litrelik A çözeltisine yavaş yavaş aktarılarak pH'sı 7,2 ye ayarlanır).

Domuz, at, sığır antijenleri ile birleştirilmiş CNBr- sefaroze 4B jel süspansiyonları üzerine 1 ml PBS solüsyonu konarak jeller sulandırıldı. Ucu kırık bir pipet yardımıyla jellerin tamamı ayrı ayrı kolonlara aktarıldı. Kolonlar 10 ml kapasite çizgisine kadar PBS ile tamamlanarak dengelendi ve +4° C de bir gece bekletilerek jelin tamamen çökmesi sağlandı ve böylece kolonlar saflaştırmaya hazır hale getirilmiş oldu. (Resim-3.3)

3.4.3. Antiserumların saflaştırılması

Gerekli Malzeme

- Dializ torbası (Sigma 250 -9U)
- Polyethene Tubing (Pharmacia 2030-930)
- Jel ile doldurulmuş kolonlar
- Domuz, at, sığır antiserumları
- +4° C'lik soğutmalı santrifüj
- Phospat buffer saline (PBS) pH: 7.2
- Glisin-HCl solüsyonu pH: 2,5

(7.51gr glisin 800 ml distile suda eritilir. 1 M HCl asit ile pH'sı 2,5 ayarlanır. Distile su ile litreye tamamlanır +4° C de saklanır.)

- 1 M Tris-HCl pH: 8,6

(121, 14 gr Tris 800 ml distile suda iyice eritilir. 1 M HCl asit ile pH'sı 8,6'ya ayarlanır ve litreye tamamlanır. +4°C de saklanır.)

Affinite kromatografi yöntemiyle antiserumların saflaştırılması işleminde ilk iş sistemin kurulması oldu.

1.10 ml kapasiteli jellerle dolu olan kolonlar kullanılarak düzenek kuruldu (Resim-3.4).

2.Peristaltik pompanın kalibrasyonu 15 . ml/saat olacak şekilde ayarlandı.

3.Bunu takiben UV spektrofotometre, rekorder ve fraksiyon kollektörün önce ayarlarının sıfırlanması yapıldı ve daha sonra spektrofotometre 280 nm,

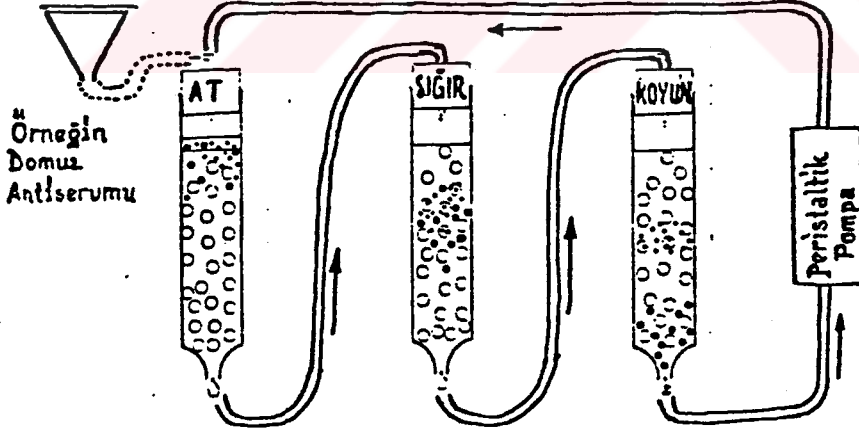
rekorder mV'u 50'ye, hızı 2 cm/dakikaya, fraksiyon kollektör ise tüplere 5'er ml serum toplayacak şekilde ayarlandı (Resim-3.2).

4.Kolonların çevresinde +4° C'lik su dolaştıracak soğutma sistemi çalıştırıldı.

5.Jel ile dolu olan kolonlar tubing sistemiyle birbirlerine seri bağlandı ve kolonlar dengelendi. Sistemin son kez gerekli ayarlamaları yapılarak saflaştırma işlemine hazır hale getirildi.

6.Kolonun rezervuarına 4 ml PBS konarak sistemin çalışması kontrol edildi.

Domuz antiserumunu saflaştırmak için at ve sığır albuminleri içeren kolonlar birbirine tubinglerle seri paralel olarak bağlandı (Şekil-3.2).

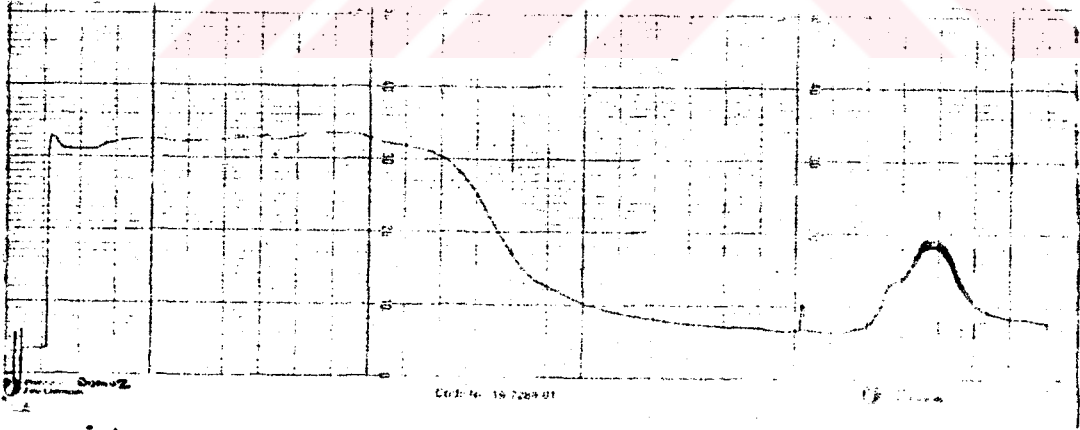


Şekil-3.2: Affinite kromatografide kolon düzeneği

Domuz antiserumundan 4 ml birinci kolonun üst kısmında bulunan rezervuara konarak peristaltik pompa 15 ml/saat hızla çalıştırıldı (Resim-3.5).

Bu sirkulasyon 48 saat boyunca devam ettirildi. 48 saat sonunda domuz antiserumu, domuz antijeni içeren kolona aktarıldı (Resim-3.6). Bu kolonda da 15 ml/saat hızla 24 saat sirkulasyon yapıldı. Bu süreç içerisinde domuza özgü antikorlar domuz antijenleri ile birleştirilmiş oldu. 24 saatin sonunda bu kolon UV spektrofotometreye (UV -1 Monitör 280 nm Pharmacia) bağlanarak protein konsantrasyonu optik dansiteye göre izlendi (Grafik-3.1).

Domuz antijenleri ile birleşmeyen proteinlerin (Grafik-3.1a) tamamının kolondan alınması için PBS ilave edilerek pik sıfırlandı (Grafik-3.1b). Pik sıfırlandıktan sonra Glisin-HCl (pH:2.5) solüsyonu kolona ilave edilerek birleşmiş antijen-antikor kompleksinden domuz antikorları ayrıştırılarak antikor varlığını gösteren piklere (Grafik-3.1c) ait serumlar kollektörden toplandı. Antikor piklerine ait protein konsantrasyonu sıfıra düşüncüye (Grafik-3.1d) kadar Glisin-HCl solüsyonu ilavesine devam edildi.



Grafik -3.1: Serumun kromotografide ayrıştırılması sırasında elde edilen pikler

Daha sonra kolonları nötralize etmek için Tris-HCl (pH 8,6) solusyonu kolonlardan geçirilerek (peristaltik pompa 20 ml/saat hıza ayarlı) yıkandı. Yıkama işlemine kolonlardan çıkan süzüntünün pH'sı 8,6 oluncaya kadar devam edildi. Nötralize edilen kolondan PBS geçirilerek pH'sı 7,2 ye ayarlandı. pH 7,2'ye ulaşan kolon 10 ml kapasite çizgisine kadar PBS ile dengelenip +4° C'de diğer antiserumları saflaştırmak amacı ile muhafaza altına alındı.

Diğer taraftan kollektörden toplanan domuz antikorlarını içeren ekstrakt derhal dializ torbasına kondu. Dializ torbası ise manyetik karıştırıcı üzerinde içinde 2 litre PBS bulunan beherglas içerisine konarak +4°C'de bekletildi. Bir saat sonra PBS değiştirildi ve yeniden 2 litre PBS içerisinde dialize devam edildi. Bir saat sonra bu işlem tekrar edildi.

En son konulan PBS içerisinde +4° C de bir gece dialize bırakıldı. Ertesi gün dializ torbası içinden alınan ekstrakt tüpe aktarılıp +4°C de 3000 x g. devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üste kalan tortusuz berrak kısım 0.1 ml porsiyonlar halinde ELISA'da kullanılmak üzere -20° C muhafaza altına alındı.

Aynı şekilde at ve sığır antiserumlarında saflaştırılarak elde edilen saf antikorlar 0.1 ml porsiyonlar halinde -20°C depolandı.

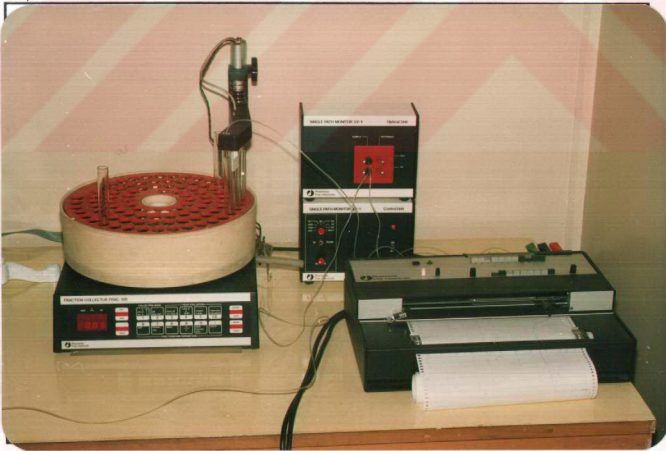
3.4.4. Monospesifik antikorların titrelerinin ölçülmesi

Saflaştırılmış antikorların titreleri ELISA ile ölçüldü. Deneyin yapılış şekli 3.7 nolu kısımda geniş olarak açıklanmıştır.

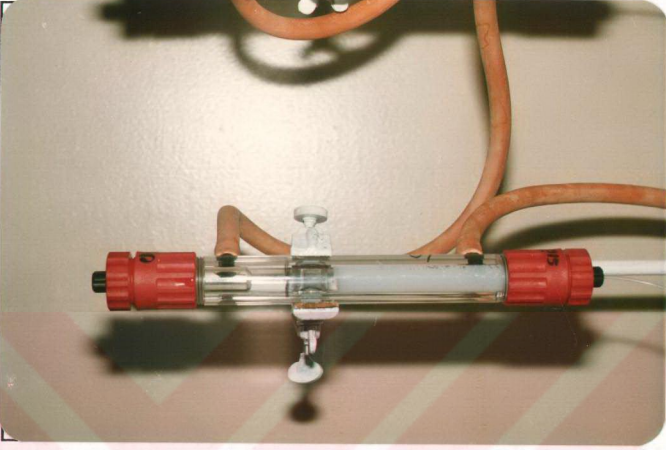
Resim-3.1: Jelin vakum altında yıkanma şekli



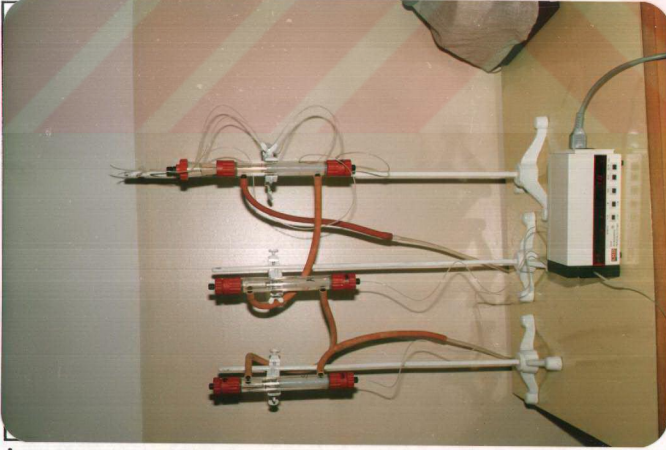
Resim-3.2: Fraksiyon kollektör, UV monitör, Rekorderin kuruluş şekli



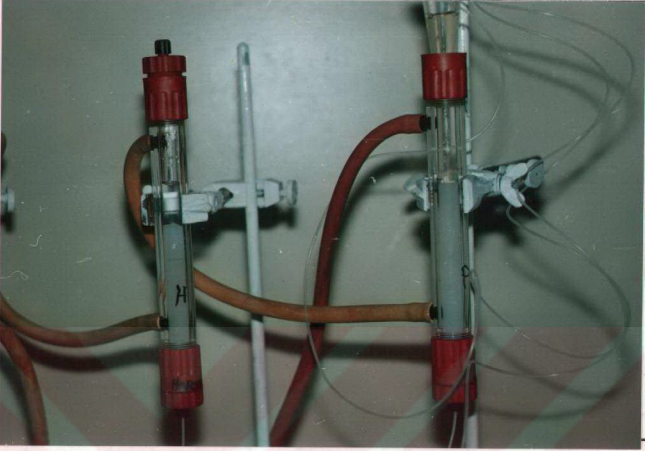
Resim-3.3: Jel doldurulmuş kolon



Resim-3.4: Affinite kromatografide kolon düzenegi



Resim-3.5: Antiserumun diğ er hayvanların antijenlerini içeren kolonlardan geç irilmesi



Resim-3.6: Antiserumun kendi antijenini içeren kolonlardan geç irilmesi



3.5. Numune Ekstratlarının Hazırlanması

Gerekli Malzeme

- Sucuk numuneleri
- Phosphat buffer saline (PBS) çözeltisi pH:7,2 (0,01 M Na₂HPO₄, 0,01 M NaH₂PO₄, 0,15 M NaCl)
- 10.000 devirli santrifüj
- Stomacher
- Whatman No:3 filtre kağıdı

İki ayrı parti halinde yapılan deneysel sucuklardan her bir yapım için 3 ayrı sucuk örneği analize tabii tutuldu. Her örnekten 20 gr alınarak 80 ml PBS içerisinde homojenize edildikten sonra 3000 x g. 30 dakika santrifüj edildi. Daha sonra ekstraktın üst kısmı Whatman No: 3 filtre kağıdından süzülerek yağlarından ve kaba partiküllerinden uzaklaştırıldı. Bu et ekstraktları ELISA' da kullanılmak üzere -20° C'de 1 ml'lik porsiyonlar halinde depolandı.

3.6. İndirekt Kompetatif ELISA

Gerekli Malzeme

- ELISA mikropalakaları (U form polystrene microtiterplate Dynatec Typ 24 A)
- ELISA okuyucusu (Titertek Multiscan Plus)
- Mikropalaka yıkayıcısı (Multiwash Flow Lab.)
- Mikropipet uçları
- Otomatik çok kanallı pipet (Titertek Flow Lab.)
- Monospesifik at, domuz ve sığır antiserumları
(Titresi kadar PBST içerisinde sulandırılacak)

- Numune et ekstraktları

- 50 µl sinde 10 ng dan 10 mg kadar olan (10 ng, 100 ng, 1 µg, 10 µg, 100 µg, 1 mg, 10 mg) PBST içerisinde hazırlanmış standart domuz ve at antijen solüsyonları

- Kaplayıcı tampon içerisinde 5 µg ml⁻¹ oranında hazırlanmış at ve domuz antijenler solüsyonları

- Distile suda 10 mg ml⁻¹ oranında hazırlanmış yağsız süttozu proteini (YSP).

- Kaplayıcı tampon solüsyonu pH: 9,6. (0,05 M NaHCO₃, 0,05 M Na₂CO₃)

(5,3 gr Na₂CO₃ ve 4,0 gr NaHCO₃ ayrı ayrı erlenmayerlerde 1 lt suda eritilerek 0,05 M 'lık solüsyonları hazırlanır. Daha sonra NaHCO₃ solüsyonu Na₂CO₃ solüsyonu üzerine yavaş yavaş eklenerek pH: 9,6 ya düşürülür)

- Tween 80'li fosfat tampon çözeltisi (PBST) pH: 7,2 (0,01 M Na₂HPO₄, 0,01 M NaH₂PO₄, 0,15 M NaCl)

(Daha önce hazırlanışı açıklanan PBS içerisine, 5 mg ml⁻¹ oranında Tween 80 ilave edilerek hazırlanır.)

- Substrat solüsyonu

(0,1 M Na-sitrat (pH: 4,0) içerisine 0,15 µl ml⁻¹ H₂O₂ ve 0,8 mg ml⁻¹ O-fenilendiamin dihidroklorid (Sigma P 1526) ilave edilerek hazırlanır.)

- Konjugat (Horseradisch Peroxidaz Goat antirabbit Immunoglobulin (Sigma 8275)

Prospektüsünde yazılı titresi kadar PBST içerisinde hazırlanır.

- % 12,5 luk H₂SO₄ solüsyonu

ELISA testinin yapılışı

1- Mikrotitrasyon plakaların hazırlanması

Bu amaçla mikrotitrasyon plakalarının oyuklarına kaplayıcı tamponda hazırlanmış domuz ve at antijenlerinden 375 µl kondu. Oda ısısında 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra plaka boşaltılarak kaplayıcı tampon ile 3 kez yıkanıp kurutuldu (Resim- 3.7). Daha sonra 10 mg ml⁻¹ yağsız süttezu içeren solüsyondan 375 µl bütün oyuklara konarak 30 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra mikropalakalar boşaltıp kurutulurak teste hazır hale getirildi.

2- PBST ile ikili dilüsyonları hazırlanmış test örneklerinden ve aranan hayvan etine özgü monospesifik serumdan her oyuğa 50'şer µl kondu. Plakanın ilk 8 oyduğuna ise numunelerin yerine aranan hayvan türüne ait standart antijenin onlu dilüsyon solüsyonları ve antiserumdan 50'şer µl kondu. Oda ısısında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda mikropalaka boşaltılarak PBST ile enaz 5 kez yıkandı ve kurutuldu.

3- 1:1000 titreli konjugattan plakanın oyuklarına 100'er µl konarak 10 dakika inkübe edildi ve sonunda plaka boşaltılıp yine PBST ile 5 kez yıkanıp kurutuldu.

4- Substrat solüsyonundan plakanın oyuklarına 100'er µl kondu ve 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.

5- % 12,5 luk H₂SO₄ solüsyonundan 50'şer µl oyuklara konarak reaksiyon durduruldu.

ELISA okuyucusu (Resim-3.8) ile 492 nanometrede plakada oluşan rengin absorbans değerleri ölçüldü ve sonuçlar değerlendirildi. Yanlız absorbans değerler ölçülmeden önce boş bir plakaya substrat ve sülfürik asit konup kör ölçümler yapılarak ELISA okuyucusu sıfırlandı.

Şekil - 3.3: İndirekt kompetatif ELISA ile etlerin idendifikasyon metodu

SOLID FAZ: Kaplayıcı tampon (pH:9,6) içinde hazırlanmış antijenler ile (375 µl) plaka kaplanır. İnkubasyon 3 saat 20°C de

3 kez yıkama
Kaplayıcı tamponla pH:9,6

HETEROLOG ANTİJEN: Yağsız süt tozu proteini ile (375 µl) plaka kaplanır. İnkubasyon 30 dak. 20°C

Kurutma, depolama
+4°C

1.ANTİKOR ve ET ÖRNEĞİ: PBST içerisinde hazırlanmış monospesifik antikorlar ile numune 50 şer µl konur. İnkubasyon 10 dak. 20°C

5 kez yıkama
PBST pH:7,2

2.ANTİKOR -PBST içerisinde dilue edilmiş konjugat 100 µl konur. İnkubasyon 10 dak. 20°C

5 kez yıkama
PBST ile

ENZİM SUBSTRAT : 100 µl substrat solüsyon ilavesi. İnkubasyon 10 dak. 20°C
Reakstyon durdurulur.

OKUMA
Absorbans değerler)

Renk Koyuluğu
Negatif

Renk Açıklığı
Pozitif

3.7- Monospesifik antikorların titrelerinin indirekt ELISA ile saptanması

Gerekli Malzeme

ELISA için gerekli olan 3.6. nolu kısımda yazılı malzemeler

Şekil-3.4'deki gibi bölümlere ayrılan plakanın oyuklarına at, domuz ve sığır antijen solüsyonlarından 375 µl kondu. Oda ısısında 3 saat inkube edildikten sonra boşaltılıp kaplayıcı solüsyonla 3 kez yıkandı ve kurutuldu.

Antiserumlar						Dilüsyonlar
SİĞİR		AT		DOMUZ		
+	+	+	+	+	+	1/2
+	+	+	+	+	+	1/4
+	+	+	+	+	+	1/8
+	+	+	+	+	+	1/10
+	+	+	+	+	+	1/20
+	+	+	+	+	+	1/40
+	+	+	+	+	+	1/80
+	+	+	+	+	+	1/100
+	+	+	+	+	+	1/200
-	-	+	+	+	+	1/400
-	-	+	+	-	-	1/800
-	-	-	-	-	-	1/100

Şekil-3.4 : Monospesifik antiserumların titrelerinin ölçüm şeması

Yağsız süt tozu proteini içeren solüsyondan bütün oyuklara 375 µl kondu ve 30 dakikalık inkubasyondan sonra boşaltılıp kurutuldu. Daha sonra her oyuğun başından başlayarak aşağıya doğru olmak üzere kendi antijenine özgü antikörlerin ikili dilüsyon sıvılarından 100 er µl konarak oda ısısında 10 dakika inkube edildi. Inkubasyondan sonra plaka boşaltılıp PBST ile 5 kez yıkanarak kurutuldu. Konjugattan 100 µl bütün oyuklara konarak 10 dakika oda ısısında inkube edildi. Inkubasyondan sonra yine mikropIaka boşaltılıp PBST ile 5 kez yıkanıp kurutuldu. Substrat solüsyonundan 100 µl bütün oyuklara konularak 10 dakika inkube edildi. % 12,5'luk H₂SO₄ solüsyonu ile bu zaman sonunda reaksiyon durduruldu. Spektrofotometrede 492 nanometrede optik dansiteleri ölçüldü. Optik dansite değerlerinde aniden düşüş olan ve renk reaksiyonun zayıfladığı en son dilüsyon o antiserumun titresi olarak kabul edildi. Antiserum titre sonuçları bulgular kısmında verilmiştir.

Şekil-3.5: Monospesifik antiserum titrelerinin indirekt ELISA ile belirlenmesi

SOLID FAZ: Kaplayıcı tampon (pH:9,6) içinde hazırlanmış antijenler ile (375 µl) plaka kaplanır. Inkubasyon 3 saat 20°C

3 kez yıkama
Kaplayıcı tamponla pH:9,6

HETEROLOG ANTİJEN: Yağsız süt tozu proteini ile (375 µl) plaka kaplanır.

İnkubasyon 30 dak. 20°C
Kurutma

1.ANTİKOR: PBST içerisinde hazırlanmış monospesifik antikorlar (100µl) ile plaka kaplanır. Inkubasyon 10 dak. 20°C

5 kez yıkama
PBST pH:7,2

2.ANTİKOR: PBST içerisinde dilue edilmiş konjugat 100 µl konur. Inkubasyon 10 dak. 20°C

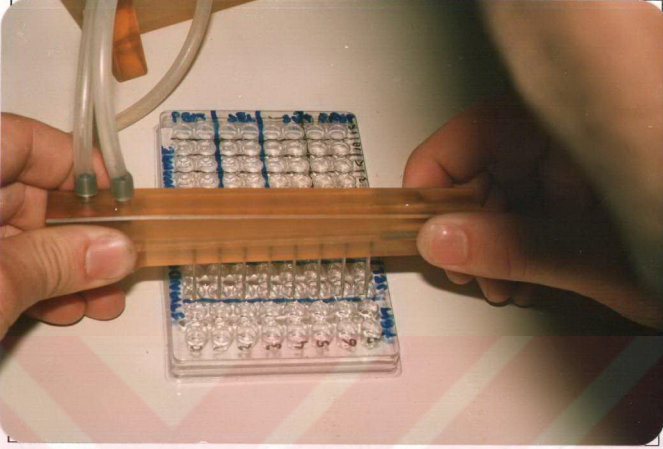
5 kez yıkama
PBST pH:7,2

ENZİM SUBSTRAT: 100 µl substrat ilavesi. Inkubasyon 10 dak. 20°C
Reaksiyon durdurulur.

OKUMA
Absorbans değerler)

Renk Koyuluğu
Negatif

Renk Açıklığı
Pozitif

Resim-3.7: Mikroplakaların yıkanması**Resim-3.8: ELISA okuyucusu**

4.BULGULAR

ELISA için optimizasyon koşulları

ELISA'da kullanılan monospesifik antiserumların titrelerinin tesbiti, mikropalakaya saf kristal antijenler kaplamak suretiyle yapıldı. Antikorların kendi antijenleri ile yoğun renk oluşturdukları en son antiserum dilusyonlarından bir önceki dilusyon o antiserumun titresini olarak kabul edildi. Titreleler sırasıyla sığır antiserumu için 1 : 100, at antiserumu için 1 : 500, domuz antiserumu için 1 : 200 olarak tesbit edildi. Enzim işaretli ikinci antikor olan konjugatın (Horseradisch Peroksidaz Goat antirabbit Immunglobulin) titresini ise firmanın belirlediği 1 : 1000 düzeyinde kullanıldı. Et örnekleri karışımlarının (% 1,3,5,10 ve 15) ELISA testinde uygun dilusyonların 1:10 -1:640 arasında olduğu tesbit edilmiş olup bütün karışımlarda en iyi okumaların yapıldığı dilusyonlar 1:10-1:40 olarak bulundu (Tablo -4.2).

Araştırmada konjugattan ve 1. antikorlardan kaynaklanan kross reaksiyonları önlemek amacıyla heterolog protein olarak yağsız süt proteini (YSP) 10 mg ml⁻¹ konsantrasyonunda kullanıldı (Grafik-4.1).

Çalışmada türler arasında kross reaksiyonlarının olup olmadığını tesbit etmek için sığır ve at antijenleri üzerine domuz antiserumu (Grafik-4.2), sığır ve domuz antijenleri üzerine at antiserumu (Grafik-4.3) konarak ELISA'da optik dansite değerleri ölçüldü. Farklı iki antijenin üzerine konan oyuklarda renk oluşmadığı ve düşük optik dansite değerler verdiği, homolog antijenleriyle ise koyu renk oluşumu ve yüksek optik dansite değerleri verdiği gözlemlendi. Saflaştırarak kullandığımız monospesifik antiserumlar türüne özgü antijenler dışındaki albuminleri ile çapraz reaksiyon göstermemiştir.

Tablo-4.2: Örneklerdeki dilusyonların standart grafiğine göre okunabilirlikleri

At II. Yapım

1. Örnek

	%1	%3	%5	%10	%15
1/640	-	-	-	+	+
1/320	-	-	-	+	+
1/160	-	-	+	+	+
1/80	-	-	+	+	+
1/40	-	+	+	+	+
1/20	-	+	+	+	•
1/10	+	+	+	+	•
1/5	+	+	+	•	•

2. Örnek

	%1	%3	%5	%10	%15
-	-	-	-	+	+
-	-	-	-	+	+
-	-	+	+	+	+
-	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+

3. Örnek

	%1	%3	%5	%10	%15
-	-	-	-	+	+
-	-	-	+	+	+
-	-	+	+	+	+
-	-	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+

Domuz I. Yapım

1. Örnek

	%1	%3	%5	%10	%15
1/640	-	-	-	-	-
1/320	-	-	-	-	+
1/160	-	-	-	+	+
1/80	-	+	+	+	+
1/40	-	+	+	+	+
1/20	+	+	+	+	+
1/10	+	+	+	+	+
1/5	+	+	+	+	+

2. Örnek

	%1	%3	%5	%10	%15
-	-	+	+	+	+
-	-	+	+	+	+
-	+	+	+	+	+
-	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	•
+	+	+	+	•	•

3. Örnek

	%1	%3	%5	%10	%15
-	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	•
+	+	+	+	+	•

Domuz II. Yapım

1. Örnek

	%1	%3	%5	%10	%15
1/640	-	-	-	-	-
1/320	-	-	-	-	+
1/160	-	+	+	+	+
1/80	-	+	+	+	+
1/40	-	+	+	+	+
1/20	+	+	+	+	+
1/10	+	+	+	+	+
1/5	+	+	+	+	+

2. Örnek

	%1	%3	%5	%10	%15
-	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	•
+	+	+	+	•	•

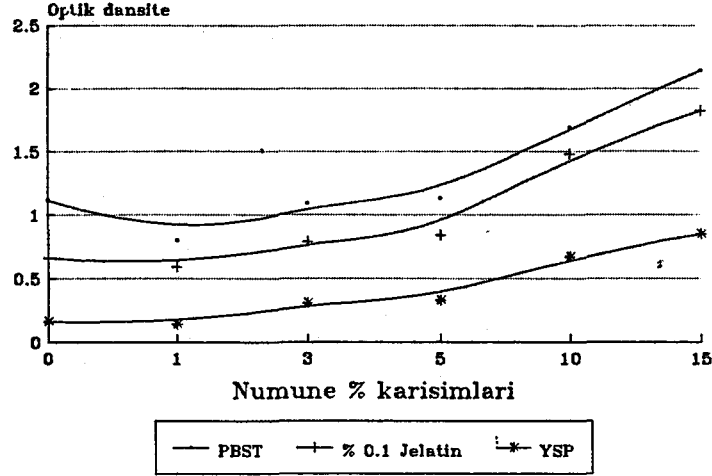
3. Örnek

	%1	%3	%5	%10	%15
-	-	+	+	+	+
-	+	+	+	+	+
-	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	•
+	+	+	+	+	•

-:Standart eğri içerisinde okunamayanlar

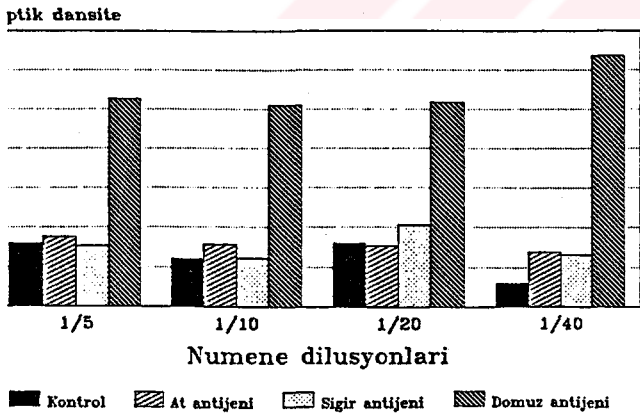
+:Standart eğri içerisinde okunanlar

• :Standart eğri içerisinde okunup miktarı belli olmayanlar



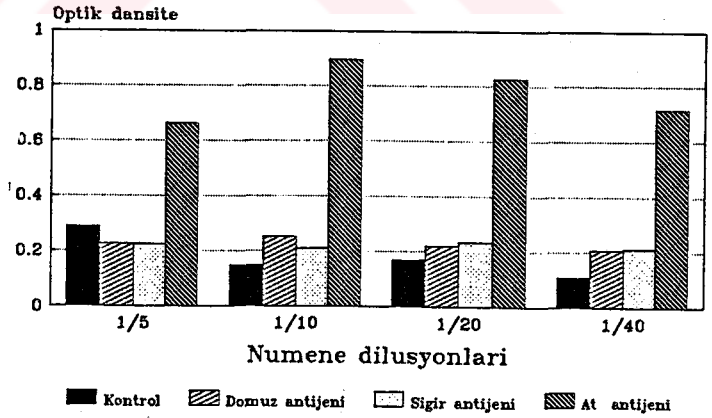
Grafik-4.1: Nonspesifik reaksiyonları önlemek amacıyla kullanılan PBST, % 0,1 jelatin ve YSP'de okunan optik dansite değerleri.

Domuz antikoru ile reaksiyon



Grafik-4.2: Domuz antikoru ile at ve domuz ve sığır etleri arasındaki kross reaksiyon

At antikoru ile reaksiyon



Grafik-4.3: At antikoru ile domuz ve sığır etleri arasındaki kross reaksiyon

Sucuk numunelerinde at ve domuz etlerinin araştırıldığı indirekt kompetatif ELISA' da yabancı etlerin varlığında sarı kahverengi rengin görülmemesi veya gittikçe rengin açılması karışımların varlığını ortaya koymuştur (Resim-4.1). Okumalar önce göz sonrada ELISA reader ile yapıldı. Araştırmada iki ayrı parti halinde üretilen deneysel sucuklardan her bir yapım için 3 ayrı sucuk numunesi analize tabii tutuldu. Analizlerde ELISA reader ile okunan optik dansite değerleri Tablo Ek-1 de ve grafik eğrileri Grafik-4. 4,5,6 ve 7 (b,d,f) de gösterilmiştir.

Testlerle birlikte, standart eğri oluşturmak için 0,01 μg ila 10 mg arasında (0,01 μg , 0,1 μg , 1 μg , 10 μg , 100 μg , 1mg, 10 mg) kristal at, domuz albuminleri kullanıldı ve indirekt kompetatif ELISA ile optik dansite değerleri ölçüldü. Günlük deney koşullarına bağlı olarak optik dansitelerin değişmesinden dolayı her numune analize tabii tutulurken domuz ve at antijen standartları yeniden hazırladı ve optik dansite değerleri ölçüldü. Domuz ve at antijen standartlarından okunan optik dansite değerleri Tablo-4.1 ve grafik eğrileri Grafik -4.4,5,6 ve 7 (a,c,e.) de gösterilmiştir. Bu standart eğrilerden, numunelerdeki karışım miktarlarının saptanmasında yararlanılmıştır. ELISA'da standart antijen olarak kristal albumin kullanılması örnekler arasında standardizasyonu sağlamak için tercih edilmiştir. Standartlara ait grafiklerde (Grafik 5,6,7,8) görüldüğü gibi test 0,1 μg - 100 μg arasında maksimum duyarlılığa sahiptir.

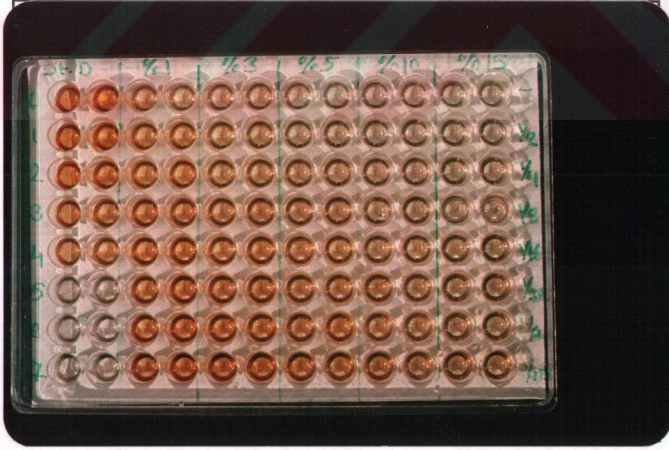
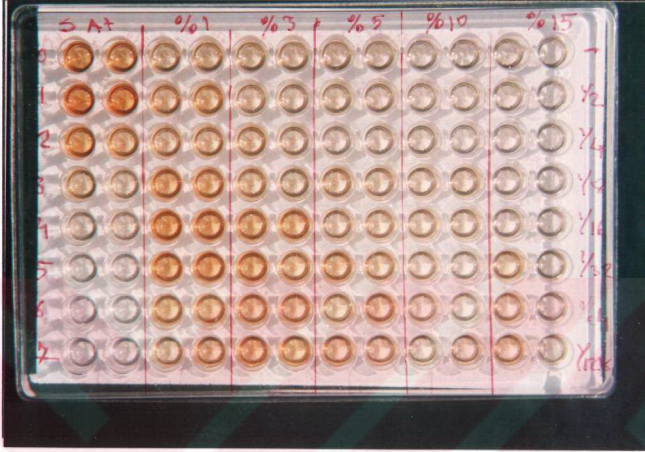
Tablo-4.1: Standart at ve domuz antijenlerinde okunan optik dansite değerleri

		I. YAPIM			II. YAPIM		
		A	B	C	A	B	C
AT	0	1,333	2,821	1,756	1,190	2,810	1,236
	0,01 µg	1,384	2,803	1,804	1,182	2,730	1,207
	0,1µg	1,372	2,710	1,824	0,870	2,640	1,189
	1µg	0,625	1,400	0,804	0,450	1,370	0,524
	10µg	0,336	0,750	0,399	0,362	0,780	0,412
	100µg	0,275	0,440	0,278	0,255	0,390	0,242
	1000µg	0,228	0,260	0,199	0,211	0,250	0,185
	10.000µg	0,220	0,270	0,195	0,209	0,230	0,185
DOMUZ	0	2,317	1,502	2,043	2,314	1,379	1,734
	0,01 µg	2,230	1,400	1,932	2,203	1,349	1,741
	0,1µg	2,284	1,484	1,941	2,269	1,281	1,519
	1µg	2,092	1,086	1,372	1,736	0,915	1,126
	10µg	1,338	0,766	1,005	0,309	0,685	0,862
	100µg	0,423	0,306	0,298	0,398	0,281	0,271
	1000µg	0,309	0,258	0,230	0,279	0,240	0,198
	10.000µg	0,299	0,270	0,232	0,317	0,268	0,237

A : 1. Örnek
B : 2. Örnek
C : 3. Örnek

Numune dilusyonlarında okunan optik dansite değerlerinin standartların maksimum duyarlılık sınırlarına göre okunabilirlikleri Tablo-4.2'de gösterilmiştir.

Resim-4.1: ELISA plakalarında yabancı etin varlığında görülen renk değişiklikleri



Tablo-4.2'de görüldüğü gibi % 1'lik karışım dahil bütün karışımlarda yabancı etlerin varlığı tesbit edilmiştir. Yine 1:10-1:40 dilusyonlar arasında bütün karışımların optik dansitelerinin okunabildiği görülmektedir.

Standartların optik dansite değerlerine göre numunelerdeki karışım miktarlarının hesaplanmasında optik dansite aralıkları için $Y=a+bx_{\log}$ formülü kullanılarak önce standartların doğru grafiği çizildi (Tablo-4.3).

Y: Optik dansite

a : Düzeltme katsayısı $a = \bar{y} - bx$

$$b : \text{Katsayısı } b = \frac{\sum (x.y) - [(\sum x . \sum y) / n]}{\sum x^2 - (\sum x)^2 / n}$$

Tablo-4.3: Standart eğrilerin $Y = a+bx$ doğru formülü ile hesaplanmasından sonraki optik dansite değerleri

	I. YAPIM				II. YAPIM		
	X	A	B	C	A	B	C
AT	-1	1,290	2,600	1,721	0,814	2,396	1,078
	0	0,786	1,620	1,009	0,560	1,662	0,783
	1	0,282	0,640	0,291	0,306	0,928	0,488
	2	—	—	—	—	0,194	0,193
DOMUZ	-1	—	1,487	1,947	2,418	0,980	1,584
	0	2,118	1,102	1,418	1,438	0,601	1,174
	1	1,284	0,717	0,889	0,580	0,222	0,764
	2	0,450	0,332	0,360	—	0,157	0,354

Not: Standartlardaki x ekseninde gösterilen antijen miktarlarının logaritması alınmıştır.

A: 1. Örnek

B: 2. Örnek

C: 3. Örnek

Örnek olarak eti karışımının olduğu 1. Yapım sucuklarına ait 1. örneğinde standart eğrinin doğru grafiği şöyle hesaplandı.

n	x	y	\bar{x}	x.y
1	-1	1,372	1	-1,372
2	0	0,625	0	0
3	1	0,363	1	0,363
$\Sigma 3$	$\Sigma 0$	$\Sigma 2,360$	$\Sigma 2$	$\Sigma -1,009$

$$\bar{y} = y/n \quad 2,360 : 3 = 0,786$$

$$\bar{x} = \Sigma x / n \quad 0 : 3 = 0$$

$$b = \frac{-1,009 - [(0 \cdot 2,360) / 3]}{2 - (0)^2 / 3}$$

$$b = ,0,504$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$a = 0,786 - (-0,504 \times 0)$$

$$a = 0,786$$

$$y = a + bx$$

$$\hat{y} = 0,786 + (-0,504x - 1)$$

$$\mathbf{y = 1,290}$$

$$y = 0,786 + (-0,504 \times 0)$$

$$\mathbf{y = 0,786}$$

$$y = 0,786 + (-0,504 \times 1)$$

$$\mathbf{y = 0,282}$$

Bu formül yardımıyla numunede y ekseninde okunan optik dansitelere karşılık gelen karışım miktarları ise $x_{\log} = a - y / b$ formülü ile hesaplandı.

Standartların doğru grafiklerinin hesaplanmasında elde edilen a ve b katsayı değerleri Tablo-4.4'de; numunelerdeki % karışımların okunabildiği optik dansite değerlerine göre $x_{\log} = a - y / b$ formülünden elde edilen x_{\log} değerleri ve sulandırma katsayıları ile elde edilen mg antijen miktarları Tablo Ek-1'de gösterilmektedir.

Tablo-4.4: Standartların doğru grafiklerinin hesaplanmasında elde edilen a ve b katsayı değerleri

	I. YAPIM			II. YAPIM			
		A	B	C	A	B	C
AT	a	0,786	1,620	1,009	0,560	1,662	0,783
	b	-0,504	-0,980	-0,712	-0,254	,0,734	- 0,295
DOMUZ	a	2,118	1,102	1,418	1,438	0,601	1,174
	b	-0,834	-0,385	-0,529	-0,980	-0,379	- 0,410

A: 1. Örnek
B: 2. Örnek
C: 3. Örnek

Numunelerde hesaplanan karışım miktarları ile olması gereken (%1, %3, %5,%10,%15) miktarlar arasında $t = x - \mu / S_{\bar{x}}$ formülü ile student t testi yapıldı ve sonuçlar Tablo-4.5'de sunuldu.

x = bulunan karışım miktarı

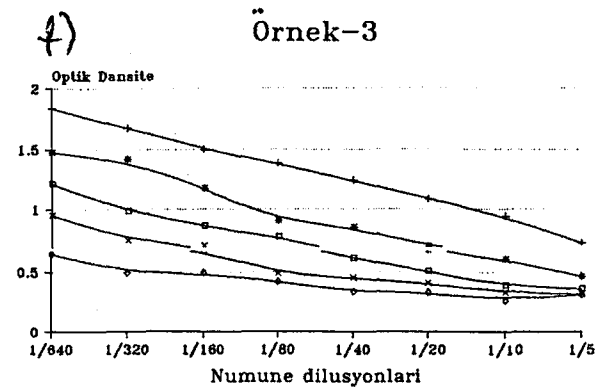
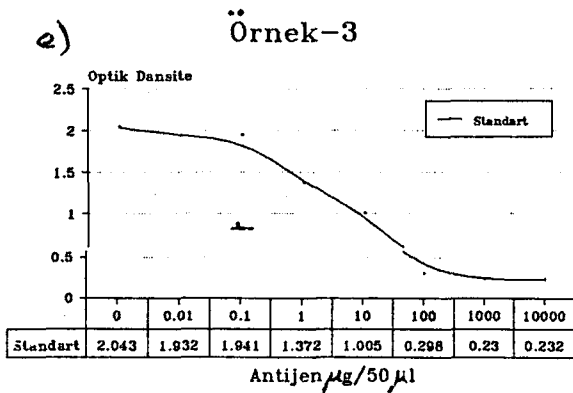
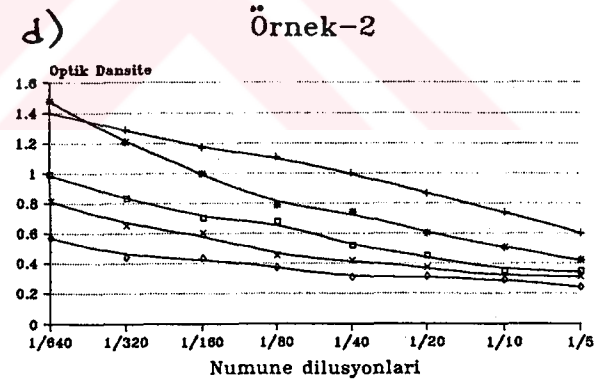
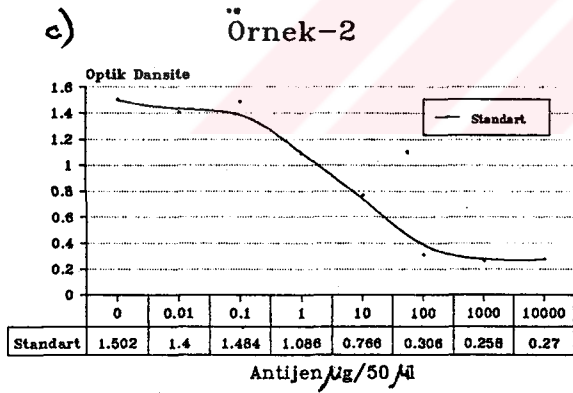
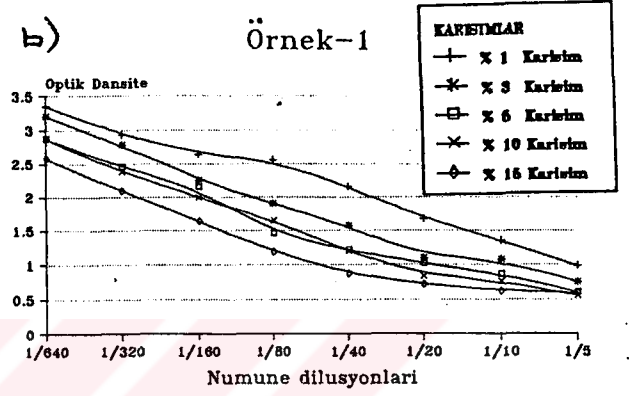
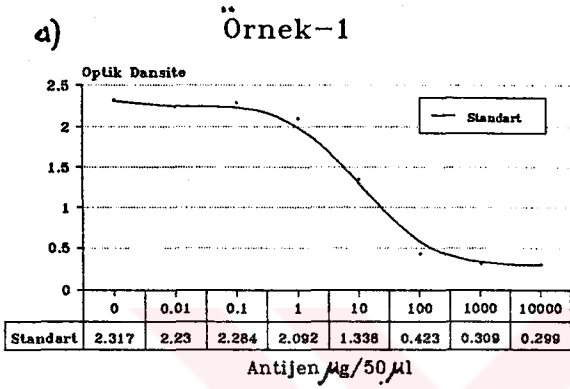
μ = beklenen karışım miktarı

$S_{\bar{x}}$ = Bulunan karışım miktarının standart hatası

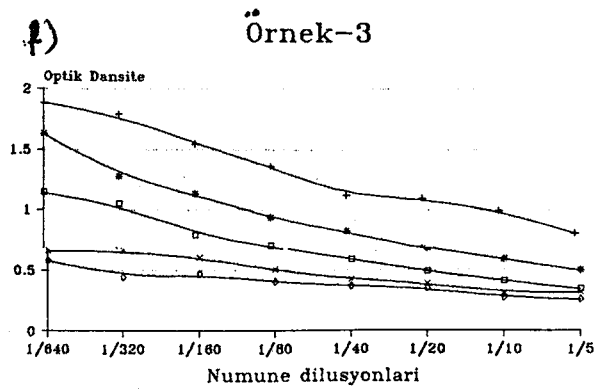
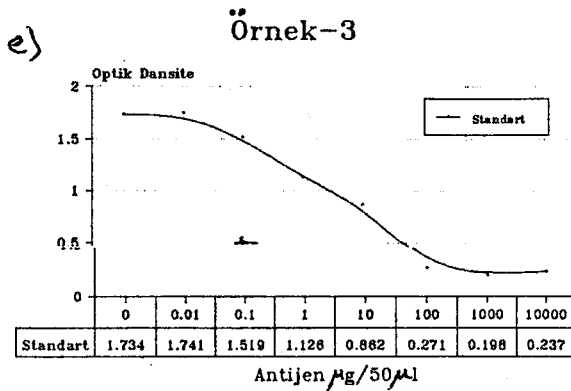
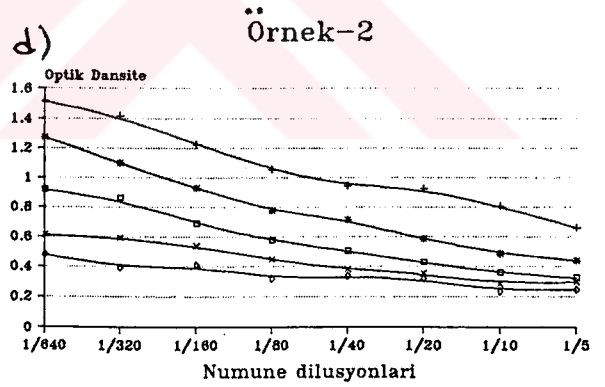
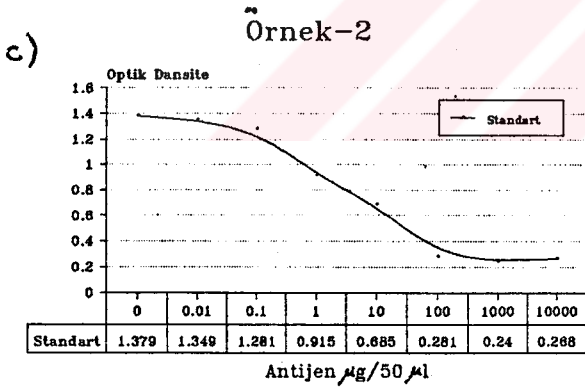
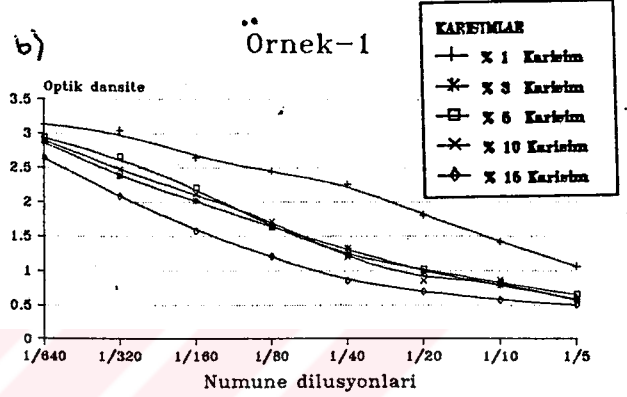
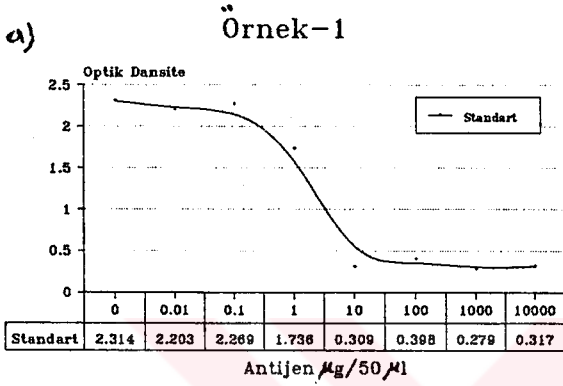
T testi sonuçlarına göre (Tablo-4.5) at etinin I. yapımına ait örneklerde hesaplanan miktarlar beklenen miktarlara göre ($p<0,01$) önemsiz bulunmuştur. II. yapımına ait örneklerde ise % 1,3 ve 5 karışımlarda ($p<0,01$) miktarlar önemli, % 10 ve 15 karışımlarda önemsiz bulunmuştur. Domuz eti karışımlarının 1. ve 2. yapımına ait örneklerinde ise yalnızca % 1'lik karışım miktarları beklenen miktarlardan ($p<0,01$) farklı bulunmuştur. Her iki et karışımına ait toplam örneklerin ortalamalarında ise % 1 ve 3'lük karışımlarda miktarlar ($p<0,01$) önemli bulunmuştur. Bu sonuçlar % 1-3 arasındaki karışımların tesbit edilebildiğini fakat bulunan miktarların önemli olabileceğini göstermektedir.



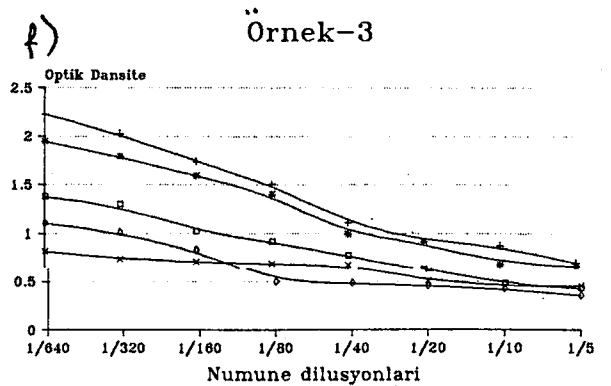
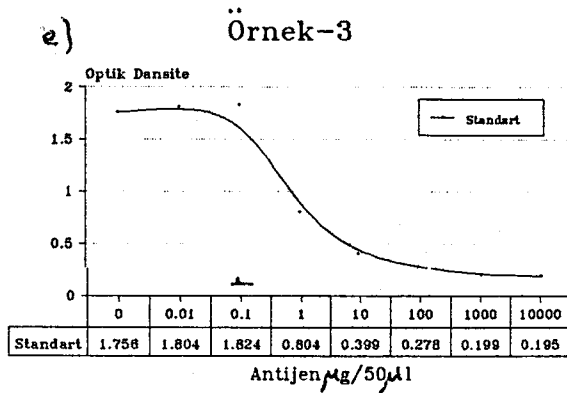
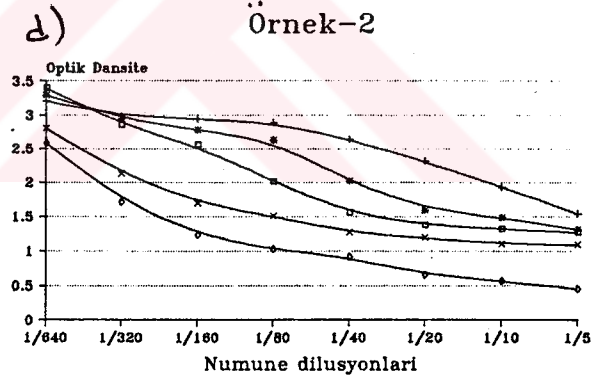
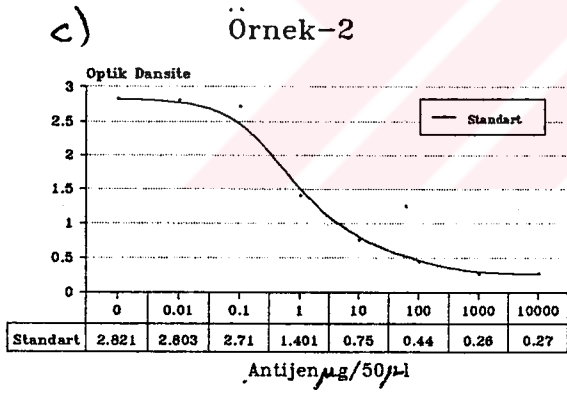
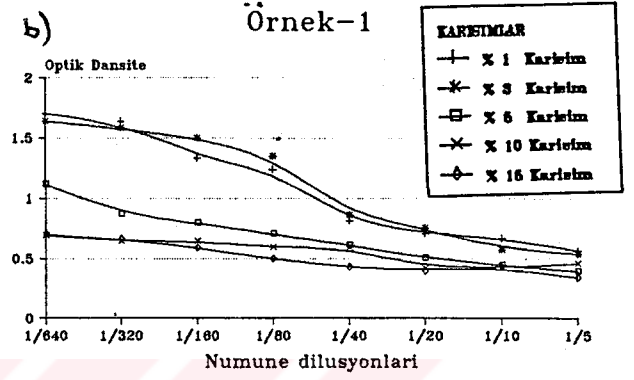
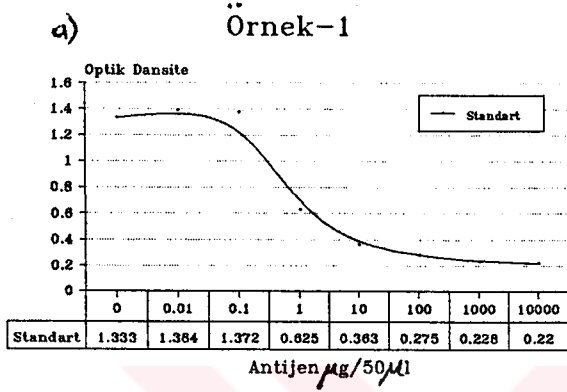
Grafik-4.4: Domuz, 1. yapıma ait örnekler ve standartlarda okunan optik dansite değerlerinin eğrileri



Grafik-4.5: Domuz, 2. yapıma ait örnekler ve standartlarda okunan optik dansite değerlerinin eğrileri

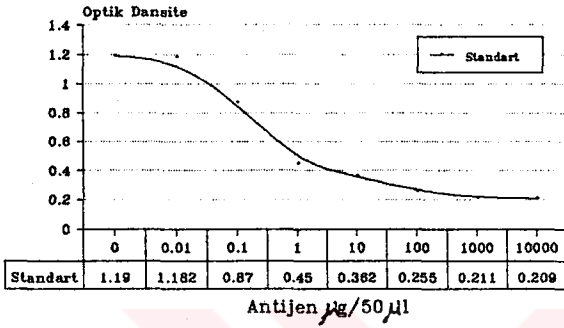


Grafik-4.6: At, 1. yapıma ait örnekler ve standartlarda okunan optik dansite değerlerinin eğrileri

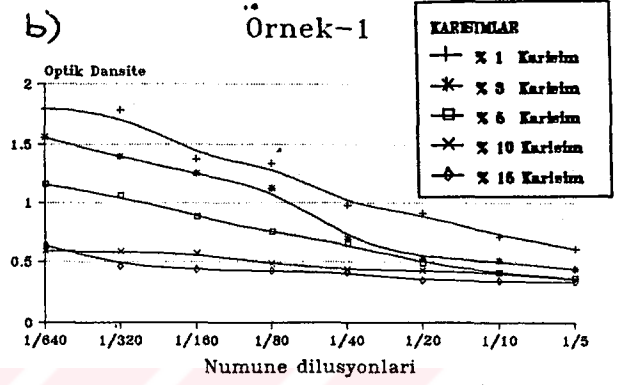


Grafik-4.7.: At, 2. yapıma ait örnekler ve standartlarda okunan optik dansite değerlerinin eğrileri

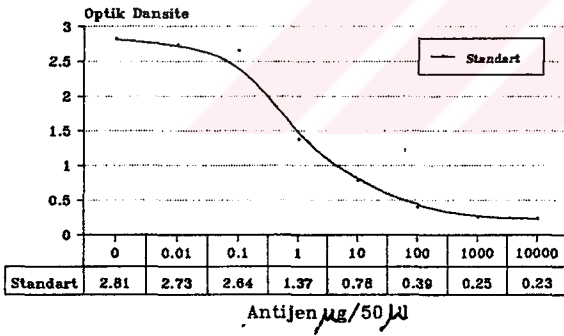
a) Örnek-1



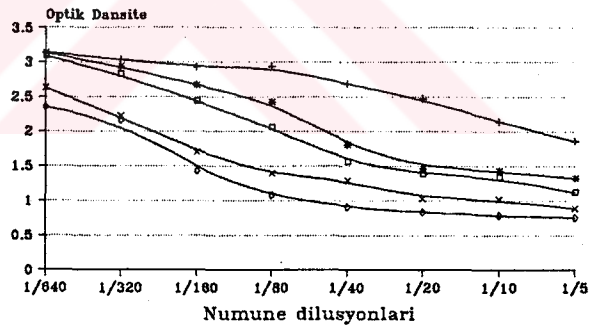
b) Örnek-1



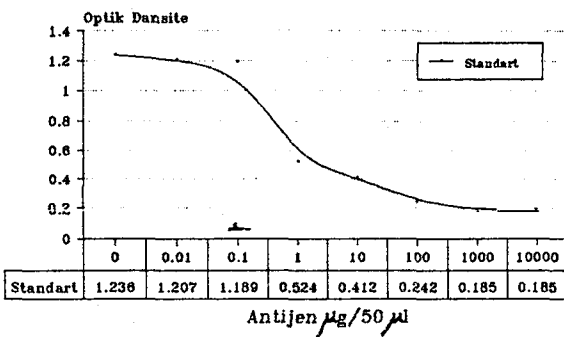
c) Örnek-2



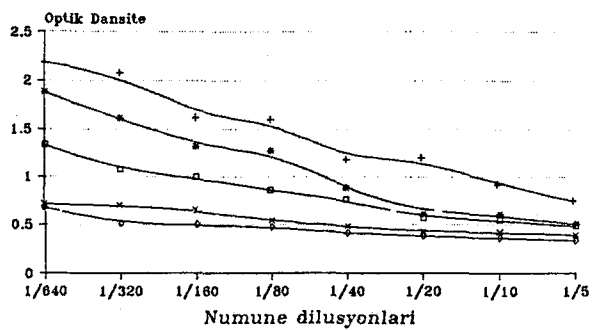
d) Örnek-2



e) Örnek-3



f) Örnek-3



Tablo-4.5: Örneklerde hesaplanan karşın miktarları, standart sapmaları ve beklenen miktarlar arasında yapılan t değeri sonuçları

	I. YAPIM			II. YAPIM			GENEL TOPLAM			AT-DOMUZ TOPLAM ORTALAMA		
	Beklenen mg.	n	$\bar{x} \pm Sx$	Sd:0,01,t	n	$\bar{x} \pm Sx$	Sd:0,01,t	n	$\bar{x} \pm Sx$	n	$\bar{x} \pm Sx$	Sd:0,01,t
AT	1	3	621 ±521	0,727 -	3	28 ± 7	138,857*	6	325 ±288	12	379 ±146	4,253*
	3	3	722 ±560	4,068 -	3	235 ± 69	40,072*	6	480 ±275	12	1110 ±346	5,462*
	5	3	3231 ±2711	0,623 -	3	322 ± 66	70,878*	6	1777 ±1376	12	3318 ±1138	1,478 -
	10	3	8945 ±7199	0,147 -	3	1949 ± 963	8,360 -	6	5447 ±3601	12	10334 ±3707	0,090 -
	15	3	9956 ±7873	0,641 -	3	4143 ± 2071	5,029 -	6	7050 ±3866	12	24393 ±9888	0,949 -
DOMUZ	1	3	746 ±17	14,941 *	3	123 ± 73	12,013*	6	434 ±143			
	3	3	2618 ±564	0,677 -	3	868 ± 608	3,509 -	6	1742 ±539			
	5	3	6858 ±2127	0,873 -	3	2858 ± 2400	0,892 -	6	4858 ±1690			
	10	3	18323 ±7590	1,096 -	3	12119 ± 11065	0,191 -	6	15221 ±6159			
	15	3	56540 ±25297	1,642 -	3	26934 ± 24809	0,482 -	6	41737 ±17173			

* Fark Önemli
• p<0,01

12<0,01t = 9,925
6<0,01t = 4,032
01<0,01t = 3,106

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Fermente Türk sucuklarında domuz ve at etinin tesbiti için alternatif olarak indirekt kompetatif ELISA kullanılmıştır. Çünkü bu teknikte mikroplakaların önceden kristal antijenlerle kaplanması olayı, diğer ELISA tekniklerindeki mikroplakaların numunelerle kaplanması ile geçen 3 - 4 saatlik gibi uzun bir süreyi ortadan kaldırıp zaman tasarrufu sağlamıştır. Test zamanı ise deney aşamaları azaldığı için 30 dakikaya kadar kısalmıştır. Bu işlem ayrıca non-spesifik reaksiyonları da ortadan kaldırmıştır. Yine mikroplakaların numunelerle kaplanması yerine ticari kristal antijenlerle kaplanması, aynı zamanda uygulamalarda laboratuvarlar arasında önemli ölçüde standardizasyonun sağlanmasına ve ELISA çalışan operatörlerin hatalarının azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca bu antijen kaplı mikroplakaların +4°C'de en az 6 ay saklanabilme (11,39) avantajlarında bulunmaktadır.

ELISA ile etlerin identifikasyonunda duyarlılık çok yüksektir. ELISA tekniklerinden indirekt kompetatif ELISA'da duyarlılık sınırı 100 ng - 100 µg/50 µl arasındadır. Deneysel olarak % 1'lik karışımlar tesbit edildiği halde saha çalışmalarında numunelerdeki % 1'lik karışımların homojen olmamalarından dolayı tesbitlerinin yapılamayacağı düşüncesi yanlıştır. Çünkü her ne kadar homojenizasyonun düşük karışımlar üzerine olumsuz etkisi de olsa çok duyarlı bir metod olduğu için pozitif sonuç alınacaktır. Bu nedenle saha çalışmaları için oldukça duyarlı ve güvenilir bir metottur.

ELISA'da kullanılan antiserumların titreleri, Kangethe ve arkadaşlarının (42), önerdiği şekilde mikroplakalara kaplanan antijenler ile homolog antikorlarının renk oluşturdukları en son antiserum dilusyonundan bir önceki dilusyon kabul edilmiştir. Araştırmada konjugattan ve 1.antikorlardan kaynaklanan kross reaksiyonları önlemek için kullandığımız PBST, 10 mg ml⁻¹ YSP ve %

0,1'lik jelatin içeren PBST dilusyon sıvılarından, test sonuçlarına göre Ayob ve arkadaşlarının (11), önerdiği yağsız süt tozu proteini (YSP) kullanılan örneklerde non-spesifik kross reaksiyonların diğerlerine göre daha az olduğu görülmüştür (Grafik-2).

Türler arasındaki kross reaksiyonun varlığının tesbit edildiği ELISA testlerinde okunan optik dansite değerlerinin homolog antijen-antikor reaksiyonlarında yüksek, farklı türlerin antijenleri arasında ise düşük gözlenmiştir (Grafik-4). Safılaştırarak kullandığımız at, domuz ve sığır antiserumları, türüne özgü antijenler dışındaki albuminler ile çapraz reaksiyon göstermemiştir. Bu Ayob ve arkadaşlarını (11), sonuçları ile aynı doğrultudadır. Fakat Dinçer ve arkadaşları (20), Kangethe ve arkadaşları (42), Patterson ve Jones (59) affinite kromatografi ile saflaştırılmış antiserumlar kullanıldığında bile yakın tür hayvan etleri arasında kross reaksiyonların gözükmediğini bildirmektedirler.

Sucuk içerisindeki at ve domuz eti miktarlarının % karışımları arttıkça indirekt kompetatif ELISA' da OD değerleri düşmüş ve aynı zamanda renk konsantrasyonunda azalma görülmüştür.

Örnekler arasındaki OD değerlerinin değişik olması ise Jones ve Patterson'un (39) bildirdiği gibi günlük deney koşullarından ve numune karışımlarının homojen olmamasından kaynaklanmaktadır.

Numunelerdeki % karışım miktarlarını bulmak için Ayob (11), Dinçer (20), Kangethe ve arkadaşlarının (42) önerdiği gibi mikropalakalarda numunelerle birlikte standart antijenler kullanılmış ve standart antijenlerden elde edilen eğrilerden yararlanılarak karışım miktarları hesaplanmıştır. Standart eğrilere göre testin 0,1 µg-100 µg arasında duyarlılığa sahip olduğu tesbit edilmiştir. Bu duyarlılık sınırı Ayob (11), Dinçer ve arkadaşlarının (20), bildirdiği duyarlılık

sınırlarıyla aynıdır. Karışım miktarlarının hesaplanmasında ise önce standartlara ait optik dansite değerlerinin Kangethe ve arkadaşlarının (42), önerdiği şekilde $Y = a + bx_{\log}/b$ formülü ile doğru gafiği çizilmiş, 'x' değerleri de $x_{\log} = a - y$ formülü ile hesaplanmıştır. Grafiklerden doğrudan numunelerdeki karışım miktarını bulmak mümkün olmasına rağmen, güvenilir sonuçları söyleyebilmek için standart eğriden geçen 6 noktanın bulunması gerektiğini Kangethe ve arkadaşları (42) bildirmektedirler.

Standart antijenlerle mikropalakaların kaplanıldığı indirekt kompetatif ELISA tekniğinde, Kangethe ve arkadaşları (42), Whittaker ve arkadaşları (74), Jones ve Patterson (39) tarafından kullanılan ELISA tekniklerinden çok daha iyi performans sağlanmıştır.

Deney sonuçları Patterson ve arkadaşları (59, 62), Dinçer ve arkadaşları (20) ve Ayob ve arkadaşlarının (11) etlerde % 1'lik karışımların ayırt edilebileceği görüşünü desteklemektedir. Yine etlerdeki % 1'lik karışımların tesbit edilmeleri üzerine Whittaker ve arkadaşları (73), Griffiths ve Billington'un (27), Jones ve Patterson (39), Patterson ve Spencer'in (61) yaptıkları çalışmaların sonuçlarıyla aynı doğrultudadır. Ayrıca Patterson ve arkadaşlarının (62) diğer ELISA tekniklerine göre çok yüksek sensitivite (% 1'in altındaki karışımları) olarak bildirdiği sandwich ELISA kadar indirekt kompetatif ELISA'da duyarlı bulunmuştur. Fakat düşük düzeylerdeki karışımların ayırt edilmesinde numunenin ekstraksiyonu ile homojenizasyon önemlidir. Bu nedenle 10 mg gr^{-1} yabancı et içeren numunelerde miktar tayini yapmak güvenli değildir. % 3'ün üzerindeki at ve domuz eti karışımları kolayca ayırt edilebilmekte ve karışım miktarları hesaplanabilmektedir. Fakat % 3'ün altındaki karışımların miktarları tesbit edilememesine karşın karışımların varlığını ortaya koymak mümkündür.

Sucuk numunesinin içinde bulunan kütleme ajanları (NaCl, NaNO₃) ve baharatların ELISA'ya olumsuz etkileri olmamıştır. Bu sonuçlar Dinçer ve arkadaşları (20) ile Jones ve Patterson'un (39) bildirdiği gibi işlenmiş etlerde ELISA ile tür ayrımı yapılabileceği görüşüyle aynı doğrultudadır.

Yabancı et karışımlarının tesbitinde ELISA kolay uygulanabilen hassas bir metod olmasına karşın ekstraktların iyi hazırlanması ve kullanılan antikolların monospesitesinin yüksek olması oldukça önemlidir.

Ucuz etlerin pahalı etler içerisine karıştırma oranının genelde % 20 civarında olduğu tahmin edilir. Çünkü % 20 ve bunun üzerindeki karışımlar hile bakımından ekonomik sayılırlar. Bu yüzden immunolojik metotların kullanılması yeterli görülse de, yakın tür hayvan etlerinin ayrımını mümkün kılmaması, 100 mg g⁻¹'dan daha az miktarlardaki karışımlar için yeterince hassas olmaması ve fazla malzemenin kullanılması bu metotların pratikte güvenli bir şekilde kullanılmamasına neden olmaktadır. Yine sağlık açısından % 20'nin altındaki karışımların önemli olması ve yöresel, dini ve etnik kurallar gibi nedenlerle de kullanılacak metodun daha duyarlı olması gerekmektedir. Bunun içinde etlerin türlerine göre ayırt edilmesinde ELISA kullanılmalıdır.

Sonuç olarak gerek dünya ve gerekse ülkemiz için et türlerinin ayrımı hala aktüel bir sorundur. Ülkemizde bu sorunun çözümü, çıkarılacak yasalar çerçevesinde ve bu amaçla kurulacak laboratuvarların hizmete girmesiyle olacaktır. Gelişmekte olan bir ülke olarak özellikle hızlı, duyarlı ve ekonomik olan ELISA metodu seçilmesi daha doğru olur. Çünkü elektroforetik metodların rutin laboratuvarlara uygulanması oldukça zordur. Rutin laboratuvarlarda ELISA'nın uygulanabilmesi için bir an önce her tür hayvan etine karşı antiserumlar üretecek ve saflaştıracak bir serum merkezi kurulmalıdır. Bu şekilde her laboratuvarda uygulanabilecek ELISA için bu merkezden gerekli antiserum sağlanmış olacaktır.

Yine ELISA'nın önemli bir başka özelliği de, aynı anda oldukça fazla numunenin analiz edilebilmesidir. Bu özelliğinden dolayı gıda kontrol laboratuvarlarına bu sistemin getirilmesi ile bugüne kadar masraflı ve uzun zaman alan identifikasyon analizleri daha pratik şekle sokularak, piyasada etlerin orjin yönünden kontrollerinde süreklilik sağlanacaktır.



6.ÖZET

Et ürünlerine hile amacıyla yabancı hayvan etlerinin katılması eskiden olduğu gibi günümüzde de önemli bir sorun olarak güncelliğini sürdürmektedir. Pek çok ülkede iyi üretilmiş, yüksek kaliteli ve pahalı etlerin içine düşük kaliteli ve ucuz etler katılmaktadır. Dini, yasal ve halk sağlığı açısından önem taşıyan bu sorunun çözülmesi amacıyla hızlı, ekonomik ve duyarlı yöntemlerin geliştirilmesine ve kullanılmasına gerek duyulmuştur.

Etlere orjinlerini yada et ürünlerine katılan yabancı hayvan etlerinin tesbitini immunolojik testlerle yapmak mümkündür. Fakat son yıllarda diğer ülkelerde etlerin identifikasyonunda daha duyarlı, hızlı, ucuz ve pratik olan Enzim Linked Immuno Assay (ELISA) tekniği yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışma ile de ülkemizde hayvansal ürünler içerisinde en büyük üretim payına sahip sucuklarda olası hilelerin ELISA ile belirlenmesi ve güncel olan yabancı et sorununun çözülmesine yardımcı olmak amaçlanmıştır.

Deneyel olarak yürütülen bu çalışmada, sığır etine % 1,3,5,10 ve 15 oranlarında domuz ve at eti karıştırılarak fermente sucuklar yapılmıştır. ELISA testi için gerekli olan türe özgü monospesifik antiserumlar affinite kromatografi yöntemiyle saflaştırılmıştır. İndirekt kompetatif ELISA'nın uygulandığı bu çalışmada sucuklardaki 10 mg gr⁻¹ lık karışımlarda domuz ve at etinin varlığı tesbit edilebilmiştir. Domuz ve at kristal albumin proteinleri ile yapılan deneylerde ise duyarlılığın 2 µg ml⁻¹ olduğu bulunmuştur.

7. ALMANCA ÖZET (ZUSAMMENFASSUNG)

TIERARTBESTIMMUNG IN DER TÜRKISCHEN ROHWURST MITTELS ELISA

Zu Fleischprodukten andere Fleischarten beizumengen um Lebensmittel zu fälschen stellt in unserer Zeit ein aktuelles Problem dar. In sehr vielen Ländern wird teures Fleisch guter Qualität mit billigerem Fleisch schlechter Qualität zusammen gemischt. Das Problem, das aus religiösen Gründen, des Gesetzes und der Volksgesundheit wegen wichtig ist, benötigt zu seiner Lösung die Entwicklung und Anwendung eines schnellen und Ökonomischen system.

Die Feststellung der Fleischart bzw. nicht geeigneten Fleisches ist mittels Immunologischer verfahren möglich. In anderen Ländern, hat sich die Anwendung der Enzym Linked Immuno Assay (ELISA) Methode bei der identifikation des Fleisches verbreitet. Da Wurst das in unserem Land anteilmässig wichtigste Fleischprodukt ist, wurde in dieses Arbeit eine Lösung des zuvor dargestellten aktuellen Problems (fremdes Fleisch und Festlegung einer eventuellem Lebensmittel fälschung) an Beispiel dieses Produkts mit ELISA erarbeitet.

Bei den als Versuch durch geführten Untersuchungen Wurde zu Rindfleisch 1,3,5,10,bzw.15 % Schweine -und Pferdefleisch beigemischt, und damit fermentierte Wurst vorbereitet. Das für den ELISA Test notwendige artspezifisch monospezifische Antiserum wurde mittels Schwein -und Pferde kristallalbumin injektionen an weissen Zelandhasen produziert.Produzierte ungereinigte Antiseren wurden mittels des Äffinität -Chromatographie -Verfahrens gereinigt. Bei den Untersuchungen mit dem indirekt Competativ ELISA -Verfahren, wurde in der Wurst 10 mg gr^{-1} Beimischung von Schweine -und Pferdefleisch festgestellt. Mit den Schweine -und Pferde kristallalbumin durchgeführte Untersuchungen, ergaben eine Empfindlichkeit von $2 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.

8.KAYNAKLAR

1. ALKAN.F. : ELISA. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enst. Seminer. Ankara, 1988.
2. ALLSUP, T.N. : Comparision of the agar-jel immunodiffusion (AGİD) and counter-immunoelektroforezis (CİE) test for species identification of imported red meat and Offal. Meat Sci. 20 (2);119-128, 1987.
3. ALTGELT K.H., SEGAL, L.: Gel Permeation Chromatography, Marcel Dekker Inc: Newyork. 1971.
4. ANONİM: Affinity Chromatography principles and methods. Pharmacia Fine chemicals. Sweden. Tarihsiz.
5. ANONİM: Chemical Company.Sigma-Aldrich Corporation. Missouri USA-1990.
6. ANONİM: EBK Faaliyet Raporu. Et ve Balık Kurumu Genel Müdürlüğü. Ankara. 1991.
7. ANONİM: LKB The incentive Gruop: Aproctical Guide to Ion Exchange Chromatograhya, Bromma, Sweden. Tarihsiz.
8. ANONİM: Tarım istatistikleri özeti. T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü. Ankara. 1990.
9. ARDA, M.: İmmunoloji. A.Ü.Vet.Fak.Yay.No:404. Ders Kitabı. Ankara Üniversitesi Basımevi. Ankara. 1985.
10. Ayaz,Y. : Agar-jel diffuzyon yöntemi ile et nevelerinin ayırt edilmesi üzerine çalışmalar. Etlik Vet. Mik.Derg. 6 (5);73-80.
11. AYOB, M.K., RAGAB, A.A., ALLEN, J.C.: An improved rapid ELISA Technique for detection of pork in meat product. J.Sci. Food Agr. 49 (1);103-116, 1989.

12. BERGER, G.R., MAGEAU,R.,SCHWAB, B., JOHNSTON, R.: Detection of poultr and pork in cooked and canned meat foods by ELISA. JAOAC. 71 (2); 406-410, 1983.
13. BERKİMEN, L.: Et Muayenesi. A.Ü.Vet.Fak.Yay.No:179 Ders Kitabı. A.Ü. Basımevi, Ankara, 1965.
14. BERKİMEN, L., DEMİRER, M.A.: Deve antijen ve presipitasyon serumunun özelliği üzerine araştırmalar . A.Ü.Vet.Fak.Derg., (1); 53-58, 1963.
15. BERKİMEN, L., DEMİRER , M.A.: Sığır ve manda etlerinin presipitasyon metodu ile ayırt edilmesi üzerine araştırmalar. A.Ü.Vet.Fak.Derg. (1); 35-43, 1963.
16. DEAN, P.D.G., JOHNSTON,W.S., MIDLE, F.A.: Cyanogen Bromide activation procedures. Publisched in practical approach series D.B.D. Rickwood and Hames, I.R.L. Press Washington, 1985.
17. DEMİRER, M.A.: Koyun ve Keçi Etilerinin Presipitasyon Metodu ile Ayırt Edilmesi Üzerine Araştırmalar. A.Ü.Vet.Yay.No:152, Sevinç Matbaası, Ankara, 1964.
18. DİNÇER, B.: The effects of curing and cooking on the differentiation of species origin of meat products by isoelectric focusing. A.Ü.Vet.Fak.Derg., 34 (1);97-104, 1987.
19. DİNÇER, B.: Türk fermente sucuğunda fermentasyon ve kuruma sırasında bileşimsel, organoleptik ve lipolitik değişiklikler üzerine çalışmalar. VHG.457.TUBITAK, 1979.
20. DİNÇER, B., SPEAROW, J.L., CANSSENS,R.G. GRAESER. M.L.: The effects of curing on cooking on the dedection of species origin of meat products by competetive and indirect ELISA techniques. Meat Sci. 20 (4); 253-267, 1987.

21. DOBERSTEIN, K.A., GREUEL, F.: Serologische differenzierung von Kangurufleisch. Arch. Lebensmittelhyg. 33 (5);109-136, 1982.
22. EMEKDAŞ,G.: Kolon kromatografi sistemi ile antihuman globulin elde edilmesi ve bunun kullanıma sokulması. Doktora Tezi. Gülhane Ask. Tıp Akademisi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Ankara, 1988.
23. ERENÇİN, Z.: Muhtelif geviş getiren hayvanlarda hemal lenf yumrularının anatomik durumlarıyla hemopoietik sistemdeki yerlerin tesbiti. A.Ü.Vet.Fak.Yay. No:34. A.Ü. Basımevi. Ankara.1952.
24. FELLEBERG, R.: Kompendium der Allgemeinen Immunologie. Institut für Veterinär-Physiologie Universität Zurich. Verlag Paul Parey. Berlin und Hamburg, 1978.
25. FUGATE, H.G., PENNY, S.R.: Immunodiffusion technique for the identification of animal species. JAOAC.54 (5);1152-1156, 1971.
26. GOERLICH, R., GREUEL, E.L.: Der Nachweis nativer und hitzdenaturierter Muskelproteine von Rind und Känguruh mit hilfe muriner monoklonaler Antikörper. Arch.Lebensmittelhyg. 37 (4);87-90, 1986.
27. GRIFFITHS,N.M.,BILLINGTON,J.M.: Evaluation of an ELISA for blood serum to determine indirectly the Apparent beef content of Beef joints and model mixtures. J. Sci. Food Agr. 35;909- 914, 1984.
28. HEER, M., GEORLICH, R.: Serologische Untersuchungen von hitzdenaturiertem Schaffleisch. Arch. Lebensmittelhyg. 39 (3); 78-79, 1988.
29. HEINERT, H.H., BREHMER, H., BAUMMANN, H.J. und A.KLINGER.: Tierartliche Untersuchungen von nativem muskelfleisch mit Hilfe der SDS-polyacrylamid - Elektrophorese. Fleischwirtsch. 68 (3);386-389, 1988.

30. HERBERT,W.J.: Laboratory animal techniques for immunology. Appendix. 3. In. "Immunochemistry Vol.3" Ed. DM Weir 2. Ed. Blackwell scientific publications. Oxford.1973.
31. HERRMANN,C., KOTTER,L.: Serologische Differenzierung einer 4000 Jahre alten Fleischprobe. präzipitation. Berl. Mün. Tierarztl. Wochensch. 5 (1); 11-14, 1972.
32. HITCHCOCK,C.H.S., BAILEY,F.J., CRIMEN,A.A., DEAN,D.A.G., DAWIS,P. J.: Determination of soya proteins in food using an ELISA procedure. J.Sci. Food Agr. 32, 157-165,1981.
33. HITCHCOCK,C.H.S., CRIMES,A.A.: Methodology for meat species identification: A Review. Meat Sci. 15; 215-224,1985.
34. HOFMANN,K.: Fundamental problems in identifying the animal species of muscle meat using electroforetic metod. Fleischwirtsch. 67 (7); 820-826, 1987.
35. HOFFMANN, K., PENNY,I.F.: Methode zur identifizierung und quantativer Bestimmung von Fleisch-und Freundeweiss mit hilfe der SDS-Polycrylamid-Elektrophrese auf Flachgelen. Fleischwirtsch. 53 (2); 252-254,1983.
36. JOHNSTONE,A., THORPE,R.: Immunochemistry in Practice. Blackwell Scientific Publications. Alden Press. Oxford, 1982.
37. JOHNSTON,L.A.Y., TRACE-PATTE,P.D., PEARSON,R.D.: Identification of the species of origin of meat in Australia by RIA and EIA. "Immunoassay in Food Analysis." Ed B.A.Morris, M.N. Clifford. Elsevier Appl. Science Publishers, 1985.

38. JONES, S.J., PATTERSON, R.L.S.: A Modified indirect ELISA Procedure for raw meat speciation using crude anti-species antisera and stabilized immunoreagent. *J.Sci.Food Agr.* 37; 767-775, 1986.
39. JONES S.J., PATTERSON, R.L.S.: Double antibody ELISA for detection of trace amounts of pig meat in raw meat mixtures. *Meat Sci.* 15 (1); 1-13, 1985.
40. KAISER, K., MATHEIS, G., DÜRMAN, C.K., BELTZ, H.D.: Proteindifferenzierung mit elektrophoretischen Methoden bei Fleisch, Fisch und abgeleiteten Produkten. *Z.Lebensm. Unters. Forsch.* 171; 415-419, 1980.
41. KAMIYAMA, T., KATSUBE, Y., IMAIZUMI, K.: Serological identification of animal species of meat using species-specific antiserum albumin antibodies obtained by Immunoabsorbent Chromatography. *Jpn.J.Vet.Sci.* 40 (6); 663-669, 1978
42. KANGETHE, E.K., JONES, S.J., PATTERSON, R.L.S.: Identification of the species origin of fresh meat using an ELISA procedure. *Meat Sci.* 7 (3); 229-240, 1982.
43. KIM, H., SHELEF, L.A.: Characterization and identification of Raw Beef, Pork, Chicken and Turkey Meats by Electrophoretic Patterns of Their Sarcoplasmic Proteins. *J.Food Sci.* 51(31); 731-735, 1986.
44. KING, N.L.: Species Identification of Cooked Meats by enzyme staining of isoelectric focusing gels. *Meat Sci.* 11; 59-72, 1984.
45. KING, N.L., KURTH, L.: Analysis of raw beef samples for adulterant meat species by enzyme-staining of isoelectric focusing gels. *J.Food Sci.* 47, 1608-1612, 1982.

46. KURAL,Ş.: Evcil hayvanların Komperatif, Sistematik Anatomi ve Histolojisi. Kısım I. A.Ü. Vet.Fak.Yay.Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1963.
47. KURTH,L., SHAW,F.D.: Identification of the species of origin meat electroforetic and immunological methods. Aust. Food Technol. 35 (7); 328-331, 1983.
48. LUNINGHAM A.: The Reaction of Antibody with Antigen. Understanding "Immunology". Academic Press, Newyork.1978.
49. MAGEAU,R.P., CUTRUFELLI,M.E., SCHWAB.B., JOHNSTON,R.W.: Development of an Overnight rapid bovine identification test (ORBIT) for field use. JAOAC. 67 (6); 949-954, 1984.
50. MANZ,J.: Nachweis hitzdenaturierter Muskelproteine mittels ELISA. Fleischwirtsch. 65 (4); 497-499, 1985.
51. MARCH,S.C., PARIKH,I., CUATRECASAS,P.: A Simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. Analytical Biochemistry. 60; 149-152, 1974.
52. MARTIN,R. AZCONA,J.I, CASES,C., HERNANDEZ,P.E., SANZ,B.: Sandwich ELISA for detection of pig meat in raw beef using antisera to muscle soluble proteins. J.Food Prot. 51 (10); 790-794, 1988.
53. MARTIN,R. AZCONA,J.I, CASES,C., HERNANDEZ,P.E., SANZ,B.: Sandwich ELISA for detection of horse meat in raw Meat mixtures using antisera to muscle soluble proteins. Meat Sci. 22 (2); 143-153,1988.
54. MINDEN P, FAIR R.S: The ammonium sulphate method to measure antigen-binding capacity. Chapter 15. in "Immunochemistry" Vol.1. Ed. D.M Weir Second Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1973.

55. NAKANE, P.K., KAWAOI, A.: Peroksidase-labelled antibody a new method of conjugation. *J. Histochem Cytochem.* 22 (12); 1084-1091, 1974.
56. OLSMAN, W.J., DOBBELARE, S., HITHCOCK, H.S.: The performance of an SDS-PAGE and an ELISA method for the quantitative analysis of soya protein in meat products: An International Collaborative study. *J. Sci. Food Agr.* 36;499-507, 1985.
57. OMURTAG, A.C.: Memleketimiz muhtelif tip salam ve sosisleri üzerinde glikojen ve presipitasyon deneyleri ile paralel çalışma. *Vet. Hek. Der. Derg.* 158-159, 497-504, 1959.
58. OUÇTHERLONY, Ö.: Diffusion-In-Gel methods for Immunological Analysis II. *Progr. Allergy.* 6, 30-154, 1962.
59. PATTERSON, R.L.S., JONES S.J.: Species identification of meat in raw unheated meat products. *Immunoassays in Food analysis.* "In B.D. Morris, M.N. Clifford" Elsevier Applied Science publishers, London, 1985.
60. PATTERSON, R.M., SPENCER, T.L.: A rapid on side test for speciation of meat. *Aust. Vet. J.* 60 (12); 381-382, 1983.
61. PATTERSON, R.M., SPENCER, T.L.: Differentiation of raw meat Phylogenically related species by ELISA. *Meat Sci.* 15;119-123, 1983.
62. PATTERSON, R.M., WHITTAKER, R.G., SPENCER, T.L.: Improved Species identification of raw meat by double sandwich ELISA. *J. Sci. Food Agric.* 35;1018-1023, 1984.
63. PINEBERG, S.K.: Tierartangabe und bestimmung. *Fleischwirtsch.* 64 (11);1350-1354, 1984.
64. PIROÏRD, R., LOMBARD, M.: Les Methodes immuno-enzymatiques et leurs applications serologiques. *Rev Med. Vet.* 131 (1); 25- 42, 1980.

65. ROITT, M.I.: Essential Immunology. Third Edition. London. Çeviren: A.Müftüoğlu. Güven Kitabevi. Ankara, 1978.
66. SAMY, H.A., WOADROW, C.M., PHILIP, G.S.: Liquid Chromatographic identification of meats. JAOAC. 71 (2); 349-403, 1988.
67. SAWAYA, W.N., MAMEESH, M.S., RAYES, E., HUSAIN, A., DASTHI, B.: Detection of pork in processed meat by an ELISA using anti-swine antisera. J. Food Sci. 55 (2); 293-297, 1990.
68. SIBOUR, M., GIACCONE, V., PARIS, E.: Tierartbestimmung anhand der proteinmuster von LDH-Isoenzymen. Fleischwirtsch. 68 (3); 390-393, 1988.
69. SPELL, E.: Die Elektrophoretische Unterscheidung verschiedener Fleischarten. Fleischwirtsch. 54 (3); 533-538, 1974.
70. SWART, K.S., WILKS, C.R.: An immunodiffusion method for the identification of the species of origin of meat samples. Aust. Vet. J. 59, 21-22, 1982.
71. TINBERGEN, B.J., OLSMAN W.J.: Isoelektrisch Fokussierung als eine Technik zur spezieidentifizierung in der Lebensmittelüberwachung. Fleischwirtsch. 10, 1495-1498, 1976.
72. UÇAR, N.: Hayvan killarının birbirinden ayrımı. Ask. Vet. Mec. 24 (160); 36-39, 1946.
73. WHITTAKER, R.G., SPENCER, T.L., COPLAND, J.W.: An ELISA for species identification of raw meat. J. Sci. Food Agr. 34; 1143-1146, 1983.
74. WHITTAKER, R.G., SPENCER, T.L., COPLAND, J.W.: ELISA for meat species testing. Aust. Vet. J. 59 (1); 125, 1982.
75. VOLLER, A., BIDWELL, D.E., BARTELET, A.: A guide with abstract of microplate applications the ELISA, 1979.

Tablo-Ek1: Domuz ve at eti karıştırılmış sucuk örneklerinde okunan optik dansite değerleri, hesaplanan x değeri logaritmaları, antilogaritmalar ve sulandırma katsa

DOMUZ I. PARTİ

I. ÖRNEK							II. ÖRNEK					
% KARIŞIM	SULANDIRMA KATSAYISI	SULANDIRMA	OPTİK DANSİTE	X DEĞERİ (Logaritma)	X DEĞERİ (anti Logaritma)	MİKTAR mg	SULANDIRMA KATSAYISI	SULANDIRMA	OPTİK DANSİTE	X DEĞERİ (Logaritma)	X DEĞERİ (anti Logaritma)	MİKTAR mg
% 1	5120	1/ 640	3,355	—	—	—	5120	1/ 640	1,400	-0,774	0,168	861
	2560	1/ 320	2,934	—	—	—	2560	1/ 320	1,287	-0,480	0,330	846
	1280	1/160	2,644	—	—	—	1280	1/160	1,168	-0,171	0,673	862
	640	1/ 80	2,553	—	—	—	640	1/ 80	1,106	-0,010	0,976	624
	320	1/ 40	2,161	—	—	—	320	1/ 40	1,000	0,264	1,840	588
	160	1/ 20	1,671	0,536	3,44	550	160	1/ 20	0,864	0,618	4,151	664
	80	1/ 10	1,347	0,924	8,39	671	80	1/ 10	0,742	0,935	8,611	689
	40	1/ 5	0,976	1,369	23,38	935	40	1/ 5	0,601	1,301	20,01	800
		ORTALAMA	—	—	—	719		ORTALAMA	—	—	—	742
% 3	5120	1/ 640	3,205	—	—	—	5120	1/ 640	1,474	-0,966	0,108	553
	2560	1/ 320	2,790	—	—	—	2560	1/ 320	1,207	-0,272	0,533	1366
	1280	1/160	2,254	—	—	—	1280	1/160	0,995	0,277	1,896	2427
	640	1/ 80	1,895	0,267	1,85	1183	640	1/ 80	0,787	0,818	6,579	4210
	320	1/ 40	1,568	0,659	4,56	1459	320	1/ 40	0,739	0,942	8,767	2805
	160	1/ 20	1,086	1,237	17,25	2761	160	1/ 20	0,600	1,303	20,132	3222
	80	1/ 10	1,069	1,257	18,07	1445	80	1/ 10	0,506	1,548	35,322	2826
	40	1/ 5	0,748	1,642	43,85	1754	40	1/ 5	0,420	1,771	59,078	2363
		ORTALAMA	—	—	—	1721		ORTALAMA	—	—	—	2473
% 5	5120	1/ 640	2,876	—	—	—	5120	1/ 640	0,987	0,298	1,989	10185
	2560	1/ 320	2,452	—	—	—	2560	1/ 320	0,831	0,703	5,057	12948
	1280	1/160	2,151	—	—	—	1280	1/160	0,696	1,054	11,338	14512
	640	1/ 80	1,448	0,803	6,35	4065	640	1/ 80	0,674	1,111	12,932	8277
	320	1/ 40	1,211	1,087	12,21	3909	320	1/ 40	0,516	1,522	33,271	10647
	160	1/ 20	1,066	1,333	21,53	3444	160	1/ 20	0,446	1,703	50,570	8091
	80	1/ 10	0,859	1,509	32,28	2582	80	1/ 10	0,351	1,950	89,258	7140
	40	1/ 5	0,600	1,820	66,07	2642	40	1/ 5	0,344	—	—	—
		ORTALAMA	—	—	—	3328		ORTALAMA	—	—	—	6567
% 10	5120	1/640	2,876	—	—	—	5120	1/ 640	0,813	0,750	5,631	28834
	2560	1/ 320	2,380	—	—	—	2560	1/ 320	0,653	1,166	14,663	37538
	1280	1/160	1,992	0,151	1,41	1811	1280	1/160	0,599	1,306	20,253	25924
	640	1/ 80	1,646	0,565	3,67	2350	640	1/ 80	0,450	1,693	49,374	31599
	320	1/ 40	1,188	1,115	13,03	4169	320	1/ 40	0,418	1,776	59,789	19105
	160	1/ 20	0,829	1,545	35,07	5612	160	1/ 20	0,370	1,901	79,670	12747
	80	1/ 10	0,758	1,630	42,65	3412	80	1/ 10	0,330	2,005	101,203	8096
	40	1/ 5	0,553	1,876	75,16	3006	40	1/ 5	0,312	—	—	—
		ORTALAMA	—	—	—	3393		ORTALAMA	—	—	—	23406
% 15	5120	1/ 640	2,582	—	—	—	5120	1/640	0,569	1,384	24,233	123956
	2560	1/ 320	2,094	0,026	1,06	2716	2560	1/ 320	0,443	1,711	51,406	131599
	1280	1/160	1,636	0,580	3,80	4865	1280	1/160	0,436	1,729	53,579	68581
	640	1/ 80	1,185	1,118	13,12	8397	640	1/ 80	0,371	1,898	79,067	50603
	320	1/ 40	0,869	1,497	31,40	10049	320	1/ 40	0,338	1,984	96,475	30872
	160	1/ 20	0,706	1,693	49,31	7890	160	1/ 20	0,310	—	—	—
	80	1/ 10	0,619	1,797	62,66	5012	80	1/ 10	1,984	—	—	—
	40	1/ 5	0,586	1,836	68,55	2741	40	1/ 5	0,245	—	—	—
		ORTALAMA	—	—	—	5952		ORTALAMA	—	—	—	81122

Tablo-Ek.1'in devamı

DOMUZ II. PARTİ

I. ÖRNEK							II. ÖRNEK					
% KARŞIM	SULANDIRMA KATYAYI	SULANDIRMA	OPTİK DANIŞTE	X DEĞERİ (Logaritma)	X DEĞERİ (anti Logaritma)	MİKTAR mg	SULANDIRMA KATYAYI	SULANDIRMA	OPTİK DANIŞTE	X DEĞERİ (Logaritma)	X DEĞERİ (anti Logaritma)	MİKTAR mg
% 1	5120	1/ 640	3,132	—	—	—	5120	1/ 640	1,514	-2,408	3,899	59
	2560	1/ 320	3,050	—	—	—	2560	1/ 320	1,416	-2,150	7,073	18
	1280	1/160	2,645	—	—	—	1280	1/160	1,225	-1,646	0,022	28
	640	1/ 80	2,448	-1,03	0,093	60	640	1/ 80	1,054	-1,195	0,063	41
	320	1/ 40	2,264	-0,842	0,143	46	320	1/ 40	0,944	-0,905	0,124	39
	160	1/ 20	1,809	-0,398	0,399	64	160	1/ 20	0,924	-0,852	0,140	22
	80	1/ 10	1,418	0,020	1,048	84	80	1/ 10	0,805	-0,538	0,289	23
	40	1/ 5	1,062	0,383	2,419	97	40	1/ 5	0,659	-0,153	0,703	28
		ORTALAMA	—	—	—	70		ORTALAMA	—	—	—	32
% 3	5120	1/ 640	2,867	—	—	—	5120	1/ 640	1,272	-1,770	0,016	86
	2560	1/ 320	2,376	0,957	0,110	283	2560	1/ 320	1,096	-1,306	0,049	126
	1280	1/160	2,019	-0,592	0,225	326	1280	1/160	0,927	-0,860	0,137	176
	640	1/ 80	1,621	-0,186	0,650	416	640	1/ 80	0,775	-0,459	0,347	222
	320	1/ 40	1,320	0,120	1,319	422	320	1/ 40	0,711	-0,290	0,512	164
	160	1/ 20	0,969	0,478	3,010	481	160	1/ 20	0,581	0,052	1,129	180
	80	1/ 10	0,782	0,669	4,670	373	80	1/ 10	0,486	0,303	2,011	160
	40	1/ 5	0,592	0,863	7,299	292	40	1/ 5	0,440	0,424	2,659	106
		ORTALAMA	—	—	—	370		ORTALAMA	—	—	—	153
% 5	5120	1/ 640	2,942	—	—	—	5120	1/ 640	0,914	-0,825	0,149	764
	2560	1/ 320	2,656	—	—	—	2560	1/ 320	0,858	-0,678	0,209	537
	1280	1/160	2,206	-0,783	0,164	211	1280	1/160	0,685	-0,221	0,600	768
	640	1/ 80	1,630	-0,195	0,636	407	640	1/ 80	0,576	0,065	1,164	744
	320	1/ 40	1,218	0,224	1,676	536	320	1/ 40	0,504	0,255	1,802	576
	160	1/ 20	1,012	0,434	2,720	435	160	1/ 20	0,427	0,459	2,878	460
	80	1/ 10	0,821	0,629	4,261	341	80	1/ 10	0,357	0,643	4,403	352
	40	1/ 5	0,650	0,804	6,370	254	40	1/ 5	0,323	0,733	5,413	216
		ORTALAMA	—	—	—	364		ORTALAMA	—	—	—	582
% 10	5120	1/ 640	2,904	—	—	—	5120	1/640	0,612	-0,02	0,935	4789
	2560	1/ 320	2,471	—	—	—	2560	1/ 320	0,593	0,021	1,049	2687
	1280	1/160	2,119	-0,694	0,201	258	1280	1/160	0,536	0,171	1,484	1899
	640	1/ 80	1,715	-0,282	0,521	334	640	1/ 80	0,447	0,406	2,548	1631
	320	1/ 40	1,195	0,247	1,770	566	320	1/ 40	0,381	0,580	3,806	1217
	160	1/ 20	0,849	0,601	3,990	638	160	1/ 20	0,354	0,651	4,484	717
	80	1/ 10	0,854	0,595	3,943	315	80	1/ 10	0,285	0,833	6,819	545
	40	1/ 5	0,569	0,886	7,704	308	40	1/ 5	0,298	0,799	6,301	252
		ORTALAMA	—	—	—	404		ORTALAMA	—	—	—	1717
% 15	5120	1/ 640	2,641	—	—	—	5120	1/ 640	0,481	0,316	2,073	10616
	2560	1/ 320	2,086	-0,661	0,218	558	2560	1/ 320	0,390	0,556	3,603	9225
	1280	1/160	1,574	-0,138	0,726	930	1280	1/160	0,408	0,509	3,230	4134
	640	1/ 80	1,197	0,246	1,761	1127	640	1/ 80	0,322	0,736	5,446	3486
	320	1/ 40	0,845	0,605	4,028	1288	320	1/ 40	0,335	0,701	5,033	1610
	160	1/ 20	0,691	0,762	5,784	925	160	1/ 20	0,319	0,744	5,547	887
	80	1/ 10	0,567	0,888	7,740	619	80	1/ 10	0,236	0,963	9,184	734
	40	1/ 5	0,508	0,948	8,891	355	40	1/ 5	0,248	0,931	8,538	341
		ORTALAMA	—	—	—	829		ORTALAMA	—	—	—	3443

Tablo-Ek.1'in devamı

DOMUZ I. PARTİ

DOMUZ II. PARTİ

III. ÖRNEK							III. ÖRNEK						
% KARIŞIM	SULANDIRMA BAZISIZI	SULANDIRMA	OPTİK DANSİTE	X DEĞERİ (Logaritma)	X DEĞERİ (anti Logaritma)	MİKTAR mg	% KARIŞIM	SULANDIRMA BAZISIZI	SULANDIRMA	OPTİK DANSİTE	X DEĞERİ (Logaritma)	X DEĞERİ (anti Logaritma)	MİKTAR mg
% 1	5120	1/ 640	1,835	-0,78	0,16	849	% 1	5120	1/ 640	1,887	—	—	—
	2560	1/ 320	1,680	-0,495	0,319	818		2560	1/ 320	1,793	—	—	—
	1280	1/160	1,496	-0,147	0,712	912		1280	1/160	1,546	-0,970	0,123	158
	640	1/ 80	1,379	0,073	1,183	757		640	1/ 80	1,362	0,458	0,347	223
	320	1/ 40	1,236	0,344	2,208	706		320	1/ 40	1,121	0,129	1,346	431
	160	1/ 20	1,086	0,627	4,236	677		160	1/ 20	1,096	0,180	1,549	248
	80	1/ 10	0,940	0,903	7,99	639		80	1/ 10	0,990	0,448	2,810	224
	40	1/ 5	0,713	1,332	21,47	859		40	1/ 5	0,809	0,890	7,766	310
	ORTALAMA	—	—	—	777		ORTALAMA	—	—	—	—	266	
% 3	5120	1/ 640	1,476	-0,109	0,77	3983	% 3	5120	1/ 640	1,630	—	—	—
	2560	1/ 320	1,416	0,003	1,00	2577		2560	1/ 320	1,274	-0,243	0,570	1459
	1280	1/160	1,173	0,463	2,90	3717		1280	1/160	1,131	0,104	1,273	1629
	640	1/ 80	0,903	0,973	9,39	6014		640	1/ 80	0,934	0,585	3,849	2463
	320	1/ 40	0,844	1,085	12,16	3891		320	1/ 40	0,822	0,858	7,219	2310
	160	1/ 20	0,684	1,386	24,32	3891		160	1/ 20	0,674	1,219	16,577	2652
	80	1/ 10	0,611	1,524	33,41	2673		80	1/ 10	0,585	1,436	27,326	2186
	40	1/ 5	0,465	1,801	63,24	2529		40	1/ 5	0,493	1,660	45,811	1832
	ORTALAMA	—	—	—	3859		ORTALAMA	—	—	—	—	2076	
% 5	5120	1/ 640	1,211	0,391	2,46	12597	% 5	5120	1/ 640	1,142	0,078	1,196	6127
	2560	1/ 320	0,983	0,822	6,63	16991		2560	1/ 320	1,049	0,304	2,017	5165
	1280	1/160	0,854	1,066	11,64	14900		1280	1/160	0,789	0,939	8,690	11123
	640	1/ 80	0,764	1,236	17,21	11019		640	1/ 80	0,704	1,146	14,006	8964
	320	1/ 40	0,619	1,510	32,36	10354		320	1/ 40	0,588	1,429	26,870	8598
	160	1/ 20	0,506	1,724	52,96	8474		160	1/ 20	0,486	1,678	47,648	7623
	80	1/ 10	0,387	1,948	88,71	7097		80	1/ 10	0,405	1,875	75,094	6007
	40	1/ 5	0,359	2,001	100,43	4017		40	1/ 5	0,342	—	—	—
	ORTALAMA	—	—	—	10681		ORTALAMA	—	—	—	—	7656	
% 10	5120	1/ 640	0,950	0,884	7,65	39198	% 10	5120	1/640	0,659	1,256	18,034	92,335
	2560	1/ 320	0,739	1,283	19,18	49117		2560	1/ 320	0,663	1,246	17,633	45,142
	1280	1/160	0,693	1,370	23,44	30000		1280	1/160	0,602	1,395	24,838	31,793
	640	1/ 80	0,489	1,756	57,01	36490		640	1/ 80	0,505	1,631	42,825	27,408
	320	1/ 40	0,451	1,827	67,14	21485		320	1/ 40	0,422	1,834	68,256	21,842
	160	1/ 20	0,408	1,909	81,09	12975		160	1/ 20	0,386	1,921	83,550	13,368
	80	1/ 10	0,362	1,996	99,13	7930		80	1/ 10	0,359	1,987	97,231	7778
	40	1/ 5	0,316	—	—	—		40	1/ 5	0,315	—	—	—
	ORTALAMA	—	—	—	28170		ORTALAMA	—	—	—	—	34238	
% 15	5120	1/ 640	0,654	1,444	27,79	142321	% 15	5120	1/ 640	0,582	1,443	27,790	142289
	2560	1/ 320	0,594	1,556	36,11	92447		2560	1/ 320	0,443	1,782	60,663	155298
	1280	1/160	0,494	1,884	76,56	97996		1280	1/160	0,468	1,721	52,717	67477
	640	1/ 80	0,421	1,884	76,68	49075		640	1/ 80	0,404	1,878	75,517	48331
	320	1/ 40	0,368	1,984	96,57	30904		320	1/ 40	0,370	1,960	91,406	29249
	160	1/ 20	0,333	—	—	—		160	1/ 20	0,348	2,014	103,427	16548
	80	1/ 10	0,263	—	—	—		80	1/ 10	0,273	—	—	—
	40	1/ 5	0,308	—	—	—		40	1/ 5	0,255	—	—	—
	ORTALAMA	—	—	—	82548		ORTALAMA	—	—	—	—	76,531	

Tablo-Ek.1'in devamı

AT I. PARTİ

I. ÖRNEK							II. ÖRNEK					
% KARIŞIM	SULANDIRMA LİTRAJI	SULANDIRMA	OPTİK DANSİTE	X DEĞERİ (Logaritma)	X DEĞERİ (anti Logaritma)	MİKTAR mg	SULANDIRMA LİTRAJI	SULANDIRMA	OPTİK DANSİTE	X DEĞERİ (Logaritma)	X DEĞERİ (anti Logaritma)	MİKTAR mg
% 1	5120	1/ 640	1,698	—	—	—	5120	1/ 640	3,207	—	—	—
	2560	1/ 320	1,637	—	—	—	2560	1/ 320	2,983	—	—	—
	1280	1/160	1,333	—	—	—	1280	1/160	2,950	—	—	—
	640	1/ 80	1,238	0,103	1,268	811	640	1/ 80	2,894	—	—	—
	320	1/ 40	0,812	0,948	8,889	2841	320	1/ 40	2,642	—	—	—
	160	1/ 20	0,711	1,148	14,086	2253	160	1/ 20	2,313	-0,707	0,196	32
	80	1/ 10	0,673	1,224	16,757	1340	80	1/ 10	1,928	-0,314	0,484	39
	40	1/ 5	0,572	1,424	26,582	1063	40	1/ 5	1,547	0,074	1,187	47
		ORTALAMA	—	—	—	1861		ORTALAMA	—	—	—	40
% 3	5120	1/ 640	1,634	—	—	—	5120	1/ 640	3,280	—	—	—
	2560	1/ 320	1,581	—	—	—	2560	1/ 320	2,950	—	—	—
	1280	1/160	1,498	—	—	—	1280	1/160	2,780	—	—	—
	640	1/ 80	1,352	—	—	—	640	1/ 80	2,628	-1,028	0,093	60
	320	1/ 40	0,864	0,845	7,002	2240	320	1/ 40	2,016	-0,404	0,394	126
	160	1/ 20	0,757	1,057	11,416	1826	160	1/ 20	1,593	0,027	1,065	170
	80	1/ 10	0,577	1,414	25,982	2078	80	1/ 10	1,481	0,141	1,386	110
	40	1/ 5	0,541	1,486	30,627	1225	40	1/ 5	1,315	0,311	2,047	82
		ORTALAMA	—	—	—	1841		ORTALAMA	—	—	—	110
% 5	5120	1/ 640	1,114	0,349	2,234	11441	5120	1/ 640	3,393	—	—	—
	2560	1/ 320	0,870	0,833	6,812	17441	2560	1/ 320	2,858	—	—	—
	1280	1/160	0,797	0,978	9,509	12172	1280	1/160	2,557	-0,956	0,110	142
	640	1/ 80	0,706	1,158	14,412	9223	640	1/ 80	2,013	-0,401	0,397	254
	320	1/ 40	0,614	1,341	21,941	7021	320	1/ 40	1,553	0,068	1,170	374
	160	1/ 20	0,507	1,553	35,774	5723	160	1/ 20	1,373	0,252	1,786	285
	80	1/ 10	0,447	1,672	47,056	3764	80	1/ 10	1,315	0,311	2,047	164
	40	1/ 5	0,398	1,769	58,862	2354	40	1/ 5	1,269	0,358	2,281	91
		ORTALAMA	—	—	—	8842		ORTALAMA	—	—	—	218
% 10	5120	1/ 640	0,696	1,178	15,085	77290	5120	1/ 640	2,803	—	—	—
	2560	1/ 320	0,651	1,267	18,529	47434	2560	1/ 320	2,125	-0,515	0,305	781
	1280	1/160	0,648	1,273	18,789	24044	1280	1/160	1,689	-0,070	0,850	1088
	640	1/ 80	0,597	1,375	23,713	15176	640	1/ 80	1,509	0,113	1,297	831
	320	1/ 40	0,589	1,390	24,596	7870	320	1/ 40	1,268	0,359	2,286	731
	160	1/ 20	0,423	1,720	52,509	8401	160	1/ 20	1,191	0,437	2,740	438
	80	1/ 10	0,427	1,712	51,558	4124	80	1/ 10	1,095	0,535	3,443	274
	40	1/ 5	0,462	1,642	43,939	1757	40	1/ 5	1,091	0,539	3,465	139
		ORTALAMA	—	—	—	28282		ORTALAMA	—	—	—	612
% 15	5120	1/ 640	0,705	1,160	14,478	74128	5120	1/ 640	2,584	—	—	—
	2560	1/ 320	0,668	1,234	17,144	43890	2560	1/ 320	1,711	0,09	0,807	2067
	1280	1/160	0,590	1,388	24,484	31339	1280	1/160	1,230	0,397	2,500	3200
	640	1/ 80	0,499	1,569	37,106	23947	640	1/ 80	1,024	0,608	4,056	2596
	320	1/ 40	0,430	1,706	50,856	16274	320	1/ 40	0,910	0,724	5,302	1696
	160	1/ 20	0,402	1,761	57,796	9247	160	1/ 20	0,652	0,987	9,721	1555
	80	1/ 10	0,432	1,702	50,394	4031	80	1/ 10	0,564	—	—	—
	40	1/ 5	0,347	1,871	74,307	2972	40	1/ 5	0,452	—	—	—
		ORTALAMA	—	—	—	25703		ORTALAMA	—	—	—	22221

Tablo-Ek.1'in devamı

AT II. PARTİ

I. ÖRNEK							II. ÖRNEK					
% KARŞIM	SULANDIRMA KATSAYISI	SULANDIRMA	OPTİK DANIŞITE	X DEĞERİ (Logaritma)	X DEĞERİ (anti Logaritma)	MİKTAR mg	SULANDIRMA KATSAYISI	SULANDIRMA	OPTİK DANIŞITE	X DEĞERİ (Logaritma)	X DEĞERİ (anti Logaritma)	MİKTAR mg
% 1	5120	1/ 640	1,797	—	—	—	5120	1/ 640	3,145	—	—	—
	2560	1/ 320	1,793	—	—	—	2560	1/ 320	3,037	—	—	—
	1280	1/160	1,369	—	—	—	1280	1/160	2,925	—	—	—
	640	1/ 80	1,352	—	—	—	640	1/ 80	2,936	—	—	—
	320	1/ 40	0,978	—	—	—	320	1/ 40	2,688	—	—	—
	160	1/ 20	0,910	—	—	—	160	1/ 20	2,471	—	—	—
	80	1/ 10	0,715	-0,610	0,245	20	80	1/ 10	2,137	-0,647	0,225	18
	40	1/ 5	0,619	-0,762	0,618	25	40	1/ 5	1,859	-0,268	0,539	21
		ORTALAMA	—	—	—	23		ORTALAMA	—	—	—	20
% 3	5120	1/ 640	1,559	—	—	—	5120	1/ 640	3,134	—	—	—
	2560	1/ 320	1,390	—	—	—	2560	1/ 320	2,937	—	—	—
	1280	1/160	1,247	—	—	—	1280	1/160	2,669	—	—	—
	640	1/ 80	1,122	—	—	—	640	1/ 80	2,431	—	—	—
	320	1/ 40	0,694	-0,527	0,296	95	320	1/ 40	1,807	-0,197	0,634	203
	160	1/ 20	0,520	0,57	1,437	230	160	1/ 20	1,463	0,271	1,866	298
	80	1/10	0,507	0,208	1,616	129	80	1/ 10	1,425	0,269	1,855	148
	40	1/ 5	0,441	0,468	2,941	118	40	1/ 5	1,319	0,467	2,932	117
		ORTALAMA	—	—	—	143		ORTALAMA	—	—	—	191
% 5	5120	1/ 640	1,154	—	—	—	5120	1/ 640	3,089	—	—	—
	2560	1/ 320	1,060	—	—	—	2560	1/ 320	2,824	—	—	—
	1280	1/160	0,878	—	—	—	1280	1/160	2,437	—	—	—
	640	1/ 80	0,752	-0,755	0,175	113	640	1/ 80	2,057	-0,538	0,289	185
	320	1/ 40	0,648	-0,346	0,450	144	320	1/ 40	1,557	0,143	1,390	445
	160	1/ 20	0,487	0,287	1,938	310	160	1/ 20	1,378	0,385	2,437	389
	80	1/ 10	0,406	0,606	4,039	323	80	1/ 10	1,331	0,450	2,824	226
	40	1/ 5	0,364	0,771	5,910	236	40	1/ 5	1,119	0,739	5,492	219
		ORTALAMA	—	—	—	225		ORTALAMA	—	—	—	293
% 10	5120	1/ 640	0,593	-0,129	0,741	3796	5120	1/ 640	2,631	—	—	—
	2560	1/ 320	0,583	-0,092	0,811	2078	2560	1/ 320	2,218	-0,757	0,174	447
	1280	1/160	0,571	-0,043	0,905	1159	1280	1/160	1,689	-0,036	0,918	1176
	640	1/ 80	0,484	0,299	1,991	1275	640	1/ 80	1,384	0,378	2,391	1530
	320	1/ 40	0,437	0,496	3,133	1002	320	1/ 40	1,289	0,509	3,222	1031
	160	1/ 20	0,429	0,515	3,279	525	160	1/ 20	1,021	0,873	7,469	1195
	80	1/ 10	0,409	0,594	3,930	315	80	1/ 10	1,012	0,885	7,683	614
	40	1/ 5	0,357	0,799	6,298	252	40	1/ 5	0,885	1,058	11,444	457
		ORTALAMA	—	—	—	1300		ORTALAMA	—	—	—	703
% 15	5120	1/ 640	0,638	-0,307	0,493	2525	5120	1/ 640	2,356	-0,945	0,113	580
	2560	1/ 320	0,466	0,370	2,344	6002	2560	1/ 320	2,160	-0,678	0,209	536
	1280	1/160	0,438	0,480	3,022	3868	1280	1/160	1,424	0,324	2,109	2700
	640	1/ 80	0,426	0,527	3,369	2156	640	1/ 80	1,074	0,801	6,325	4048
	320	1/ 40	0,411	0,586	3,860	1235	320	1/ 40	0,907	1,028	10,680	3417
	160	1/ 20	0,346	0,842	6,958	1113	160	1/ 20	0,828	1,036	13,684	2189
	80	1/ 10	0,342	0,858	7,215	577	80	1/ 10	0,781	1,200	15,858	1268
	40	1/ 5	0,334	0,889	7,758	310	40	1/ 5	0,756	1,234	17,152	668
		ORTALAMA	—	—	—	2223		ORTALAMA	—	—	—	1925

9. TEŞEKKÜR

Doktora eğitim süresince her türlü yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof.Dr. Ergün ÖZALP'e, tez çalışmalarında büyük yardımlarını gördüğüm Sayın Prof.Dr. Burhan DİNÇER'e ve Sayın Doç.Dr. Bülent MUTLUER'e antiserumların üretimi aşamasında yardımlarını gördüğüm Patoloji Anabilim dalından Prof. Dr. Ayhan ÖZKUL'a ve Doç.Dr. Günay ALÇIĞIR'a, ELISA çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Viroloji bilim dalından Araş.Gör. Hüseyin PULAT'a ve Araş. Gör.Aykut ÖZKUL'a Protozooloji bilim dalından Doç. Dr. Ayşe ÇAKMAK 'a ve Nur SÖKMENSÜER'e, fotoğrafların çekiminde yardımcı olan Araş. Gör. Burhan ÖZBA'ya, istatistik değerlendirmelerinde katkıları olan Prof. Dr.H.Saim KENDİR'e, Prof.Dr. Alaattin KUTSAL ve Araş. Gör. Mehmet ORMAN'a, çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan Vet. Hekim Kd. Ütgm. Atilla KALKAN'a, çalışma arkadaşlarıma, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen kardeşlerime, bana doktora eğitimi olanağı sağlayan Kars Veteriner Fakültesi Yöneticilerine ve bu araştırmayı proje kabul ederek maddi destek sağlayan Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

10. ÖZGEÇMİŞ

Erzurum'da 24.12.1963 tarihinde doğmuşum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Erzurum'da bitirdim. 1981-1986 yılları arasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesinde yüksek öğrenimimi tamamladım. A.Ü. Kars Veteriner Fakültesinin açmış olduğu Araştırma Görevlisi sınavını kazanarak 20.02.1987 tarihinde Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim dalında göreve başladım. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim dalında 1987 yılında açılan doktora sınavını kazandım. Halen Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi adına Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesinde doktora yapmaktayım.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ