

## Derleme / Review

# Stafilokokal enterotoksinler

İrfan EROL, Özlem İŞERİ

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara

**Özet:** Stafilokokal gıda zehirlenmeleri başta *Staphylococcus aureus* olmak üzere enterotoksijenik stafilokoklar tarafından gıdalarda oluşturulan enterotoksinlerin alınması sonucu şekillenen ve tüm dünyada yaygın olarak görülen en önemli intoksikasyonlardan biridir. Enterotoksijenik stafilokoklar en fazla kırmızı et, kanatlı eti, balık eti ve ürünleri ile süt ve ürünleri gibi proteince zengin hayvansal gıdalarda bulunur. Enterotoksijenik stafilokoklar genotipik ve fenotipik özellikleri temel alınarak karakterize edilmişlerdir. Stafilokokal enterotoksinler (SE) yaklaşık 26-31 kDa'luk tekli polipeptidlerdir. SE'ler antijenik özellikleri temel alınarak 5 büyük serolojik tipe (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) ayrılmıştır. Son yıllarda SE'lerin yeni tiplerinin de var olduğu (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN ve SEO) bildirilmiş ancak bu enterotoksinlerin gıda zehirlenmeleri ile ilişkileri henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. SE'lerin spesifik olmayan T hücre proliferasyonunu uyaran süperantijen fonksiyonlarının yanı sıra güçlü gastrointestinal toksin olma özellikleri de vardır. SE'lerin ısıya ve tripsin, pepsin gibi gastrointestinal enzimlere dirençli olmaları en önemli özelliklerinden biridir. SEA stafilokokal gıda zehirlenmelerinde en sık rastlanan enterotoksindir ve bunu SED izlemektedir. İntoksikasyonun oluşabilmesi için 94-184 ng enterotoksinin alınması yeterlidir. SEA hücrenin logaritmik fazında üretilmekte ve  $\sigma^{70}$  benzeri bir faktörden etkilenmekte bunun yanı sıra SEB, SEC ve SED çoğunlukla eksponensiyel fazdan durgunluk fazına geçiş aşamasında üretilip accessory gene regulator (*agr*) tarafından regüle edilmektedir. SE'lerin enterotoksijenik ve süperantijenik aktivitelerinin açıklığa kavuşturulması için daha çok çalışmaya gereksinim duyulmaktadır.

Anahtar sözcükler: Enterotoksijenik stafilokok, enterotoksin, genotipik özellik, gıda

## Staphylococcal enterotoxins

**Summary:** Staphylococcal food intoxication is one of the most common types of foodborne disease around the world. Staphylococcal food poisoning results from the ingestion of food containing preformed staphylococcal enterotoxins produced by the enterotoxigenic staphylococci mainly *Staphylococcus aureus*. The bacterium is most prevalent in protein rich foods of animal origin such as meat, poultry, fish and milk products. Enterotoxigenic strains of staphylococci have been extensively characterized based on genotypic and phenotypic characteristics. SEs are single polypeptides of approximately 26 to 31 kDa. SEs have been divided into 5 major serological types (SEA through SEE) on the basis of their antigenic properties. In recent years new types of SEs (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, and SEO) have been also identified. However, little is known about relationship between the new SEs and foodborne intoxication at present. Staphylococcal enterotoxins (SEs) function both as potent gastrointestinal toxins as well as superantigens that stimulate non-specific T-cell proliferation. The intoxication generally is not lethal and the elderly are more susceptible than younger individuals. SEA is the enterotoxin most frequently associated with staphylococcal foodborne outbreaks followed by SED. The amount of enterotoxin necessary to cause intoxication is very small about 94-184 ng. SEs are resistant to inactivation by gastrointestinal proteolytic enzymes, such as trypsin and pepsin. The enterotoxins are quite heat resistant and the heat stability is very important property of SEs in terms of food poisoning. The SEA is produced throughout the log phase, while SEB, SEC, and SED are produced primarily during the transition from the exponential to the stationary phases of growth. Expression of SEB, SEC, and SED is affected by accessory gene regulator (*agr*), while SEA expressed simultaneously with the  $\sigma^{70}$ -like factor. Current methods for detection of the identified enterotoxins are based on the reaction between the enterotoxins and specific antibodies. More studies are needed to answer the questions regarding the activities of SEs both as enterotoxigenic and as superantigens.

Key words: Enterotoxigenic staphylococci, enterotoxin, genotypic property, food

## Giriş

Stafilokokal gıda zehirlenmeleri, enterotoksijenik özelliğe sahip stafilokokların gıdalarda  $10^6$  kob/g veya daha yüksek sayıya ulaşması sırasında sentezlenen bir ekzotoksin olan enterotoksinin, alimenter yol ile alımı

sonucu oluşmaktadır. *Staphylococcus aureus* enterotoksijenik stafilokoklar içerisindeki en önemli türdür. *S. aureus* dışında *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. epidermidis* türleri de enterotoksin oluşturma özelliğine sahiptir (6, 54).

Stafilokokal enterotoksinler (SE) gıda zehirlenmelerinin yanı sıra, toksik şok benzeri sendroma, artritise, alerjik reaksiyonlara ve otoimmün hastalıklara neden olmaktadır (3,39). SE'lerin ayrıca, spesifik olmayan T hücre proliferasyonunu uyaran süperantijen fonksiyonları da bulunmaktadır (31).

*S. aureus*, bir çok ülkede yaygın gıda zehirlenmesi olgularına neden olan ikinci veya üçüncü patojen olarak dikkati çekmektedir (2). ABD'de her yıl gıda kaynaklı hastalıklar nedeniyle 6-80 milyon insanın etkilendiği ve bunların yaklaşık 9000'inin ölümle sonuçlandığı ve yıllık yaklaşık 5 milyar dolarlık ekonomik kayıp meydana geldiği bildirilmektedir (12). Aynı ülkede stafilokokal gıda zehirlenmeleri sonucu ise üretim kaybı ve medikal masraflar nedeniyle yıllık yaklaşık 1.5 milyar dolar harcadığı bildirilmektedir (57).

### Stafilokokal enterotoksinlerin gıdalardaki varlığı

Başta hayvansal gıdalar olmak üzere değişik gıdalar stafilokokal gıda zehirlenmelerine sebep olmaktadır. Hayvan kökenli pişirilmiş veya az pişirilmiş gıdalardan sığır, domuz, hindi ve tavuk eti, özellikle süt tozu ve peynir olmak üzere süt ürünleri, etli patates salatası ve diğer et salataları, balık ve yumurta, kremalı pasta ürünleri ayrıca süt, şeker ve yumurtadan yapılan dondurulmuş soslar bunların başında gelmektedir (6).

Sokari (50), yaygın olarak tüketilen kırmızı et, balık ve sebzededen oluşan 880 gıda örneğinden izole ettiği 552 (%62) koagulaz pozitif *S. aureus* suşundan 269'unun (%48) enterotoksijenik olduğunu saptamış ve bunlar içerisinde SEA oluşturanların en sıklıkla bulunduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada incelenen balık örneklerinde ise SEB ve SEA enterotoksinleri dominant olarak bulunmuştur.

Yapılan başka bir çalışmada kanatlı çiftlikleri ve kanatlı işleme tesisleri ile işlenmiş kanatlı etlerinden izole edilen *S. aureus*'ların en çok SED'yi oluşturduğu saptanırken, bazı izolatların SEA, bazılarının ise SEA ve SED'nin her ikisini de oluşturduğu bildirilmiştir (32).

Kısa ve ark.(38) inceledikleri sade kremalı örneklerin 4'ünde (%36.4), kakaolu kremalı örneklerin 12'sinde (%22.6) ve meyveli kremalı örneklerin 9'unda (%28.1) olmak üzere toplam 25 (%26.0) pastadan izole edilen koagulaz pozitif stafilokokların stafilokokal enterotoksin oluşturma özelliğinde olduğunu saptamışlardır.

Erol ve Usca (22), toplam 50 donmuş piliç karkas örneğinin 33'ünden (%66) izole ettikleri koagulaz pozitif stafilokokların 7'sinin (%21.2) enterotoksin oluşturma özelliğinde olduğunu; bunlardan 3'ünün yalnızca SEA, 2'sinin yalnızca SED, 1'inin SEA ve SEB, 1'inin de SEA, SEB ve SEC'yi birlikte oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Erol ve ark. (23)'nın, A tipi enterotoksin oluşturan *S. aureus*'un çiğ köftede üreme ve toksin oluşturma yete-

neğinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada,  $10^3$ ,  $10^4$  ve  $10^5$  kob/g düzeyinde SEA oluşturan *S. aureus* ile deneysel olarak kontamine edilen çiğ köftelerin, 24 saatlik süre içerisinde oda sıcaklığında toksin oluşturmaları saptanmıştır.

Bone ve ark. (10) gıda zehirlenmelerine sebep olan, koyun sütünden yapılan peynirler üzerinde yaptıkları çalışmada canlı patojen bakterilerin varlığına rastlamazken, peynir örneklerinde *S. aureus* tarafından oluşturulan SEA'yı saptamışlardır.

Yine 1969-90 yılları arasında İngiltere'de 359 stafilokokal gıda zehirlenmesi bildirilmiştir. Kırmızı et, kanatlı eti ve bunlardan yapılan ürünler bu vakaların %75'inden sorumlu tutulmuştur. Diğer gıdaların ise balık ve deniz kabukluları ile süt ve süt ürünleri olduğu bildirilmiştir. Gıda örneklerinden izole edilen *S. aureus*'ların %79'unun SEA'yı ya tek başına ya da diğer enterotoksinlerle birlikte oluşturduğu saptanmıştır (60).

### Enterotoksinlerin biyolojik etkinliği ve toksisitesi

Stafilokokal gıda zehirlenmesi, enterotoksijenik stafilokoklar tarafından gıdada oluşturulan toksinlerin alimenter yolla alınması sonucu oluşur. Stafilokokal gıda zehirlenmesinde semptomlar 30 dakika ile 8 saatlik bir zaman arasında ortaya çıkmasına rağmen genellikle 2 ile 4 saat içinde görülür. İntoksikasyon mide bulantısı, kusma, şiddetli kramplar, abdominal ağrı ve diyare ile karakterizedir. Baş ağrısı, baş dönmesi, genel halsizlik, nabızda zayıflık, yüzeysel solunum, şok ve enteritis daha az görülen diğer semptomlardır (30,54).

Kusma, stafilokokal gıda zehirlenmelerinde sıklıkla görülen bir semptomdur. Toksinlerin bağırsaktaki lokal sinir reseptörlerini uyarmasına bağlı olarak vagus ve sempatik sinirler üzerinden geçen impulsların beynin subkortikal kusma merkezine ulaşması sonucu emetik tepki oluşmaktadır (54). Stafilokokal gıda zehirlenmesinde ikinci en yaygın olarak görülen semptom diyaredir. Stafilokokal enterotoksinlerin intestinal hücreler üzerine direkt etkisi açık değildir ve bu yüzden kolera toksini veya *Escherichia coli* enterotoksinleri gibi klasik enterotoksinlerden farklıdır (30,54).

Stafilokokal gıda zehirlenmesi olgularında ölüm nadirdir. Ancak çocuklar ve yaşlılarda ölüm oranının %0.03'ten %4.4'e kadar değiştiği bildirilmiştir. İntoksikasyon kendi kendini sınırlamakta ve 24-48 saat içerisinde hızlı bir şekilde iyileşme görülmektedir (33, 36).

Toksin tipine bağlı olarak SE'nin dozu değişir. Genel olarak alınan gıdanın 1 gramında 1ng SE bulunması belirtilerin ortaya çıkması için yeterli olmaktadır (54). Çoğu klasik kaynaklarda uzun yıllar minimum toksin dozunun 1 µg veya daha az olarak bildirilmesine rağmen, 94-184 ng düzeyindeki SEA'nın okul çocuklarında intoksikasyona neden olduğu bildirilmiştir (24).

## Enterotoksin oluşumunu etkileyen faktörler

### Ekstraselüler faktörler

**Besin maddeleri:** Qi ve Miller (46) düşük su aktivitesi değerine sahip besi yerine prolin ilave edilmesiyle SEB oluşumunun stimüle edildiğini ancak, glisin, betain ve karnitin ilavelerinde bu etkinin görülmediğini bildirmişlerdir. Demir, inorganik fosfat, karbondioksit veya bikarbonat içeren besiyerleri sekonder metabolitlerin oluşumunu artırmaktadır (14). Magnezyumun SEC, demirin ise SEB oluşumunu yüksek düzeyde etkilediği bildirilmiştir (40).

**Sıcaklık:** *S. aureus*'un üremesi için gerekli optimum sıcaklık derecesi 37°C iken enterotoksin üretimi için optimum sıcaklık 40-45°C arasında değişmektedir (Tablo 1)(20).

Tablo 1. *S. aureus*'un üreme ve toksin oluşturmaya ilişkin parametreler (20).

Table 1. Conditions for the growth and toxin production of *S.aureus*

	Üreme		Toksın oluşturma	
	Optimum	Spektrum	Optimum	Spektrum
<b>Sıcaklık (°C)</b>	37	6.7-47.8	40-45	10-47.8
<b>PH</b>	6.7	4- 10	6-7	4.5-9.8
<b>A<sub>w</sub> değeri</b>	0.98	0.83-0.99	0.98	0.86->0.99
<b>% NaCl</b>	0	0-20	0	0-10
<b>Atmosfer</b>	Aerob	Aerob- anaerob	Aerob	Aerob- anaerob

**pH değeri:** Enterotoksinlerin oluşumu için optimum pH değerleri 6-7 arasındadır. SEB oluşumu ile karşılaştırıldığında SEA oluşumu pH değişikliklerine daha toleranslıdır (58).

**Atmosferik koşullar:** Belay ve Rasooly (5), anaerobik koşulların *S. aureus*'un gelişimi ve SEA oluşumu üzerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, stafilokokal hücre yoğunluğunun aerobik koşullarda anaerobik koşullara göre 9-17 kat daha fazla olduğu bulunmuş ve SE oluşumunun gelişmeye bağlı olduğu gösterilmiştir. Anaerobik ortamda yavaş gelişme az toksin oluşumuna neden olurken her iki koşulda da inkübasyonun 120. dakikasından sonra SEA belirlenebilmiştir.

**Sodyum klorür ve su aktivitesi:** % 5'lik NaCl konsantrasyonları tuzsuz ortamlara oranla *S. aureus* üremesini artırırken, %7.5 ve %10 düzeylerindeki tuz konsantrasyonu üremeyi kısmen geciktirdiği bildirilmiştir (13). Qi ve Miller (46)'ın, düşük a<sub>w</sub> değerinin SEA ve SEB biyosentezi üzerine etkisini araştırdıkları bir çalışmada, SEB oluşumunun düşük a<sub>w</sub> değerine SEA oluşumundan daha duyarlı olduğunu ortaya koymuşlardır.

**Diğer kimyasal maddeler:** Laktobasiller tarafından üretilen veya gıdalara ilave edilen hidrojen peroksit *S. aureus*'un üremesini inhibe edebilmektedir (17). Sheldra-

ke ve ark.(49) 1000 mg/L iodyin *S. aureus* sayısının azaltılmasına oldukça etkili olduğunu saptamışlardır.

Domenech ve ark. (19) *S. aureus* FRI-100 ve FRI-472 suşlarının gelişimi üzerine en fazla prüvik asit, FRI-137 suşuna laktik asit ve S6 suşuna laktik, sitrik, asetik, prüvik ve propiyonik asitlerin hepsinin etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada laktik asidin enterotoksin sentezini büyük ölçüde inhibe ettiği saptanmıştır.

**Rekabetçi özellik:** Stafilokoklar genel olarak zayıf rekabetçi özelliğe sahip bakterilerdir. Sıvı besi yerinde *Pediococcus cerevisiae* ve toksin oluşturan *S.aureus* suşları arasındaki etkileşimler stafilokokların 20 kat daha az SEA, SEB ve SEC oluşturmalarıyla sonuçlanmıştır (29).

Erol ve Hildebrandt (21), SEA oluşturma özelliğindeki *S. aureus* 'un farklı sıcaklıklarda olgunlaştırılan fermente Türk sucuğunda *Lactobacillus plantarum* ve *Staphylococcus carnosus* starter kültür kombinasyonu ile baskılandığını bildirmişlerdir.

Mutluer ve ark. (42) salamura beyaz peynir yapımında *Streptococcus lactis* ve *Streptococcus cremoris* starter kültür kullanımının, SEA, SEB, SEC ve SED oluşturma özelliğindeki *S. aureus* 'un gelişimini ve toksin oluşumunu tamamen inhibe ettiğini saptamışlardır.

Gonzalez ve ark. (28) endüstride kullanılan ve *Lactobacillus sake*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Staphylococcus xylosus*'dan oluşan starter kültür kullanımının stafilokokal enterotoksinlerden A, B, C1 ve D'nin sentezini tamamen inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

### İntraselüler faktörler

Stafilokokal enterotoksin tiplerinin oluşturulmasında enterotoksijenik özellikteki stafilokok hücrelerinin bulunduğu gelişme fazları önemli etkiye sahiptir. Buna ilişkin olarak SEA, hücrenin logaritmik fazında, SEB, SEC ve SED geç logaritmik faz veya erken duraklama fazında oluşturulur (6). Ayrıca sekonder metabolitler de kendilerini oluşturan bakteriler üzerine inhibitör bir etki yapabilir. Bu çerçevede SEB'i oluşturan *S. aureus* suşlarının gelişme siklusu süresince toksin tarafından baskılandığı saptanmıştır (30).

*S. aureus*'un virulens faktörlerinin düzenlenmesinde *agr* (accessory gene regulator) geninin rolü büyüktür. *Agr* lokusundaki mutasyonlar bir çok SE ve diğer ekzo-proteinlerin oluşumunun azalmasıyla sonuçlanır. *Agr* tarafından gen transkripsiyonal ve translasyonel olarak düzenlenebilir. *Agr*'nin SEB ve SEC'yi transkripsiyonal düzeyde regüle ettiği ve bakteriyel gelişme siklusu boyunca *agr*'nin aktif hale geçmesi ile SEB ve SEC ve SED oluşumunun aynı zamana rastladığı bildirilmiştir. Bütün SE'ler *agr* tarafından regüle edilmemektedir. Örneğin SEA erken oluşturulduğu için *agr* mutasyonlarından etkilenmemektedir (56).

*Agr* nötral pH değerlerinde en yüksek düzeyde aktive olur. Glikoz içeren düşük pH'lı besiyerlerinde

*agr*'nin hedef aldığı genlerin negatif olarak regüle edildiği ve ekzoprotein oluşumunun azaldığı veya hiç oluşmadığı bildirilmiştir (35). Bununla beraber bakteri yoğunluğunun düşük olduğu ortamlarda *agr* aktif hale geçememekte dolayısıyla adezinlerin yukarı düzenlenmesiyle yani aktif hale geçmesiyle toksin ve enzimlerin oluşumu engellenmektedir. Bakteri yoğunluğunun fazla olduğu durumlarda *agr*'nin yukarı, adezinlerin aşağı düzenlenmesiyle toksin ve enzimlerin salınabildiği bildirilmiştir (61).

*S. aureus*'un gelişme fazları boyunca SE oluşumunun sigma faktörlerinden etkilendiği saptanmıştır. *S. aureus*'un logaritmik faz kültürlerinden saflaştırılmış RNA polimerazın,  $\sigma^{70}$  ile ilişkili bir faktör içerdiği ve bu holoenzimin salınımı ile, SEA oluşumunun logaritmik fazın erken aşamalarına rastladığı bildirilmektedir (47).

*S. aureus* tarafından oluşturulan değişik enterotoksin tiplerinin miktarları da suşa bağlı olarak farklılık göstermektedir. Gelişme siklusu periyodunca oluşturulan SEB ve SEC düzeyi çok yüksek miktarlara (350  $\mu\text{g/ml}$ ) ulaşabilmekte buna karşın diğer SE'ler SEB ve SEC'den çok daha az miktarlarda oluşturulmaktadır (51). Çoğu *S. aureus* suşlarının iki veya daha fazla enterotoksin oluşturabildiği bildirilmektedir (6).

### Enterotoksinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri

SE'ler tek zincirli basit proteinlerden oluşan heterojen bir gruptur. Bunların çoğu nötral ya da bazik proteinlerdir (35). Hidroliz yoluyla 18 aminoasit üretirler ve yüksek oranda lizin, aspartik asit, glutamik asit ve tirozin içerirler. Zincirde sadece iki adet yarım- sistin rezidüsü ile bir veya iki adet triptofan molekülü bulunur (6,36). SE'lerin DNA analizi çalışmalarında ilk olarak SEB'nin aminoasit dizilimi belirlenmiştir. SEB'nin N-terminalinde glutamik asit, C-terminalinde ise lizin aminoasidi bulunmaktadır. SEA, SEB, SEE 239-296 aminoasit rezidüsünden oluşur. SEC3, 236 aminoasit rezidüsü içerir ve N-terminal ucunda serin aminoasidi bulunmaktadır. Oysa SEC1'in N-terminalinde glutamik asit yer alır (36). Aminoasit bileşimi yönünden SEA, SED ve SEE birbirlerine benzerken, SEB ise SEC1, SEC2 ve SEC3'e benzerlik göstermektedir. Benzerlikler özellikle metiyonin ve löysin içerikleri yönündendir. Örneğin SEB ve SEC'ler 7 veya 8 metiyonin rezidüsüne sahipken SEA, SED ve SEE 1 veya 2 rezidü içermektedir (6).

SE'ler higroskopik özellik göstererek su ve tuzlu solüsyonlarda çözünebilme özelliğine sahiptirler. Enterotoksinler pH<2'de pepsin hariç insan intestinal sisteminin proteolitik enzimlerine dirençlidir (27).

Isıya dayanıklılık SE'lerin en önemli özelliği olup gıdalardaki enterotoksinlerin pişirme, pastörizasyon veya diğer ısı uygulamaları ile tamamen inaktive edilemedikleri bildirilmektedir (36). Tibana ve ark. (55) SE'lerin ısıya dayanıklılıkları üzerine yaptıkları bir çalışmada, SEA ve SEB'nin 100°C'de 90 dakikada, 120°C'de 30

dakikada, SEC'nin 100°C'de 180 dakikada, 120°C'de 60 dakikada tamamen inaktive olduğunu bildirmişlerdir. Termal dayanıklılıkta önemli kriterler; toksinin saflığı, serolojik tipi, yaklaşık toksin miktarı, ısı işlemi uygulanan medium, ortamın pH değeri ile teşhis ve saptama yöntemidir (6).

Toksinler kurumaya ve gama ışınlarına yüksek direnç gösterirler. Rose ve ark. (48) tarafından yapılan bir çalışmada tampon çözelti içinde SEA toksinlerinin 8.0 kGy gama ışını uygulaması ile yıkımlandığı, bununla beraber kıyma örneklerinde bu düzeydeki ısı uygulamalarından sonra SEA'nın %27-34'ünün yıkımlanmadığı saptanmıştır.

### Stafilokokal enterotoksinlerin genetik özellikleri

Stafilokokal enterotoksinler (SE) filogenetik ilişki, yapı ve dizilim homolojisini paylaşan stafilokokal ve streptokokal pirojenik ekzotoksinlerden (PT) oluşan geniş bir familya içerisinde yer alır. Bu gruba stafilokokal enterotoksinler, toksik şok sendrom toksininin (TSST) iki formu ve streptokokların pirojenik ekzotoksinlerinin bir grubu (SPE A, B, C, F, G, H, J ve streptokokal süperantijen) dahildir (3,18).

SE'ler, 5 temel serolojik tipten oluşan (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) ısıya dayanıklı enterotoksinlerin oluşturduğu bir gruptur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda SE'lerin yeni tiplerinin de var olduğu (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN ve SEO) bildirilmiş ancak bu enterotoksinlerin gıda zehirlenmeleri ile ilişkileri henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (43).

### Enterotoksinlerin süperantijen aktiviteleri

Hücre içi immün cevapta temel işlev membrana bağlı T hücre antijen reseptörleri (TCR-T cell reseptör) tarafından antijenin tanınmasıdır (25). TCR, alfa ve beta ya da gama ve sigma zincirlerinden oluşmaktadır. Antijen sunan hücrelerin (APC-Antigen-presenting cell) üzerinde membrana bağlı proteinlerden MHC sınıf I ve sınıf II molekülleri yer alır. (26). Süperantijenler MHC sınıf II molekülleri ve T hücre reseptörlerinin spesifik V  $\beta$  bölgelerine bağlanarak antijen sunan hücreler ve T lenfositlerin aktivasyonuna yol açmaktadırlar (39). Diğer bir ifadeyle süperantijenler, bilinen antijenlerden farklı olarak, antijen sunan hücreler tarafından küçük peptid parçalarına ayrılmadan MHC sınıf II moleküllerine bağlanır ve TCR ile bir trimoleküler form oluşturur (41).

SEA, SED, SEE, SEH, SEI, SEJ, SEK ve muhtemelen SEL ve SEM'nin MHC sınıf II molekülleriyle interaksiyonlarında proteaz aktiviteleri için  $\text{Zn}^{+2}$ ye gereksinim bulunmaktadır (45).

### SE'lerin filogenetik ilişkileri

PT familyası SE, toksik şok sendrom toksini (TSST-1) ve streptokokal pirojenik ekzotoksinleri (SPE) içermektedir. PT familyası üyelerinin filogenetik ilişkileri SPE tip A, SPE tip C, SEA, SEB, SEC, SEC1, SEC2,

SEC3, SED ve SEE'yi kodlayan genlerin nükleotid dizilimi tarafından belirlenmektedir. PT genleri arasında toplam 611 mutasyon oluşumu araştırılmış ve dizilim şekilleri hiyerarşik olarak iki geniş gruba ayrılmıştır. Bunlarda 1. grup streptokokal toksin SPEC'ye %51- 81 oranında aminoasit benzerliğiyle bilinen stafilokokal enterotoksinlerden SEA, SEE ve SED'yi içermektedir. Diğer grup dizilimleri ise SEC ve SEB'nin SPEA'ya %42-67 oranında benzer protein dizilimiyle yakın ilişkiye sahiptir (59).

SEJ'nin grup I'de yer alan toksinlere benzerliği daha fazladır (%52-66). SEI ve SEH, %31-38 dizilim kimliğiyle grup II toksinlerine daha yakın görülmesine rağmen SE'ler ile çok uzak ilişkilidir. Genel olarak her iki grup üyeleri arasındaki aminoasit benzerliği %22-33 arasında değişmektedir (3).

### SE'lerin dizi analizleri

**Stafilokokal Enterotoksin A (SEA):** SEA'yı kodlayan *entA* geni, bir bakteriyofaj tarafından taşınmaktadır (7,11). Bu fajın sirkularizasyon ve karşılıklı gen aktarımının bakteriyel kromozom içerisinde tamamlandığı saptanmıştır. *entA* geninin faj bağlanma bölgesine yakın bir yerde lokalize olduğu, 771 baz çiftinden oluştuğu ve 257 aminoasit rezidüsünün *entA* prekürsörünü kodladığı bildirilmektedir. Bu yapıda 24-rezidürlük bir N-terminal hidrofobik ön dizilimi işlenmekte ve 27,100 Da moleküler ağırlığındaki SEA'nın son şeklini oluşturmaktadır (8).

**Stafilokokal Enterotoksin B (SEB):** SEB salınımını düzenleyen *entB* geninin kodlama bölümü yaklaşık 900 nükleotit içerir. SEB prekürsör proteinleri 267 aminoasitten (31,400 Da) oluşur ve 27 aminoasitlik N-terminal sinyal peptidini içine alır (37). Gıda zehirlenmelerinde *S. aureus*'un klinik izolatları içinde *entB* geninin kromozomal yapıda olduğu, fakat diğer bakteri suşlarında genin 750 kb (kilobaz)'lık bir plazmid tarafından taşındığı bildirilmektedir (3).

**Stafilokokal Enterotoksin C (SEC):** Antijenik olarak SEC'nin SEC1, SEC2 ve SEC3 olmak üzere üç farklı alt tipi bulunmaktadır (15). Bütün SEC'ler 801 baz çifti ve 27 rezidürlük bir sinyal peptid içermektedir. SEC1 ve SEC2'nin sinyal peptidleri benzerdir. *entC1* nükleotid dizilimi *entB*'yi kodlayan genle %74, SPE A ile %59 gibi oldukça yüksek bir oranda benzerlik gösterir (9). SEC3'ün sinyal peptidi diğer SEC'ler ile %77.7'lik bir benzerlik gösterir. SEC3 ve SEC2'nin olgun formu arasında yalnızca 4 aminoasitlik bir fark (%98 benzerlik) vardır. Diğer yandan SEC1'in SEC2 ile arasında 7 (%97.4 benzerlik), SEC3 ile arasında da 9 aminoasitlik (%97.9 benzerlik) bir fark olduğu bildirilmiştir (34).

**Stafilokokal Enterotoksin D (SED):** SED'yi kodlayan gen olup bu gen 27.6-kb penisilinaz plazmidini üzerinde yer alır. Bu plazmid pIB485 olarak bilinir. *entD* geni 30 aminoasitlik sinyal peptid içeren 258 aminoasidi kod-

lar (4). 228 aminoasit olgun polipeptid yapısı 26,360 Da moleküler ağırlığa sahiptir ve diğer SE'lerin dizilimine yüksek düzeyde benzerlik gösterir. SED süperantijeni MHC sınıf II molekülleri ile yüksek düzeyde afinite göstermek için  $Zn^{+2}$  'ye bağlanır ve bunun sonucunda SED  $Zn^{+2}$  ile birlikte kristalize olur (53).

**Stafilokokal Enterotoksin E (SEE):** *entE* geni 771 baz çifti içerir ve 26.000 Da moleküler ağırlığı ile olgun ekstraselüler bir form oluşturur (16). DNA dizilimleri SEE, SED ve SEA'nın yakın ilişkili olduğunu göstermektedir (59). SEE, SEA ile birlikte %84 gibi yüksek bir oranda dizilim benzerliğini paylaşır (16).

**Stafilokokal Enterotoksin G (SEG):** *entG* geni 777 nükleotid içerir ve 233 aminoasitli toksine dönüşmek üzere bölünen 258 aminoasitli prekürsör proteini kodlar (1,41). SEG SPEA, SEB, SEC ve SSA'ya (streptokokal süperantijen A) en çok benzeyen toksindir (41).

**Stafilokokal Enterotoksin H (SEH):** SEH, 27,300 Da moleküler ağırlığında bir enterotoksindir. SEH grup I ile %36-38 oranında benzerlik gösterir (52). SEH, diğer SE'ler ile benzer yapıya sahiptir, fakat biyolojik özellikleri daha az karakterize edilmiştir. SEH, SEA'dan daha az potansiyele sahip olmasına rağmen insan T hücreleri içerisinde güçlü mitojenik aktivite gösterir ve insan MHC sınıf II molekülüne bağlanma afinitesi yüksektir (45).

**Stafilokokal Enterotoksin I (SEI):** *entI* geni 729 nükleotid içerir ve 242 prekürsör proteini kodlayan aminoasit ile sonlanır. 24,928 Da moleküler ağırlığında olgun proteinlere karşılık 218 aminoasitten oluşan toksin formuna dönüşür. SEI, grup I'e grup II'den daha çok benzerlik gösterir, fakat diğer SE'lere oranla bu benzerlik daha azdır. SEI %26-28 aminoasit oranıyla en fazla SEA, SEE ve SED'ye benzer (41).

**Stafilokokal Enterotoksin J (SEJ) :** *entD* bir plazmid tarafından kodlanmaktadır. Enterotoksin D ve J'nin açık okuma bölümleri zıt yönlerde yer almakta ve birbirinden her bir kolu 21 nükleotid uzunluğunda olan dönüşüm tekrarı içeren 895 nükleotid intergenik bölgeyle ayrılır. 269 aminoasitli SEJ proteini SEA, SEE ve SED'ye %64-66 oranlarında dizilim benzerliği gösterir. PCR uygulamaları, *entJ* determinantının bütün SED'leri kodlayan plazmidlerde bulunabileceğini düşündürmektedir (62).

**Stafilokokal Enterotoksin K (SEK):** SEK son zamanlarda keşfedilen yeni bir enterotoksindir. 26,000 Da moleküler ağırlığına sahiptir ve deneysel çalışmalarda izoelektrik noktası 7.0-7.5 olarak belirlenmiştir (44).

### Sonuç

Stafilokokal enterotoksinler hem gastrointestinal toksin olma hem de spesifik olmayan T hücre proliferasyonunu uyaran süperantijen fonksiyonlarına sahiptir. Bu iki farklı fonksiyonun birbiriyle ilişkili olup olmadığı hakkındaki şüpheler devam etmektedir. Son

yıllarda stafilocokal gıda zehirlenmeleri ile ilişkili kapsamlı bilgiler toplanmış ve SE'ler üzerine yapılan çalışmalarla moleküler açıdan dikkate değer bir ilerleme kaydedilerek son zamanlarda SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO gibi yeni enterotoksin tipleri saptanmıştır. Bununla beraber *S. aureus*'un canlı kalabilme, üreme ve gıdada toksin oluşturma yeteneğinin selektif olarak inhibe edilebilmesi için daha etkili yollar uygulayabilmek açısından moleküler yapısı hakkında daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır.

### Kaynaklar

1. **Abe J, Ito Y, Onimaru M, Kohsaka T, Takeda T** (2000): *Characterization and distribution of a new enterotoxin-related superantigen produced by Staphylococcus aureus*. Microbiol Immunol, **44**, 79-88.
2. **Atanassova V, Meindl A, Ring C** (2001): *Prevalence of Staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR*. J Food Prot, **63**, 1144-1153.
3. **Balaban N, Rasooly A** (2000): *Staphylococcal enterotoxins*. Int J Food Microbiol, **61**, 1-10.
4. **Bayles KW, Iandolo JJ** (1989): *Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D*. J Bacteriol, **171**, 4799-4806.
5. **Belay N, Rasooly A** (2002): *Staphylococcus aureus growth and enterotoxin A production in anaerobic environment*. J Food Prot, **65**, 199-204.
6. **Bergdoll MS** (1989): *Staphylococcus aureus*. 463-523. In: MP Doyle (Ed), Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, New York.
7. **Betley MJ, Mekalanos JJ** (1985): *Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage*. Science, **229**, 185-187.
8. **Betley MJ, Mekalanos JJ** (1988): *Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene*. J Bacteriol, **170**, 34-41.
9. **Bohach GA, Schlievert PM** (1987): *Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins*. Mol Gen Genet, **209**, 15-20.
10. **Bone FJ, Bogie D, Morgan-Jones SC** (1989): *Staphylococcal food poisoning from sheep milk cheese*. Epidemiol Infect, **103**, 449-458.
11. **Borst DW, Betley MJ** (1994): *Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression correlate with sea allele class*. Infect Immun, **62**, 113-118.
12. **Buzby JC, Roberts T** (1997): *Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness*. World Health Stat Q **50**, 57-66.
13. **Carpenter DF, Silverman, GJ** (1974): *Staphylococcal enterotoxin B and nuclease production under controlled dissolved oxygen conditions*. Appl Microbiol, **28**, 628-637.
14. **Ciborowski P, Jeljaszewicz** (1985): *Staphylococcal enzymes and virulence*. 146-183. In: IA Holder (Ed), Bacterial Enzymes and Virulence. CRC Press, Florida.
15. **Couch JL, Betley MJ** (1989): *Nucleotide sequence of the type C3 staphylococcal enterotoxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation*. J Bacteriol, **171**, 4507-4510.
16. **Couch JL, Soltis MT, Betley MJ** (1988): *Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene*. J Bacteriol, **170**, 2954-2960.
17. **Dahiya RS, Speck ML** (1968): *Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on Staphylococcus aureus*. J Dairy Sci, **10**, 1568-1572.
18. **Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM** (2000). *Exotoxins of Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Reviews, **13**, 16-34.
19. **Domenech A, Hernandez FJ, Orden JA, Goyache J, Lopez B, Suarez G, Gomez-Lucia E** (1992): *Effect of six organic acids on staphylococcal growth and enterotoxin production*. Z Lebensm Unters Forsch, **194**, 124-128.
20. **Erol İ** (2003): *Besin Hijyeni ve Mikrobiyolojisi*. Ders Notu. Ankara Üniv Vet Fak Besin Hijyeni ve Tek Anabilim Dalı. Basılmamış.
21. **Erol İ, Hildebrandt G** (1992): *Einfluss von Starterkulturen auf das Wachstum pathogener Keime in türkischer Rohwurst*. Fleischwirtsch, **72**, 90-97.
22. **Erol İ, Usca A** (1996): *Donmuş piliç karkaslarında izole edilen koagulaz pozitif stafilocokların enterotoksin oluşturma yeteneklerinin SET-RPLA testi ile belirlenmesi*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **43**, 443-448.
23. **Erol İ, Mutluer B, Vatansver L** (1993): *A tipi enterotoksin oluşturan Staphylococcus aureus'un çiğ köftede üreme ve toksin oluşturma yeteneğinin belirlenmesi*. Gıda, **18**, 315-318.
24. **Evenson ML, Hinds MW, Bernstein RS, Bergdoll MS** (1988): *Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk*. Int J Food Microbiol, **7**, 311-316.
25. **Fields BA, Malchiodi EL, Li H, Ysern X, Stauffacher CV, Schlievert PM** (1996): *Crystal structure of a T-cell receptor beta-chain complexed with a superantigen*. Nature, **384**, 188-192.
26. **Fink PJ, Matis LA, Mcelligott DL, Bookman M, Hedrick SM** (1986): *Correlations between T-cell specificity and the structure of the antigen receptor*. Nature, **321**, 219-226.
27. **Genigeorgis CA** (1989): *Present state of knowledge on staphylococcal intoxication*. Int J Food Microbiol, **9**, 327-360.
28. **Gonzalez-Fandos E, Otero A, Sierra M, Garcia-Lopez ML, Prieto M** (1994): *Effect of three commercial starters on growth of Staphylococcus aureus and enterotoxins (A-D) and thermonuclease production in broth*. Int J Food Microbiol, **24**, 321-327.
29. **Haines WC, Harmon LG** (1973): *Effect of variations in conditions of incubation upon inhibition of Staphylococcus aureus by Pediococcus cerevisiae and Streptococcus lactis*. Appl Microbiol, **25**, 169-172.
30. **Halpin-Dohnalek MI, Marth EH** (1989): *Staphylococcus aureus: Production of extracellular compounds and behavior in foods- A review*. J Food Prot, **52**, 267-282.
31. **Harris TO, Grossman D, Kappler JW, Marrack P, Rich RR** (1993): *Lack of complete correlation between emetic and T-cell-stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins*. Infect Immun, **61**, 3175-3183.

32. **Harvey J, Patterson JT, Gibbs PA** (1982): Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from poultry: Raw poultry carcasses as a potential food-poisoning hazard. *J Appl Bacteriol*, **52**, 251-258.
33. **Holmberg SD, Blake PA** (1984): Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. *J Am Med Assoc*, **251**, 487-489.
34. **Hovde CD, Hackett SP, Bohach GA** (1990): Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C3 gene: sequence comparison of all three type C staphylococcal enterotoxins. *Mol Gen Genet*, **220**, 329-333.
35. **Jablonski LM, Bohach GA** (1997): *Staphylococcus aureus*. 353-375. In: Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. MP Doyle, LR Beuchat, TJ Montville (Eds), ASM Press, Washington DC.
36. **Jay JM** (1996): Staphylococcal gastroenteritis. 429-450. In: Modern Food Microbiology. 5<sup>th</sup> ed., New York.
37. **Johns MB, Khan SA** (1988): Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with a discrete genetic element. *J Bacteriol*, **170**, 4033-4039.
38. **Kısa Ö, Albay A, Erol İ, Sırıken B, Esin N, Gün H, Yurtyeri A** (1996): Kremalı pastalardan izole edilen koagülaz pozitif stafilokokların enterotoksin oluşturma özelliklerinin VIDAS yöntemiyle belirlenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **43**, 405-411.
39. **Krakauer T** (1999): Immune response to staphylococcal superantigens. *Immunol Res*, **20**, 163-173.
40. **Morita TN, Patterson JE, Woodburn MJ** (1979): Magnesium and iron addition to casein hydrolysate medium for production of staphylococcal enterotoxins A, B, and C. *Appl Environ Microbiol*, **38**, 39-42.
41. **Munson SH, Tremaine MT, Betley MJ, Welch RA** (1998): Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, **66**, 3337-3348.
42. **Mutluer B, Erol İ, Kaymaz Ş, Akgün S** (1993): Enterotoksijenik *Staphylococcus aureus* suşlarının beyaz peynirde üretim ve olgunlaşma sırasındaki üreme ve enterotoksin oluşturma yetenekleri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **40**, 413-426.
43. **Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu, D-L, Ueda S, Shinagawa K** (2002): Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J Clin Microbiol*, **40**, 857-862.
44. **Orwin, PM, Leung DYM, Donahue HL, Novick RP, Schlievert PM** (2001): Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect Immun*, **69**, 360-366.
45. **Pettersson H, Forsberg G** (2002): Staphylococcal enterotoxin H contrasts closely related enterotoxins in species reactivity. *Immunology*, **106**, 71-79.
46. **Qi Y, Miller KJ** (2000): Effect of low water activity on staphylococcal enterotoxin A and B biosynthesis. *J Food Prot*, **63**, 473-478.
47. **Rao L, Karls RK, Betley MJ** (1995): In vitro transcription of pathogenesis-related genes by purified RNA polymerase from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **177**, 2609-2614.
48. **Rose SA, Modi NK, Tranter HS, Bailey NE, Stringer MF, Hambleton P** (1988): Studies on the irradiation of *Clostridium botulinum* and *Staphylococcus aureus*. *J Appl Bacteriol*, **65**, 223-229.
49. **Sheldrake RF, Hoare RJT, Hutchinson JE** (1980): Post-milking iodine teat skin disinfectants. I. Bactericidal efficacy. *J Dairy Res*, **47**, 19-26.
50. **Sokari T** (1991): Distribution of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat foods in eastern Nigeria. *Int J Food Microbiol*, **12**, 275-280.
51. **Su YC, Wong AC** (1993). Optimal condition for the production of unidentified staphylococcal enterotoxins. *J Food Prot*, **56**, 313-316.
52. **Su YC, Wong AC** (1995): Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin H. *Appl Environ Microbiol*, **61**, 1438-1443.
53. **Sundstrom M, Abrahmsen L, Antonsson P, Mehindate K, Mourad W, Dohlsten M** (1996): The crystal structure of staphylococcal enterotoxin type dreveals Zn<sup>2+</sup>-mediated homodimerization. *EMBO J*, **15**, 6832-6840.
54. **Sutherland J, Varnam A** (2002): Enterotoxin-producing *Staphylococcus*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*. 384-415. In: CW Blackburn, PJ McClure (Eds), Foodborne Pathogens. CRC press, Washington, DC.
55. **Tibana A, Rayman K, Akhtar M, Szabo R** (1987): Thermal stability of enterotoxins A, B, and C in a buffered system. *J Food Prot*, **50**, 239-242.
56. **Tremaine MT, Brockman DK, Betley MJ** (1993): Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*). *Infect Immun*, **61**, 356-359.
57. **Todd ECD** (1989): Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the United States. *J Food Prot*, **52**, 595-601.
58. **Tompkin RB, Ambrosino JM, Stozek SK** (1973): Effect of pH, sodium chloride and sodium nitrate on enterotoxin A production. *Appl Microbiol*, **26**, 833-837.
59. **Van Den Bussche RA, Lyon JD, Bohach G.A** (1993): Molecular evolution of the staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxin gene family. *Mol Phylogenet Evol*, **2**, 281-292.
60. **Wieneke AA, Roberts D, Gilbert RT** (1993): Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-1990. *Epidemiol Infect*, **110**, 519-531.
61. **Wisell, KT** (2000): Regulation of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. Karolinska University Press, Sweden.
62. **Zhang S, Iandolo JJ, Stewart GC** (1998): The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). *FEMS Microbiol Lett*, **168**, 227-233.

Geliş tarihi: 08.12.2003 / Kabul tarihi: 09.02.2004

**Yazışma adresi:**

Prof. Dr. İrfan Erol

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

06110 Dışkapı, Ankara

erol@veterinary.ankara.edu.tr

## Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

### Yayın Koşulları

1. Dergi, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nin hakemli bilimsel yayın organı olup, dört ayda bir yayımlanır. Derginin kısaltılmış adı "Ankara Üniv Vet Fak Derg" dir.
2. Dergide, tamamı ya da bir kısmı daha önce başka bir yerde yayımlanmamış orijinal bilimsel araştırmalar, derlemeler, gözlemler, kısa bilimsel çalışmalar ve akademik haberler yayımlanır. Derleme niteliğindeki çalışmalarda yazarın, o konuda ulusal ya da uluslararası düzeyde orijinal yayın ve araştırmalar yapmış olması koşulu aranır.
3. Yazılar, çift aralıklı (5 mm) olarak, kenarlarda yeterli boşluk (30 mm) bırakılarak ve 12 pt kullanılarak, A4 (210 x 297 mm) formunda beyaz kağıda yazılıp 2 nüsha halinde sunulmalıdır. Yazıların tamamı, şekil ve tablolar dahil olmak üzere orijinal bilimsel araştırmalarda 15, derlemelerde 10, gözlemlerde 5 ve kısa bilimsel çalışmalarda 3 sayfayı geçmemelidir.
4. Türkçe orijinal çalışmalar konu başlığı, yazar/yazarların adları, adresleri, Türkçe özet ve anahtar sözcükler, yabancı dilde başlık, yabancı dilde özet ve anahtar sözcükler, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç, teşekkür ve kaynaklar sırası ile hazırlanmalıdır. Yabancı dilde orijinal çalışmalar konu başlığı, yazar/yazarların adları, adresleri, yabancı dilde özet ve anahtar sözcükler, Türkçe başlık, Türkçe özet ve anahtar sözcükler, giriş, ... ve devamı şeklinde hazırlanmalıdır. Kısa bilimsel çalışmalarda, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç bölümlemesi yapılmaz. Konu başlığı, kısa ve açık olmalı ve küçük harflerle yazılmalıdır. Çalışmaya ilişkin açıklama dipnot işareti ile gösterilmelidir. Yazar/yazarlar, ad ve soyadları ile belirtilmelidir; soyadları büyük harflerle yazılmalıdır. Özet, tek paragraf halinde yabancı dilde 200-500 sözcük, Türkçe en çok 200 sözcük olmalıdır. Türkçe ve yabancı dilde anahtar sözcükler, alfabetik sıralanmış olarak yazılmalıdır. Giriş bölümünde, çalışma ile doğrudan ilgili kısa literatür bilgisi verildikten sonra, son paragrafta çalışmanın amacı vurgulanmalıdır. Bu bölüm 2 sayfayı geçmemelidir. Materyal ve Metot, gereksiz ayrıntıya girilmeden, öz ve anlaşılır biçimde yazılmalıdır. Bulgular bölümünde, veriler kısa bir şekilde açıklanmalıdır. Tablolarda verilen bulguların metinde tekrarlanmasından kaçınılmalıdır. Materyal ve Metot ile Bulgular bölümlerinde, alt başlıklar önce kalın, sonra italik yazı tipiyle belirtilmelidir. Kalın alt başlık sol kenarda, italik alt başlık ise paragraf başında yer almalıdır. Tablo ve şekil başlıkları, Türkçe ve yabancı dilde yazılmalıdır. Kısaltmalar, semboller ve ölçüler: Yazarlar her bir bilimsel kısaltmanın açılımını metinde ilk geçtiği yerde açıklamalıdır. Latince cins ve tür isimleri italik yazı tipi ile yazılmalıdır. Tüm ölçüler SI (Systeme Internationale)'ye göre verilmelidir. Tartışma ve Sonuç bölümünde, veriler literatür bilgilerinin ışığında tartışılmalı ve yorumlanmalıdır. Kaynaklar bölümünde, bibliyografik bilgi alfabetik sıra ile verilmeli, çok yazarlı çalışmalarda yazar adlarının arasına sadece virgül konulmalıdır. Kaynaklar alfabetik ve kronolojik dizin dikkate alınarak sıralanmalı ve numaralandırılmalıdır. Kaynak yazımında yazar adları kalın, konu başlığı italik yazı tipi ile yazılmalıdır. Dergi adlarının kısaltılmasında "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation"ın son baskısı esas alınmalıdır. Metin içerisinde kaynak, yazar soyadı yazılıp sıra numarası ile ya da sadece sıra numarası ile belirtilmelidir. Sıra numaraları paranteze alınmalıdır. Kaynak ikiden çok yazarlı ise, ilk yazarın soyadı yazılmalı, öteki yazarlar "ve ark." kısaltması ile belirtilmelidir. Metin içerisinde kaynak kullanımında, aynı konuyu bildiren 1'den çok kaynak varsa bunlar küçükten büyüğe doğru sıralanmalı ve sayıları da 5'i geçmemelidir. Kaynak bilimsel çalışma ise: Sandstedt K, Ursing J (1991): Description of the *Campylobacter upsaliensis* previously known as CNW group. *Syst Appl Microbiol*, 14, 39-45. Sandstedt K, Ursing J, Walder M (1983): Thermotolerant *Campylobacter* with no or weak catalase activity isolated from dogs. *Curr Microbiol*, 8, 209-213. Kaynak kitap ise: Falconer DS (1960): *Introduction to Quantitative Genetics*. Oliver and Boyd Ltd, Edinburgh. Kaynak kitaptan bir bölüm ise: Bahk J, Marth EH (1990): *Listeriosis and Listeria monocytogenes*. 248-256. In: DO Cliver (Ed), *Foodborne Diseases*. Academic Press, San Diego. Yazışma adresi, çalışmanın sonunda yer almalıdır. Çok yazarlı çalışmalarda yazarlardan sadece birinin adı, yazışma adresi olarak belirtilmelidir.
5. Dergide yayımlanan çalışmalarda her türlü sorumluluk yazarlarına aittir. Yayımlanması uygun görülen çalışmalar, Yayın Alt Komitesi'nin basıma ilişkin kararı ile istendiğinde yazarına/yazarlarına bildirilir. Yayımlanması uygun görülmeyen çalışmaların bir nüshası yazarına/yazarlarına iade edilir.
6. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'nde yayımlanacak olan, hayvan deneylerine dayalı bilimsel çalışmalarda "Etik Kurul Onayı Alınmıştır" ifadesi aranır.



## Veterinary Journal of Ankara University

### Instruction to Authors

---

1. The journal which is published three issues in a year, is the official journal of Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University. The abbreviation of the journal is "Vet J Ankara Univ".
  2. Original research articles, reviews, case reports and short communications on all aspects of veterinary science, which had not been previously published elsewhere in whole or in part, are published in the journal. In review articles, authors should have national or international research or publication on the subject. In animal experiments, authors will be required to certify that the study was conducted in a manner consistent with animal ethics. The content of paper is the author's responsibility.
  3. Manuscripts should be typed on A4 paper with 12 pt, double spaced and with ample margins. Manuscripts including figures and tables should not be longer than 15 pages for original research articles, 10 pages for review articles, 5 pages for case reports and 3 pages for short communications. Every page of manuscript should be numbered. Authors are urged to consult a recent issue of the journal and follow the style therein.
  4. Original research articles and case reports must be prepared in the following order: title, author(s), address(es), summary and key words, title, summary and key words in Turkish, introduction, materials and methods, results, discussion and conclusion, acknowledgement, references. In short communications, divisions except summaries should be omitted.  
 Title must be brief and explanatory, and written in small letters. Explanation(s) related to study should be written as footnotes.  
 Author(s) is written in full names. Use small letters for initials, and capitals for last name. Abbreviations are not allowed for addresses. Address of corresponding author and e-mail address must be also written at the end of manuscript.  
 Summary should not exceed 200 words in a single paragraph. Summary must include the basis of the study, a very brief method, findings and conclusion. Use of literature and detailed methods should be avoided. In short communications, summaries not exceeding 50 words should be included. Title and summary in Turkish will be supplied for foreigners by editorial board.  
 Key words up to six items must be given at the end of the summaries of both languages. Key words must be selected from indexes of accepted databases.  
 Introduction not exceeding two pages should include information that is directly related to study, and the aim of study in last paragraph.  
 Materials and Methods should be brief and explanatory, without extensive details. Classical methods may only be cited. Statistical analyses must be included if necessary.  
 Results should be brief and explanatory. Findings must be given either in text or in table; duplication of findings must be avoided.  
 Tables and figures must be given in separate sheets at the end of the manuscript. Vertical lines are not allowed in tables. Figures and prints must be of high quality. Color prints of high quality may be published. Legends of figures and prints must be brief and explanatory.  
 Abbreviations, symbols and units: Authors are asked to explain each scientific abbreviation (except commons such as DNA) at its first occurrence in paper; for example, transmissible venereal tumor (TVT). Genus and species names in Latin should be italicised. All measurement specifications must follow the SI (Système Internationale) units.  
 Discussion and Conclusion must include the evaluation of findings in the light of other studies. The final conclusion of the study must be clearly defined.  
 References should be listed in alphabetical order by numbers. In the body of text, references are arranged alphabetically and numbered. Reference number with or without author's last name must be given in the text. In the case of more than two authors, first author's name is followed by "et al.". In a single sentence, references should not exceed five. The periodicals must be abbreviated according to "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation". Please note the examples of references given below.  
 For article:  
 Sandstedt K, Ursing J (1991): Description of the *Campylobacter upsaliensis* previously known as CNW group. *Syst Appl Microbiol*, 14, 39-45.  
 Sandstedt K, Ursing J, Walder M (1983): Thermotolerant *Campylobacter* with no or weak catalase activity isolated from dogs. *Curr Microbiol*, 8, 209-213.  
 For book:  
 Falconer DS (1960): *Introduction to Quantitative Genetics*. Oliver and Boyd Ltd, Edinburgh.  
 For book chapter:  
 Bahk J, Marth EH (1990): Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. 248-256. In: DO Cliver (Ed), *Foodborne Diseases*. Academic Press, San Diego.
5. One original and one copy of manuscript for consideration, with a covering letter should be submitted to:  
 "Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı, Yayın Alt Komitesi, 06 110 Ankara, Türkiye"  
 All contributions are reviewed by two referees and may be subject to editorial revision. The editorial board accepts paper on the understanding that it fulfils the instructions and referee's comments. After final acceptance, a soft copy of manuscript (in diskette or CD) exactly matching printed version should be submitted. File saved must be in the native format of a common wordprocessor program

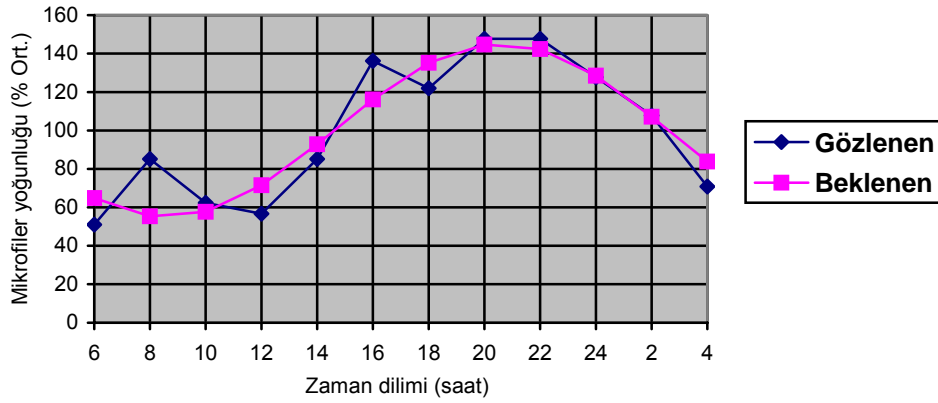
**Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**  
**2004 yılı danışmanlar listesi**

---

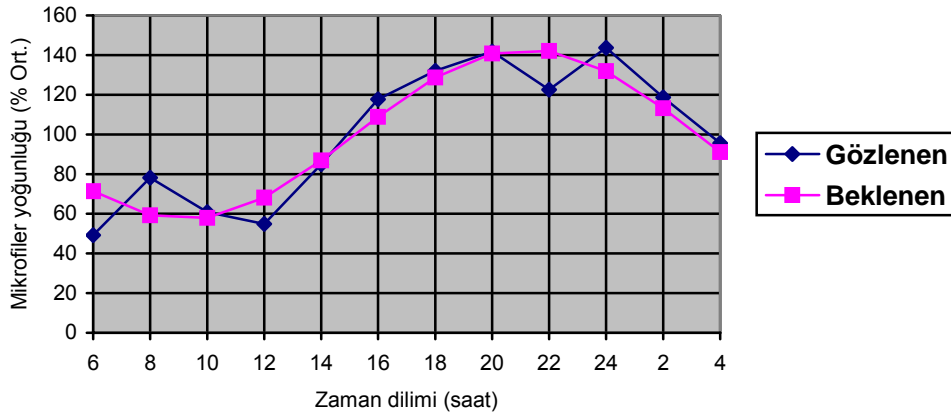
Erol ALAÇAM	Hatice ÖGE
Zeki ALKAN	Semih ÖGE
Sadi AKGÜN	Ceyhan ÖZBEYAZ
Çiğdem ALTINSAAT	Aytekin ÖZER
Selim ASLAN	Feridun ÖZTÜRK
Yılmaz AYDIN	Jale PARACIKLIOĞLU
Ali BAHADIR	Vedat SAĞMANLIGİL
Nihat BAYŞU	Rıfat SALMANOĞLU
Kazım BÖRKÜ	Oğuz SARIMEHMETOĞLU
Ayşe BURGU	Tevfik TEKELİ
Ahmet ÇAKIR	M. Emin TEKİN
Ayşe ÇAKMAK	Recep TINAR
Halil ÇERÇİ	Sadettin TIPIRDAMAZ
Ahmet DOĞANAY	Şakir D. TUNCER
Ömer M. ESENDAL	Hamdi UYSAL
İrfan EROL	Kemalettin YAMAN
U. Reha FİDANCI	Hakan YARDIMCI
Perran GÖKÇE	Ender YARSAN
Aslan KALINBACAK	Melih YAVUZ
Sezai KAYA	Gültekin YILDIZ
Osman KUTSAL	
Şükrü KÜPLÜLÜ	
Narin LİMAN	
Ahmet NAZLIGÜL	
Mehmet N. ORMAN	
Kamil ÖCAL	

## Düzeltilme

Derginin 2004 yılı, 51.cilt, 2.sayısı, 117-125 sayfaları arasında yayınlanan “*Dirofilaria immitis* ile enfekte köpeklerde mikrofiler periodisitesinin kantitatif analizi” başlıklı bilimsel makalenin 124.sayfasında yer alan şekillerin düzeltilmiş hali aşağıda verilmiştir.



Şekil 1. Köpek no 1’de gözlenen ve beklenen mikrofiler periodisitesi eğrileri  
Figure 1. Observed and expected microfilarial periodicity curves in dog no 1



Şekil 2. Köpek no 2’de gözlenen ve beklenen mikrofiler periodisitesi eğrileri  
Figure 2. Observed and expected microfilarial periodicity curves in dog no 2