

Karma Yemlerde Hayvansal Proteinlerin Kemik Dokusunun Morfolojik Özelliklerine Göre Işık Mikroskop ile Belirlenmesi

Habil UMUR¹ Hülya HANOĞLU ORAL² Figen KÜTÜKOĞLU¹

Özet: Sığırlarda bovine spongiform encephalopathy (BSE) olarak bilinen hastalığın en olası bulaşma yolunun, düşük düzeyde hayvansal protein içeren yemler olduğu ve enfekte olmuş materyalin geviş getiren hayvanlar tarafından tüketilmesinin, BSE'nin yayılmasını hızlandırdığı kabul edilmiştir. Bu durum Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde hayvansal proteinlerin kullanımı ile ilgili pek çok yasaklamaya ve ayrıca bazı tespit tekniklerinin araştırılmasına yol açmıştır. Hayvansal proteinler çeşitli yöntemlerle tespit edilebilmekle birlikte ışık mikroskobu AB'de yemlerdeki hayvansal proteinlerin tespitine yönelik onaylanmış tek resmi yöntemdir. Bu yöntemde, karma yemlerde hayvansal proteinlere özgü dokuların morfolojik özellikleri çeşitli boyama reaktifleri kullanılarak tanımlanmaktadır. Yöntem esas olarak hayvan yemlerinde bulunan kemik parçalarının karakteristik özelliklerine dayanmaktadır. Bu çalışmada; karma yemlerde hayvansal protein olarak kullanılan et-kemik unu, domuz unu, tavuk unu, balık unu ve hamsi ununa ait kemik dokusunun alizarin kırmızısı ve fenol-gliserin boyama ile ışık mikroskopunda tanımlanması amaçlanmıştır. Memelilere (geviş getiren hayvanlar ve domuz) ait kemik lakunaları yüksek büyütme seviyelerinde benzer şekle sahip olmuş; her ikisi de daha yüksek büyütme seviyelerinde eliptikten neredeyse küresel oyuklarla birlikte daha belirgin bir küresel görünüm sergilemiştir. Kümes hayvanlarından (tavuk) elde edilen kemik parçacıklarında lakunalar daha küresel ve yoğunlukları memeli kemik parçacıklarına göre daha yüksek olmuştur. Balık kılçığı tamamen farklı bir desen göstermiş, genellikle paralel kenarlı ve tüp şeklinde lakunalar gözlemlenmiştir. Sonuç olarak boyama yönteminin kemik parçalarının morfolojik özelliklerini etkilemediği, ancak kemiklerde alizarin kırmızısı boyama ile daha iyi bir tespitin sağlanabileceği kanıtlanmıştır. Mevcut uygulamada memeli kökenli kemikleri kümes hayvanı kökenli kemiklerden ayırmanın zor olduğu ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: Hayvansal protein, ışık mikroskobu, et ve kemik unu, balık unu, tanımlama

Determination of Animal Proteins in Compound Feeds Using Light Microscopy Based on Morphological Characteristics of Bone Tissue

Abstract: The most likely transmission route of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle is considered to be through feed containing low levels of animal protein, and the consumption of infected material by ruminant animals is acknowledged to accelerate the spread of BSE. This situation has led to numerous bans on the use of animal proteins in European Union (EU) countries and the exploration of various detection techniques. While various methods exist for detecting animal proteins, light microscopy is the only officially approved method for detecting animal proteins in feeds in the EU. In this method, the morphological features of tissues specific to animal proteins in compound feeds are identified using various staining reagents. The method primarily relies on the characteristic features of bone fragments present in animal feeds. This research aimed to identify the bone tissue of meat and bone meal, pork meal, chicken meal, fish meal, and anchovy meal as sources of animal protein in compound feeds using alizarin red and phenol-glycerin staining under light microscopy. Bone lacunae from mammals (ruminant animals and pigs) exhibited similar shapes at high magnification levels, both showing a more distinct spherical appearance with elliptical indentations at even higher magnification levels. Bone particles from poultry (chicken) had more spherical lacunae, and their densities were higher compared to mammalian bone particles. Fish bones displayed a completely different pattern, often with parallel-edged and tubular lacunae. As a result, it has been demonstrated that the staining method does not affect the morphological features of bone particles, but alizarin red staining provides better detection of bones. The study highlights the difficulty in distinguishing mammalian-origin bones from poultry-origin bones with current practices.

Keywords: Animal protein, light microscopy, meat and bone meal, fishmeal, identification

Giriş

Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde bovine spongiform encephalopathy (BSE) olarak bilinen hastalığın varlığı hayvansal gıda üretim zincirinde büyük bir risk oluşturmuş [1,2] ve 1 Ocak

¹ Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Bursa, TÜRKİYE

² Muş Alparslan Üniversitesi, Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Hayvansal Üretim ve Teknolojileri Bölümü, Muş, TÜRKİYE

2001'den bu yana, gıda üretimi için yetiştirilen hayvanların yemlerinde hayvansal proteinlerin kullanımına yasaklama getirilmiştir [3]. Dünyada BSE önlemlerine yönelik pek çok yem yasağı beraberinde alternatif ve tamamlayıcı tespit tekniklerinin araştırılmasına yol açmıştır. Bu konu ile ilgili olarak, AB'ye uyum çerçevesinde Türkiye'de de mevzuatlar değiştirilmiştir. Yemlerin Piyasaya Arzı ve Kullanımı Hakkında Yönetmelik'te hayvan besleme amacıyla kullanımı ve piyasaya sunumu yasaklanan ve kısıtlanan maddeler listesinde, 'hayvansal proteinlerin (et-kemik unu, kemik unu, kan unu ve diğer kan ürünleri, tavuk unu, balık unu, hidrolize protein ve benzeri) sığır, koyun, keçi gibi ruminant hayvanlarda kullanılması ve yemlerine katılması yasaktır' şeklinde düzenleme yapılmıştır [4].

Günümüzde yasaklı hayvansal proteinler ışık mikroskobu, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), enzim bağlı immün sorbent testi (ELISA), yakın kızılötesi spektroskopisi (NIRS) ve yakın kızılötesi mikroskopisi (NIRM) gibi çeşitli yöntemlerle tespit edilebilmektedir [2]. Bu yöntemler arasında ışık mikroskobu, yemlerde hayvansal proteinlerin olası varlığını tespit etmek için AB tarafından onaylanan ve kabul edilen tek resmi yöntemdir [5,6]. Yöntem, yemlerde hayvansal proteinlerin tespiti için doku kalıntılarının analizine dayanmaktadır. Hem kaba parçaların morfolojik yapılarının stereo mikroskopla gözlemlenmesini hem de ince parçacıkların histolojik yapılarının ışık mikroskobu ile incelenmesini içermektedir [7]. Mikroskopik analiz yöntemi özellikle kemik ve diğer sert anatomik parçaların tespiti için kullanışlıdır [8] ve et ve kemik unu formundaki hayvansal proteinleri yeterince düşük seviyelerde (<%0.1) neredeyse hiç yanlış negatiflik olmadan tespit edebilmektedir [9,1]. Yemlerde bulunan hayvansal kökenli parçacıkların ana kategorisi kemikler ve kas lifleridir. Kıkırdak, kıl, tüy filamentleri, yumurta kabukları, balık pulları ve solungaçları gibi ilave parçacıklar da mevcut olabilir. Organlardan, deriden ve diğer yumuşak dokulardan alınan parçalar genellikle bulunmaz veya varsa bile zorlukla tespit edilebilir. Kılar kaynak olarak memelileri, tüy iplikçikleri ve yumurta kabukları kuş materyalini ve balık pulları da balıkları işaret etmektedir. Ancak bu parçalardan birinin varlığı, birden fazla hayvan kökenli karışım olasılığını ortadan kaldırmaz [1]. Karma yemlerde et ve kemik unlarının varlığına yönelik kontrollerde en iyi sonuç kemik lakunalarının belirlenmesi ile alınmaktadır [10]. Liu ve ark. [1] tarafından bildirildiğine göre tipik uzun kemikler, genellikle merkezi bir kanal veya Haversian kanalı çevresinde dairesel lamel kümeleri halinde düzenlenmiş, kemik hücrelerini içeren bir lakuna modeli gösterir. Lakunalar birbirine ve merkezi kanala çok ince kanalikül ağıyla bağlanır. Kıkırdakta hücreler daha küresel delikler oluşturur ve kanalikül yoktur. Nikolovska ve ark. [11] memeli, kuş ve balık kemiklerine ait lakunaların morfolojik olarak büyük farklılıklar gösterdiğini bildirmişlerdir. Gizzi ve ark. [12] lakunaların kanalikülleri olmayan kemikler üzerinde uzunlamasına çizgiler gibi görünebildiğini veya uzun kanaliküllere sahip belirgin şekilde uzamış, iğ benzeri lakunalara sahip olabildiklerini ortaya koymuştur. Domenis ve ark. [13] kuş lakunalarını, yazılım kullanılarak zorlukla gözlemlenebilen kanaliküllere sahip, yoğun şekilde dağılmış olarak tanımlamaktadırlar. Kuşlardan farklı olarak, kara memelilerinin kemikleri, nispeten iyi görülebilen kanaliküllere sahip eliptik boşluklara sahiptir. Domuz kemikleri daha yoğun dağılmış olmaları ve kuş kemiklerine benzemeleri nedeniyle bu tanımlamadan farklılık göstermektedir [13]. Balık kemikleri belirgin biçimde uzun, iğ benzeri boşluklara ve uzun dallı kanaliküllere sahiptir [11].

AB'de yem maddelerinde hayvansal proteinlerin tespitine yönelik tek resmi yöntem olan ışık mikroskobu ile uygulamada memeli kökenli kemikleri kümes hayvanı kökenli kemiklerden ayırmanın zor olduğu, kara hayvanları ile balıklar arasındaki ayrımın ise sorun yaratmadığı [14] belirlenmiştir. Herhangi bir hayvansal protein içermemesi gereken geviş getiren yemlerin kontrolü için tespit yöntemi yeterlidir. AB mevzuatı farklı kara hayvanları arasında ayırım yapmamaktadır ve bu nedenle şu anda yalnızca kemik parçacıklarının varlığı güvenilir bir sonuca varmak için yeterlidir. Ancak halihazırda önerilen türler arası yasak [15], tanımlama için daha yeni bir yöntem gerektirmektedir.

Bu araştırmada; karma yemlerde hayvansal protein kaynağı et-kemik unu, domuz unu, tavuk unu, balık unu ve hamsi ununa özgü kemik dokusunun alizarin kırmızısı ve fenol-gliserin boyama yöntemleri ile ışık mikroskobunda belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

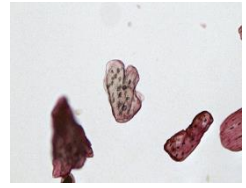
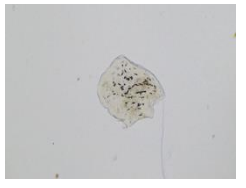
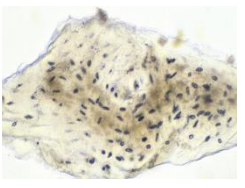
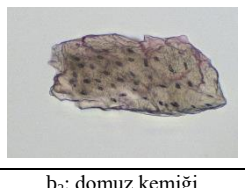
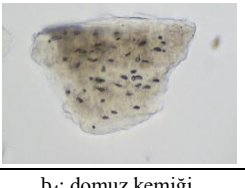
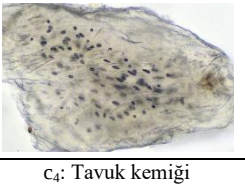
Yem Materyali: Araştırmada her birinden yaklaşık 2'şer kg olmak üzere 5'er adet sığır süt yemi, sığır besi yemi, yumurta tavuk yemi ve hindi besi yemi ile 1'er adet et-kemik unu, domuz unu tavuk unu, balık unu ve hamsi unu örnek olarak Bursa Bölgesinde faaliyet gösteren karma yem fabrikalarından 2023 yılında temin edilmiştir. Yem materyalleri Fritsch Pulverisette 14 (Idar-Oberstein, Almanya) laboratuvar değirmeninde 1 mm elek çapında öğütülmüş ve cam kavanozlarda laboratuvar şartlarında saklanmıştır. Hayvansal proteinli karma yem karışımları; karma yemlerin her birisi hayvansal proteinlerin her birisini %1 düzeyinde içerecek ve 500 g analiz numunesi elde edilecek şekilde hazırlanmıştır. Homojen bir karışım elde etmek için Waring 8011

EB SET2 blender kullanılmış ve 5 dakika karıştırma işlemi uygulanmıştır. Bu şekilde toplam 100 adet hayvansal proteinli karma yem karışımı hazırlanmıştır.

Mikroskopik Analiz Yöntemi: Hayvansal proteinli karma yem karışımlarındaki kemik dokusunun mikroskopik olarak tanımlanması alizarin kırmızısı ve fenol-gliserin indikatörleri ile boyanmış sedimentlerde lakuna ve kanaliküller görüntülenerek belirlenmiştir. Mikroskopik incelemelerde, 50-500X büyütme yapabilen Leica DM 750 P polarizan ışık mikroskobu kullanılmış ve LASX 5.03 programı ile veri aktarımı sağlanmıştır. Mikroskopik incelemelerde; her bir boyama yönteminde sedimentten en az 2 preparat hazırlanmış, her bir preparatta da en az 20 alanda inceleme yapılmıştır. Mikroskopik inceleme sonucunda en az 10 adet mikrograf elde edilmiş ve kemik dokusundaki lakuna ve kanalikülleri tanımlayan en iyi 5 adet mikrograf seçilmiştir. Mikroskopik inceleme için yaklaşık 50 g analiz numunesine EC 51/2013 [16]'da açıklanan yönteme uygun flotasyon işlemi uygulanmıştır. Analiz numunesinden 5 g'lık kısmı 250 ml'lik ayırma hunisine alınmış ve 50 ml tetrakloroetilen eklenmiştir. Karışım kuvvetli bir şekilde en az 30 saniye kadar çalkalanmıştır. Çalkalama esnasında huninin iç yüzeyine yapışan parçacıklar sonradan eklenen en az 50 ml tetrakloroetilen ile sıvı içine indirilmiştir. Karışımdan sedimentin ayrılması için ayırma hunisinin kapağı açılmadan en az 5 dakika beklemeye bırakılmıştır. Bu süre sonunda analiz numunesi sediment ve flotat olmak üzere 2 fraksiyona ayrılmıştır: Sediment (ayırma hunisinin dip kısmına çöken kısım) teflon musluk açılarak tüp içerisine aktarılmıştır. Tüp içerisine ayrılan sediment etüvde kurutulmuştur. Analiz numunelerinin flotasyonu ile elde edilmiş sedimentin alizarin kırmızısı indikatörü ile boyanmasında Frick ve ark. [17], fenol-gliserin ile boyanmasında ise Frick ve ark. [18] tarafından bildirilen yöntem kullanılmıştır.

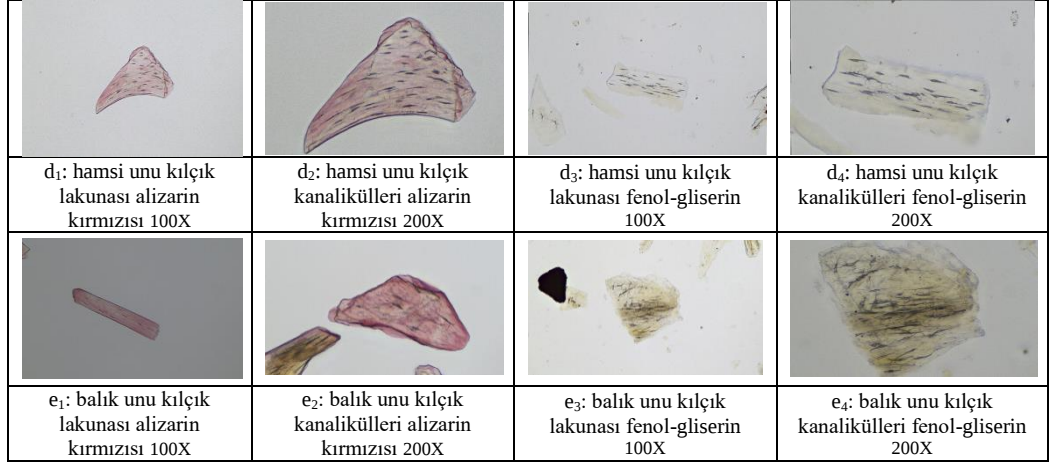
Bulgular

Hayvansal proteinli karma yem karışımlarında et-kemik unu, domuz unu ve tavuk unu kemik dokusunun alizarin kırmızısı ve fenol-gliserin indikatörü boyamaları ile belirlenen lakunaları ve kanalikülleri Şekil 1'de, balık unu ve hamsi unundaki kılçık dokularına ait lakuna ve kanalikülleri ise Şekil 2'de verilmiştir.

			
a ₁ : ruminant kemiği lakunası alizarin kırmızısı 100X	a ₂ : ruminant kemiği kanalikül alizarin kırmızısı 200X	a ₃ : ruminant kemiği lakuna fenol-gliserin 100X	a ₄ : ruminant kemiği kanalikül fenol-gliserin 200X
			
b ₁ : domuz kemiği lakunası alizarin kırmızısı 100X	b ₂ : domuz kemiği kanalikül alizarin kırmızısı 200X	b ₃ : domuz kemiği lakunası fenol-gliserin 100X	b ₄ : domuz kemiği kanalikül fenol-gliserin 200X
			
c ₁ : tavuk kemiği lakunası alizarin kırmızısı 100X	c ₂ : tavuk kemiği kanalikül alizarin kırmızısı 200X	c ₃ : tavuk kemiği lakunası fenol-gliserin 100X	c ₄ : Tavuk kemiği kanalikül fenol-gliserin 200X

Şekil 1. Et-kemik unu, domuz unu ve tavuk unu kemik dokusuna ait lakuna ve kanaliküller

Et-kemik unundaki kemik dokusunda bulunan lakunalar uzun, seyrek ve düzgün bir eliptik şekle sahipken; tavuk unu ve domuz unundaki kemik dokusunda yer alan lakunalar yoğun, düzenli ve birbirine çok benzer özellikler göstermiştir (Şekil 1). Ayrıca balık ve hamsi kemiklerinde yer alan lakunaların benzer bir görünüme sahip olduğu ve balık kemik dokusundaki lakunaların uzun eliptik şekilde olduğu belirlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Balık unu ve hamsi ununda kılçıktaki lakuna ve kanaliküller

Tartışma

AB’de BSE açısından ruminant yemlerinde, hayvansal proteinlerin varlığının belirlenmesi yeterli olmakta birlikte [2] kanatlı yemlerinde tür kısıtlaması olduğu için hayvansal proteinin menşinin tespit edilmesi önemlidir. Bu nedenle kanatlı yemlerine katılan ruminant, domuz, tavuk ve balık unlarının teşhis edilmesi gerekmektedir. Domuz ve balık yemlerinde hayvansal proteinlerle ilgili herhangi bir kısıtlama yoktur.

Araştırmada et-kemik unu içeren karma yem karışımlarında ruminant kemiğine ait lakunaların uzun, daha az sayıda, düzgün ve eliptik şekilde olduğu gözlenmiştir (Şekil 1; a₁, a₂, a₃, a₄). Lakunalar, ipliksi ağlar ile birbirine bağlı ve böceği andıran bir görünüm sergilemiştir. Bu bulgular Liu ve ark. [1] ve Van Raamsdonk ve ark. [10] tarafından bildirilen bulgular ile uyumludur. Tavuk unu içeren karma yem karışımlarında lakunaların daha çok sayıda, düzgün ve oval yapıları olduğu, kanaküllerin ise belirgin bir yapısının olmadığı belirlenmiştir (Şekil 1; c₁, c₂, c₃, c₄). Domuz unu içeren yem karışımlarında ise tavuk unundaki lakuna ve kanaküllere benzer bir görünüm belirlenmiştir (Şekil 1; b₁, b₂, b₃, b₄). Nitekim Van Raamsdonk ve ark. [10]’ın yapmış olduğu çalışmada, memelilerden (geviş getiren hayvanlar ve domuz) alınan kemik parçacıklarının aynı şekilde olduğu belirlenmiştir. Gizzi ve ark. [12] ise domuz kemiklerinin daha yoğun dağılmış olduklarını ve kuş kemiklerine benzediklerini bildirmişlerdir. Hamsi unu ve balık unu içerenlerin kılçık yapıları (Şekil 2) karasal kökenli hayvanların (ruminant, domuz ve tavuk) kemik yapılarından farklı bir görünüme sahip olmuştur. Lakunalar birbirine paralel, daha az sayıda ve uzatılmış eliptik şeklindedir. Hamsi unundaki kılçık yapılarında balık unundakilere göre farklı tipte lakunalar gözlemlenmiştir. Uzatılmış eliptik şekilde birbirine paralel lakunaların yanısıra yıldız şeklinde lakunalara da rastlanmıştır. Çalışma bulgularına benzer şekilde Liu ve ark. [1] farklı balık türlerinde farklı desenlere sahip lakunaların görüldüğünü belirtmişlerdir. Araştırmacılar balık kılçığında lakunaların genellikle paralel kenarlı ve tüp şeklinde olduğunu, ringa balığında uzun ve ışın şeklinde görülebilen ipliksi kanaliküllerin bulunduğunu bildirmişlerdir. Araştırmamızda hamsi ununda yıldız şeklindeki lakunalara daha az sıklıkta rastlanılmış, kanaliküller ruminant kemiğindeki benzer ipliksi yapıları sahne almış ve lakuna şekilleri birbirinden farklı ve ayırt edici özellik göstermiştir. Van Raamsdonk ve ark. [10] da ringa balığı ve hamsi balığında kılçıktaki lakunaların eliptik veya uzatılmış eliptik şeklinde olabileceğini ve düzensiz kanaliküllere sahip olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak karasal kökenli hayvanların kemik parçaları ve balık türlerine ait kılçığın alizarin kırmızısı ve fenol-gliserin indikatörleri ile boyanmasının, morfolojik özelliklerini etkilemediği, ancak kemiklerde alizarin kırmızısı boyama ile daha iyi bir tespitin sağlanabileceği sonucuna varılmıştır.

Sonuç

Işık mikroskobu, yemlerde hayvansal proteinleri tespit etmek için güvenilir ve kabul edilen bir yöntemdir. Ancak gelecekteki tür içi geri dönüşüm yasağı, yalnızca omurgalı sınıfları (memeli, kuş ve balık) düzeyinde hayvan yemi kökenleri arasında güvenilir bir ayırım yapılmasını değil, aynı zamanda örneğin sığır ve domuz gibi daha düşük taksonomi düzeylerinde de güvenilir bir ayırım yapılmasını gerektirmektedir. Ayrıca karada yaşayan hayvan sınıfları (memeli ve kuş) arasında ayırım yapmak için daha fazla bilgi edinilmelidir. Kemik parçalarının yanı sıra çizgili kaslar gibi diğer parçacıklar için de yeni özellikler ve ek açıklamalar geliştirilebilir.

Kaynaklar

1. Liu X, Han L, Veys P, Baeten V, Jiang X et al. An overview of the legislation and light microscopy for detection of processed animal proteins in feeds. *Microscopy Research and Technique* 2011; 74 (8): 735-743. <https://doi.org/10.1002/jemt.20951>
2. van Raamsdonk LWD, Vancustem J, Zegers J, Trick G, Jørgenson JS et al. The microscopic detection of animal proteins in feeds. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 2004; 8 (4): 241-247
3. Veys P, Baeten V. New approach for the quantification of processed animal proteins in feed using light microscopy. *Food Additives and Contaminants* 2010; 27 (7): 926-934, <https://doi.org/10.1080/19440041003671296>
4. Anonim. Yemlerin Piyasaya Arzı ve Kullanımı Hakkında Yönetmelik. R.G. 27.12.2011 tarih 28155 sayı, 2011.
5. Fumie`re O, Veys P, Boix A, von Holst C, Baeten V et al. Methods of detection, species identification and quantification of precessed animal proteins in feedingstuffs. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 2009; 13 (S): 59-70 <http://www.bib.fsagx.ac.be/base/text/v13ns/59.pdf>
6. Gizzi G, von Holst C, Baeten V, Berben G, van Raamsdonk L. Determination of processed animal proteins, including meat and bone meal, in animal feed. *Journal of AOAC International* 2004; 87 (6): 1334-1341. <https://doi.org/10.1093/jaoac/87.6.1334>
7. AOAC Int. AOAC official method 964.07. Microscopy of Animal Feed. 1998. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, MD.
8. Prado Rodríguez M, Casqueiro J, Iglesias Y, Cepeda A, Barros-Vel'zquez J. Application of a polymerase chain reaction (PCR) method as a complementary tool to microscopic analysis for the detection of bones and other animal tissues in home-made animal meals. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2004; 84 (6): 505-512 <https://doi.org/10.1002/jsfa.1693>
9. Engling FP, Jørgensen JS, Paradies-Severin I, Hahn H. Evidence of animal meal in feeds. *Kraftfutter/Feed Magazine* 2000; 1, 14-17.
10. Van Raamsdonk LWD, Pinotti L, Veys P, Campagnoli A, Paltanin C et al. Markers for microscopic detection. In: Jørgensen JS, Baeten V, (editors). *Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs*. 2012. Namur: Les Éditions namuroises.
11. Nikolovska R, Angeleska A, Gjorgjievski S, Blagoevska K, Uzunov R et al. The microscopic detection of animal proteins in animal feed regarding bovine spongiform encephalopathy. *Macedonian Veterinary Review* 2021; 44 (2): 169-178. <https://doi.org/10.2478/macvetrev-2021-0021>
12. Gizzi G, van Raamsdonk LWD, Baeten V, Murray I, Berben G et al. An overview of tests for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns regarding bovine spongiform encephalopathy. *Revue Scientifique et Technique* 2003a; 22 (1): 311-331 <https://doi.org/10.20506/rst.22.1.1399> PMID:12793788
13. Domenis, L, Squadrone, S, Marchis, D, Abete, M.C. Osteocyte lacunae features in different chicken bones. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 2009; 13 (S): 29-32 URL : <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=3519>.
14. Gizzi G, von Holst C, Baeten V, Berben G, van Raamsdonk LWD. Intercomparison study for the determination of processed animal proteins including meat and bone meal in animal feed. 2003b; Joint Research Centre, Ispra, Italy. 100 pp.
15. EC 1774/2002 (2002) laying down health rules concerning animal by-products not intended for human consumption. *Off. J. Eur. Communities*, 10.10.2002, L273, p. 1–95.
16. EC 152/2009 (2013) as regards the methods of analysis for the determination of constituents of animal origin for the official control of feed. *Commission Regulation (EU) No 51/2013. Amending Regulation*
17. Frick, G, Martensson, J, Paradies-Severin, I, Ujcic Vrhovnik, I, Veys, P. 2013a. EURL-AP Standard Operating Procedure Use of staining reagents, 4.
18. Frick, G, Martensson, J, Paradies-Severin, I, Ujcic Vrhovnik, I, Veys, P. 2013b. EURL-AP Standard Operating Procedure. Slide preparation and mounting, 4.

Teşekkür

Bu araştırma; TÜBİTAK 1005 - Ulusal Yeni Fikirler Ve Ürünler Araştırma Destek Programı kapsamında 2210064 Numaralı 'Türkiye'de Hayvansal Proteinlerin Karakteristik Özelliklerinin Mikroskopik Yöntemle Belirlenmesinde Kullanılan Web Tabanlı Karar Destek Programının Geliştirilmesi' isimli projenin sonuçlarından hazırlanmıştır. Yazarlar TÜBİTAK'a desteklerinden dolayı teşekkürlerini borç bilirlir.