

ISSN 1016-3573



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



ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ

JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY
ANKARA – TURKEY

Cilt/Volume 26 ♦ Sayı/Number 2 ♦ 2015

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi
Cilt/Volume 26 ♦ Sayı/Number 2 ♦ 2015
Journal of Etlik Veterinary Microbiology
Yılda iki kez yayımlanır / Published two times per year
ISSN 1016-3573

Sahibi

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Adına
Dr. Cevdet Yaralı
Enstitü Müdür V.

Editörler Kurulu / Editorial Board

Baş Editör / *Editor-in Chief*

Dr. Cevdet Yaralı

Editör Yardımcıları / *Co-Editors*

Dr. Erhan Akçay

Dr. Asiye Dakman

Dr. Ali Erkurt

Dr. Elçin Günaydın

Dr. A. Burak Güngör

Dr. Tahsin Onur Kevenk

Dr. Filiz Şen

Adres / Address

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü

Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No 21/21-A

06020 Etlik - Ankara / TÜRKİYE

Tel. : +90 312 326 00 90 (8 hat)

Faks : +90 312 321 17 55

URL : <http://vetkontrol.tarim.gov.tr/merkez/Sayfalar/AnaSayfa.aspx>

E-posta : etlikvetmikrobiyolderg@gmail.com

Hakem Listesi / Referee List*

Prof.Dr. Kürşat Altay	Kırgızistan Türkiye Manas Üniv. Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD.
Yrd.Doç.Dr. Yunus Emre Beyhan	Van Yüzüncü Yıl Univ. Tıp Fakültesi Parazitoloji AD.
Doç.Dr. Alper Çiftçi	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Prof.Dr Fatih Hatipoğlu	Selçuk Univ. Veteriner Fakültesi Patoloji AD.
Yrd.Doç.Dr. Fulya Taşçı	Mehmet Akif Ersoy Üniv. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi AD.
Doç.Dr. Armağan Erdem Ütük	Çukurova Üniv. Ceyhan Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD.
Prof.Dr. Yakup Yıldırım	Mehmet Akif Ersoy Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
Doç.Dr. Yeliz Yıldırım	Erciyes Üniv. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi AD.

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

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

Copyright © Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2015, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

Basım Tarihi / Publishing Date: Aralık / December 2015, Baskı adedi / Circulation: 500

Tasarım ve Baskı / Printing



Medisan Yayınevi Ltd.Şti.

Çankırı Cad. 45 / 347 Ulus - Ankara, Türkiye

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

İçindekiler / Contents

Case Report / Olgu Sunumu	Sayfa
<hr/>	
Molecular detection of <i>Eimeria stiedae</i> in an Angora rabbit	
Bir Ankara tavşanında <i>Eimeria stiedae</i> 'nin moleküler tanısı	
Armağan Erdem ÜTÜK, Fatma Çiğdem PİŞKİN, İbrahim BALKAYA, Mehmet Çağrı KARAKURUM	41
<hr/>	
Derleme / Review Article	
<hr/>	
Şap Hastalığı	
Foot and Mouth Disease: A review	
Ömer Barış İNCE, Özgür KANAT	45
Gıda Endüstrisinde Nanoteknoloji Uygulamaları	
Nanotechnology Applications In The Food Industry	
Erdem SAKA, Göknur TERZİ GÜLEL.....	52
Filogenetik Ağaçlandırma Metotları	
Phylogenetic Tree Construction Methods	
Seyyide SARIÇAM, H. Kaan MÜŞTAK.....	58

Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayım Koşulları

1. Dergi, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Etlık Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün hakemli, bilimsel yayın organı olup, yılda iki defa yayımlanır. Derginin kısaltılmış adı "Etlık Vet Mikrobiyol Derg" dir.
 2. Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'nde veteriner hekimlik alanında yapılan, başka bir yerde yayımlanmamış olan orijinal bilimsel araştırmalar, güncel derleme, gözlem, kısa bilimsel çalışmalar ve enstitüden haberler yayımlanır. Derleme şeklindeki yazılar; orijinal olması, en son yenilikleri içermesi, klasik bilgilerin tekrarı olmaması durumunda kabul edilir. Derlemeyi hazırlayan yazarın, o konuda ulusal ya da uluslararası düzeyde orijinal yayın ve araştırmalar yapmış olması koşulu aranır.
 3. Türkçe ve İngilizce olarak hazırlanacak metinler 12 punto Times New Roman yazı karakterinde, düz metin olarak, çift aralıklı ve kenarlarda 30 mm boşluk bırakılarak, A4 formundaki beyaz kağıda yazılmalıdır. Yazıların tamamı, şekil ve tablolar dahil olmak üzere orijinal bilimsel araştırmalarda 16, derlemelerde 10, gözlemlerde 6 ve kısa bilimsel çalışmalarda 4 sayfayı geçmemelidir.
 4. Microsoft Word formatındaki metin ile en az 300 dpi çözünürlükteki JPEG formatındaki resim/lerin tamamı etlikvetmikrobiyolderg@gmail.com e-posta adresine gönderilmelidir.
 5. Türkçe orijinal çalışmalar konu başlığı, yazar/yazarların adları, adresleri, Türkçe özet ve anahtar sözcükler, İngilizce başlık, İngilizce özet ve anahtar sözcükler, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç, teşekkür ve kaynaklar sırası ile hazırlanmalıdır. İngilizce orijinal çalışmalar konu başlığı, yazar/yazarların adları, adresleri, İngilizce özet ve anahtar sözcükler, Türkçe başlık, Türkçe özet ve anahtar sözcükler, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç, teşekkür ve kaynaklar şeklinde hazırlanmalıdır. Kısa bilimsel çalışmaların ve derlemelerin başlık ve özet bölümleri orijinal çalışma formatında, bundan sonraki bölümleri ise, derlemelerde; giriş, metin ve kaynaklar şeklinde, kısa bilimsel çalışmalarda ise bölümlendirme yapılmadan hazırlanmalıdır.
 6. Orijinal çalışmalar ve gözlemler aşağıdaki sıraya göre düzenlenerek yazılmalıdır.
- Başlık**, kısa, konu hakkında bilgi verici olmalı ve küçük harflerle yazılmalıdır.
- Yazar(lar)ın**, ad(lar)ı küçük, soyad(lar)ı büyük harflerle yazılmalı ve unvan belirtilmemelidir.
- Özet**, Türkçe ve İngilizce olarak, tek paragraf halinde ve en fazla 500 sözcük olmalıdır.
- Anahtar kelimeler**, alfabetik sıraya göre yazılmalı ve 5 sözcüğü geçmemelidir.
- Giriş**, konu ile ilgili kısa literatür bilgisi içermeli, son paragrafında çalışmanın amacı vurgulanmalı ve iki sayfayı geçmemelidir.
- Materyal ve Metot**, ayrıntıya girmeden, anlaşılır biçimde yazılmalıdır. Başlıklar kalın, alt başlıklar italik yazı tipiyle belirtilmelidir.
- Bulgular** bölümünde veriler, tekrarlama yapmadan açık bir şekilde belirtilmelidir. Tablo başlıkları tablonun üstünde, şekil başlıkları ise şeklin altında belirtilmelidir.
- Tartışma ve Sonuç** bölümünde, araştırmanın sonucunda elde edilen bulgular, diğer araştırmacıların bulguları ile karşılaştırılmalı ve literatüre olan katkısı kısaca belirtilmelidir.
- Teşekkür** bölümü, gerekli görülüyorsa kaynaklardan hemen önce belirtilmelidir.
- Kaynaklar** bölümünde, kaynaklar listesi alfabetik ve kronolojik olarak sıralanmalı ve numaralanmalıdır. Metin içerisindeki kaynak, yazar soyadı yazılıp sıra numarası ile; cümle sonunda ise sadece sıra numarası ile parantez içerisinde yazılmalıdır. Cümle sonunda birden çok kaynak belirtilecek ise kaynak numaraları küçükten büyük

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

Kaynak yazımı ve sıralaması aşağıdaki gibi yapılmalıdır;

Sürelı Yayın:

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

Yazarlı Kitap:

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

Editörlü Kitap:

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

Editörlü Kitapta Bölüm:

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

Kongre Bildirileri:

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

Tezler:

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

Anonim:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

14. Dergiye gönderilen yazılar geliş tarihine göre yayımlanır.

15. Yayımlanmayan yazılar, yazarına iade edilmez.

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Publication Conditions

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgements must be indicated before references if necessary.

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

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

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

For articles:

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

For books:

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

For edited books:

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

For chapter in edited books:

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

For congress papers:

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

For dissertations:

Aksoy E, (1997). *Sığır Vebası hastalığının histolojik ve İmmüno-peroksidaz yöntemiyle tanısı üzerine çalışmalar*. PhD Thesis, Ankara University Institute of Health Sciences, Ankara.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15. Unpublished papers are not returned to their author.

Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi
Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi - Ankara

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

Yayının adı:

Yazar/ların ad/ları:

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

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

Yazar ad/ları İmza Tarih

Yazışma Adresi:

Copyright Release

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Ankara - TURKEY

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

Title of paper:

Authors names:

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

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

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

To be signed by all author/s

Authors names Signature Date

Correspondence Address:

Molecular detection of *Eimeria stiedae* in an Angora rabbit

Armağan Erdem ÜTÜK¹, Fatma Çiğdem PİŞKİN², İbrahim BALKAYA³,
Mehmet Çağrı KARAKURUM⁴

¹ Çukurova University, Faculty of Ceyhan Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Adana, Turkey

² Veterinary Control Central Research Institute, Parasitology and Bee Diseases Laboratory, Ankara, Turkey

³ Ataturk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Erzurum, Turkey

⁴ Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Burdur, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 04.09.2015, Kabul Tarihi / Accepted: 16.10.2015

Abstract: Hepatic coccidiosis caused by *Eimeria stiedae*, results in severe infection, outbreaks and deaths in young rabbits. Disease is diagnosed by time consuming methods like fecal examination, oocyst sporulation and necropsy. The aim of this study was to detect *E.stiedae* with species specific Polymerase Chain Reaction (PCR), without waiting oocyst sporulation and necropsy. Impression smears were prepared from liver nodules and stained with giemsa. Fecal samples were collected from the intestines and examined by centrifugal flotation with salt solution to detect *Eimeria* spp. oocysts. Then oocysts were sporulated in 2.5% (w/v) aqueous potassium dichromate (K₂Cr₂O₇). Primers specific to *E.stiedae* were used in PCR reaction. *Eimeria* spp. oocysts were detected after the examination of impression smears and bowel content. *E.stiedae* was diagnosed after the measurement of sporulated oocyst and PCR. At the end of the study, we think that; PCR will be very valuable for the rapid and true diagnosis of hepatic coccidiosis in rabbits.

Key words: Angora rabbit, *Eimeria stiedae*, Molecular detection, Turkey.

Bir Ankara tavşanında *Eimeria stiedae*'nin moleküler tanısı

Özet: *Eimeria stiedae*'nin neden olduğu karaciğer coccidiosisi, genç tavşanlarda ciddi enfeksiyon, salgın ve ölümlerle sonuçlanır. Hastalık dışkı muayenesi, oocyst sporlandırma ve nekropsi gibi zaman alıcı yöntemlerle teşhis edilir. Bu çalışmanın amacı, *E.stiedae*'yi oocyst sporlandırma ve nekropsiyi beklemeden türe özgü Poimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile teşhis etmektir. Organ tuşeleri, karaciğer nodüllerinden hazırlanarak giemsa ile boyandı. Dışkı örnekleri bağırsaktan alınarak *Eimeria* spp. oocystlerini belirlemek için tuzlu su-flotasyon yöntemi ile incelendi. Elde edilen oocystler %2.5'lik potasyum dikromat (K₂Cr₂O₇) çözeltisinde sporlandırıldı. PZR'de ise *E.stiedae* için tür spesifik primerler kullanıldı. Organ tuşeleri ve bağırsak içeriğinin incelenmesi neticesinde *Eimeria* spp. oocystleri, PZR ve sporlandırılmış oocystlerin ölçümü sonucunda *E.stiedae* tespit edildi. Çalışma sonucunda PZR'nin tavşanlarda karaciğer coccidiosisinin hızlı ve doğru bir şekilde teşhisinde etkili bir yöntem olduğu kanısına varıldı.

Anahtar Sözcükler: Ankara tavşanı, *Eimeria stiedae*, Moleküler tanı.

Introduction

Rabbits are raised for various commercial purposes such as wool, fur and meat production. Additionally, they are important laboratory animals. Coccidiosis is an important parasitic disease of rabbits and causes high incidence of morbidity and mortality. The disease occurs in hepatic and intestinal forms [1].

Hepatic coccidiosis caused by *Eimeria stiedae*, results in severe infection, outbreaks and deaths in young rabbits. The parasite completes its development in bile ducts of liver. By time, bile ducts thicken and disrupt the liver function. Eventually, liver becomes markedly enlarged and irregular yellow-

ish and white nodules or cords develop on it, which later on tend to become integrated. Diarrhea and icterus can be seen in infected animals [1,2].

To date, a few studies about microscopic and histopathologic diagnosis of rabbit coccidiosis have been published in Turkey [3,4,5,6,7]. The aim this study was to detect *E.stiedae* with species-specific Polymerase Chain Reaction (PCR), without waiting oocyst sporulation and necropsy.

Material and Method

Liver and bowels of a 4-month old dead Angora rabbit were sent to the Parasitology Department from a rabbit farm. At the anamnesis, we learned

that 50 rabbits were in the flock and infected 20 of them died.

At macroscopic examination, there were a lot of yellow-white nodules on the liver and many of these nodules contained caseous material (Fig. 1).



Fig. 1: Yellow nodules throughout the liver parenchyma.

Impression smears were prepared and stained with giemsa. Fecal samples were collected from the intestines and examined by centrifugal flotation with salt solution to detect *Eimeria* spp. oocysts. Fecal samples were put into a solution of 2.5% (w/v) aqueous potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) and were allowed to sporulate. Oocysts were concentrated by zinc sulphate flotation method [8]. 20 sporulated oocysts were measured by oil immersion lenses on a microscope. All measurements were done as μm . Oocyst identification was done according to related literatures [9,10,11].

Genomic DNA extraction was done from the nodules on the liver tissue and oocysts, using DNeasy TM Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) by fol-

lowing the manufacturer's instructions. Before the extraction, liver tissue was broken into small pieces with a scalpel. Then, broken tissue and oocysts were washed with PBS for five times. Esti-ITS1-F (GTGGGTTTTCTGTGCCCTC) and Esti-ITS1-R (AAGGCTGCTGCTTTGCTTC) primer pair, species specific for *E.stiedae*, was used to amplify partial sequence of Internal Transcribed Spacer (ITS-1) fragment of ribosomal DNA (rDNA) repeats [12].

PCR reaction volumes of 50 μl contained 5 μl of template DNA (50 ng), 80 μM of dNTP mix, 2.5 mM of $MgCl_2$, 50 pmol of each primer, 5 μl of 10 \times PCR buffer and 1.25 U of TaqDNA polymerase (MBI, Fermentas, Lithuania) and 26 μl DNase, RNase free water (Biobasic, Inc). The PCR conditions were: 2 min at 95 $^{\circ}C$ (initial denaturation), 35 cycles of 1 min at 95 $^{\circ}C$, 1 min at 50 $^{\circ}C$ and 1 min at 72 $^{\circ}C$ and finally 5 min at 72 $^{\circ}C$ (final extension). The PCR products were separated on agarose gels (1.5%), stained with ethidium bromide and visualized on an UV transilluminator. DNase, RNase free steril distilled water (Biobasic, Inc), used as negative control.

Results

As a result of the microscopic examination of impression smears of liver and bowel content, we detected *Eimeria* spp. oocysts (Fig. 2). Oocysts, left in $K_2Cr_2O_7$ for sporulation, were oval-ellipsoid; there was no oocyst residuum, but there was a micropil. Sizes of oocysts were 19.7 X 36.1 (17-21 X 34-38) μm . Sporocysts were ellipsoid; there was a stidea body and a sporocyst residuum. Sizes of sporocysts were 8.9 x 15.0 (8-10 X 12-17) μm . (Fig. 3). At the end of the PCR, we amplified 217 bp of ITS-1 of the ribosomal gene, specific for *E.stiedae* (Fig. 4).

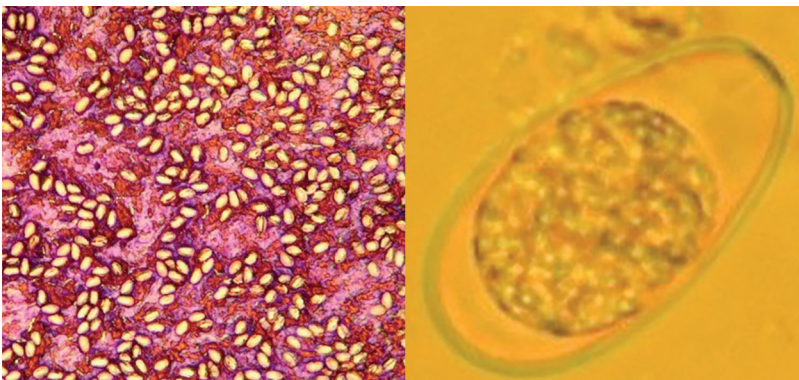


Fig. 2: Impression smear of liver nodules (left) and unsporulated *Eimeria* spp. oocyst from bowels content (right).

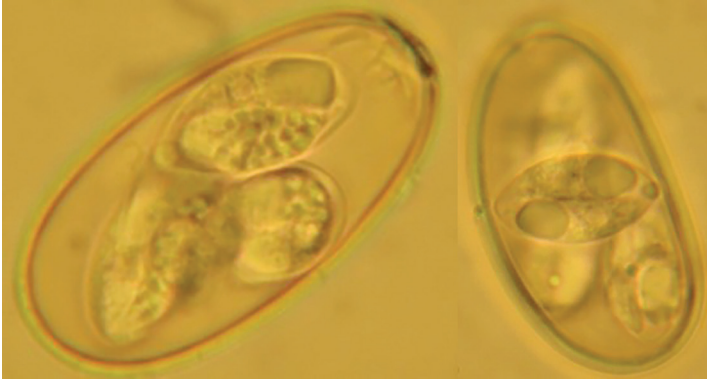


Fig. 3: Sporulated *E.stiedae* oocysts.

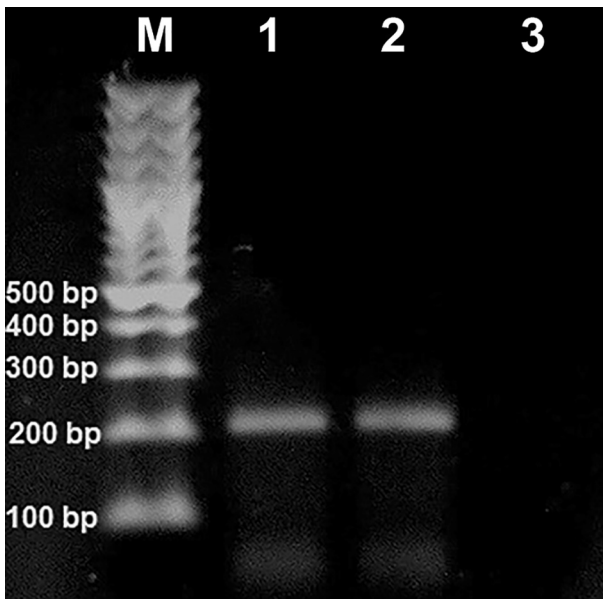


Fig. 4: Amplification products separated by 1.5% agarose gels and stained with ethidium bromide. **M:** Marker, **1:** Template DNA extracted from liver nodules, **2:** Template DNA extracted from bowel content, **3:** Negative control (distilled water).

Discussion

Eleven distinct *Eimeria* species were found in the domestic rabbits. While ten of these species cause intestinal coccidiosis, *E.stiedae* causes hepatic coccidiosis. Agents of intestinal coccidiosis are classified as very pathogenic (*E.intestinalis*, *E.flavescens*), moderately pathogenic (*E.irresidua*, *E.magna*, *E.piriformis*) and slightly pathogenic (*E.media*, *E.exigua*, *E.perforans*, *E.coecicola*). *Eimeria stiedae* can be classified as moderately or very pathogenic [1,13,14]. These species affect the rabbit production and cause reduced growth rate, feed conversion and increased mortality at different

rates [1,13]. Efficiency of some anticoccidial drugs has different effects on different *Eimeria* species in rabbits. According to Polozowski [15], robenidine was very effective against intestinal coccidiosis agents at the dose of 66 ppm, but it had weak effect on *E.stiedae* infections. From this point of view species identification may be important in the epidemiology and treatment of rabbit coccidiosis.

Species identification is based on the size of oocysts and sporocysts, morphological features, prepatent period, and site of colonization [9,10,13]. The sporulation time for *E.stiedae* is approximately 2-3 days [16]. Even though oocyst morphology is useful for the diagnosis of *Eimeria* species, it is time consuming and requires specialist personnel. Especially in mix infections, when the number of oocysts of a certain species is not too many, it is very difficult to diagnose at species level [17]. Disease may spread in the flocks, while researchers waiting the sporulation for the diagnosis. The importance of rapid diagnosis becomes prominent in the early administration of medication for the prevention of the disease.

A few studies were published about rabbit coccidiosis in Turkey [3,4,5,6,7]. Most of these studies were about the prevalence of intestinal coccidiosis [3,5,6,7], one of which was focused on the hepatic coccidiosis [4]. Common feature of these studies is that diagnosis of coccidiosis is based on such conventional techniques as oocyst measurement, morphology and histopathology.

Yan et al. [4], developed a multiplex PCR for the simultaneous detection of *E.stiedae*, *E.intestinalis*, and *E.flavescens*. Oliveira et al. [12], developed 11 species specific PCR primers that discriminate etiological agents of coccidiosis in rabbits.

In this study, we used Esti-ITS1-F and Esti-ITS1-R primer pairs [12] in PCR, addition to oocyst measurement and morphology for the diagnosis of hepatic coccidiosis. According to Oliveira et al. [12], this primer pair was so specific to *E.stiedae*, and no cross-specific bands were observed. They mentioned the detection limit of the PCR as 0.8 sporulated oocyst. With PCR, we got results in one day without waiting oocyst sporulation or histopathology. We concluded that, in case of mix infections and inability to do necropsy, PCR will be very valuable for the rapid and true diagnosis of rabbit coccidiosis.

Acknowledgements

The authors declare that there is no conflict of interests.

References

1. **Bhat TK, Jithendran KP, Kurade NP**, (1996). *Rabbit coccidiosis and its control: A review*. World Rabbit Sci. 4, 37-41.
2. **Ebtesam MM**, (2008). *Hepatic coccidiosis of the domestic rabbit *Oryctolagus cuniculus domesticus* in Saudi Arabia*. World J Zool. 3, 30-35.
3. **Cetindag M, Biyikoglu G**, (1997). *The distribution of *Eimeria* species in domestic rabbits of Ankara region*. Acta Parasitol Turcica. 21, 301-304.
4. **Erdogmus ZS, Eroksuz Y**, (2006). *Hepatic coccidiosis in Angora Rabbits*. J Anim Vet Adv. 5, 462-463.
5. **Merdivenci A**, (1963). *Eimeria (Coccidia) species from domestic and wild rabbits in Turkey*. T Biol Derg. 13, 26-35.
6. **Oncel T, Gulegen E, Senlik B, Bakirci S**, (2011). *Intestinal coccidiosis in Angora Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) caused by *Eimeria intestinalis*, *Eimeria perforans* and *Eimeria coeciola**. YYU Vet Fak Derg. 22, 27-29.
7. **Tasan E, Ozer E**, (1989). *A study on the occurrence of *Eimeria* (Protozoa, Eimeriidae) in hares in the vicinities of Elazig and Tunceli*. Doga Turk Vet Hay Derg. 13, 60-65.
8. **Cakmak A, Vatanserver Z**, (2001). *Coccidiosis'de tanı*. In: S. Dincer (Ed.): *Coccidiosis*. Turkiye Parazitoloji Dernegi Yayinlari, No: 17. Meta Basim, Izmir, Turkey, p.127-132.
9. **Darwish AI, Golemansky V**, (1991). *Coccidian parasites (Coccidia: Eimeriidae) of domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Syria*. Acta Protozool. 31, 209-215.
10. **Hobbs RP**, (1998). *Coccidia (Eimeria spp) of wild rabbits in South Western Australia*. Aust Vet J. 76(3), 209-210.
11. **Karaer Z**, (2001). *Evcil Tavsanlarda (*Oryctolagus cuniculus*) Coccidiosis*. In: S. Dincer (Ed.): *Coccidiosis*. Turkiye Parazitoloji Dernegi Yayinlari, No: 17. Meta Basim, Izmir, Turkey, p. 269-278.
12. **Oliveira UC, Fraga JS, Licois D, Pakandl M, Gruber A**, (2011). *Development of molecular assays for the identification of the *Eimeria* species of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)*. Vet Parasitol. 176, 275-280.
13. **Pankadl M**, (2009). *Coccidia of rabbit: a review*. Folia Parasitol. 56, 153-166.
14. **Yan W, Wang W, Wang T, Suo X, Qian W, Wang S, Fan D**, (2013). *Simultaneous identification of three highly pathogenic *Eimeria* species in rabbits using a multiplex PCR diagnostic assay based on ITS1-5.8SrRNA-ITS2 fragments*. Vet Parasitol. 193, 284-288.
15. **Polozowski A**, (1993) *Coccidiosis of rabbits and its control*. Wiad Parazytol. 39, 13-28.
16. **Taylor MA, Coop RL, Wall RL**, (2007). *Veterinary Parasitology*, Third edition. Blackwell Publishing Company, Cambridge, UK, p. 605-611.
17. **Long PL, Joyner LP**, (1984). *Problems in identification of species of *Eimeria**. J Protozool. 31, 535-541.

Şap Hastalığı

Ömer Barış İNCE¹, Özgür KANAT²

¹ Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu (TKDK), Afyon İl Koordinatörlüğü, Afyon

² Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Hatay

Geliş Tarihi / Received: 21.12.2015, Kabul Tarihi / Accepted: 31.12.2015

Özet: Şap hastalığı, yalnızca çift tırnaklı hayvanları etkileyen bir hastalık olmayıp canlı hayvan ve hayvansal ürünlerin ticaretindeki uluslararası kısıtlamalar nedeniyle ekonomik önemde olan viral hastalıklardan birisidir. Şap virusunun etiyolojisi teşhis ve uygun aşuların üretiminde önemli bir etmendir. Hastalığın endemik olduğu ülkelerde uygun serotipte inaktif aşularla koruyucu aşılama yapılmakta ve hastalığın prevalansının düşürülmesine yönelik önlemler alınmaktadır. Son yıllarda Şap hastalığının dünyada hızlı bir yayılım göstermesi ve çok sıkı tedbirler alan ülkelerde bile görülmesi, hastalığın epidemiyolojisinde her ülkeye özgü risk faktörlerinin belirlenmesinin önemini bir kez daha ortaya çıkarmıştır. Bu derlemede, Şap hastalığı virusunun etiyolojisi, Dünya’da ve Türkiye’de dağılımı, epidemiyolojisi, patogenezi, teşhis ve kontrolüne yönelik güncel bilgiler verildi.

Anahtar kelimeler: Şap hastalığı

Foot and Mouth Disease: A review

Abstract: Foot and mouth disease is not only a disease affecting cloven-hoofed livestock but also one of the economic important viral diseases due to international restrictions on trade of live animals and animal products. The ethiology of Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) is a significant factor in the diagnosis and the production of suitable vaccines. In countries where the disease is endemic, protective vaccinations are performed with inactive vaccines of suitable serotype and measures are taken in order to reduce the prevalence of the disease. Rapid spreading of Food and Mouth Disease and its occurrence even in countries which take strict measures in recent years has once more brought forward the importance of the determination of risk factors which specific to each country in the epidemiology of the disease. In this review, about the distribution in the World and Turkey, epidemiology, pathogenesis, control, ethiology of FMDV was given the topical informations.

Key words: Foot and Mouth disease (FMDV)

Giriş

Şap hastalığı, ruminantları ve domuzları etkileyen, çok bulaşıcı, akut viral bir enfeksiyondur. Hastalığın mortalitesi %2-5 düzeyinde olmakla birlikte genç hayvanlarda akut viral miyokarditise bağlı olarak bu oran %50-60’a ulaşabilmektedir. Hastalıkta morbidite yüksek olup, duyarlı sığır popülasyonlarında %100’e yakındır. Etkilenen hayvanlarda iyileşme dönemi uzun sürmekte ve bu hayvanlar hastalığın daha önce görülmemeyen bölgelere taşınmasında önemli rol oynamaktadır [1,9,23]. Dünyada 19. yüzyılın sonları ile 20. yüzyılın başlarında Şap hastalığına bağlı ciddi kayıplar oluşmuş; Kuzey Amerika, Batı Avrupa ve İngiltere gibi ülkeler, hastalığı endemik ülkelere bulaşık hayvan ve ürünlerinin girişinin sık bir şekilde sınırlandırılmasıyla kontrol etmişlerdir [1,33].

Hastalık ve virus hakkında çok fazla bilgi olmasına rağmen hastalık hala dünyanın büyük bir kısmında etkili olmakta ve en çok yayılan hastalıklardan biri olarak görülmektedir [40].

Dünyada Şap Hastalığı

Şap hastalığı, Afrika, Asya ve Güney Amerika’nın büyük bölümünde endemiktir. Sınıraşan bir hastalık olarak, duyarlı hayvan sayısının (antikor bulundurmayan) yüksek olduğu temiz bölgelerde de salgınlara neden olmaktadır. Bu durum, 2000 yılında Japonya ve Güney Kore, 2001 yılında ise İngiltere ve Avrupa’daki salgınlarda görülmektedir [27]. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütünün haftalık hastalık bilgilerine göre 2010 yılında Japonya ve Güney Kore’de, 2011 yılında ise Bulgaristan’da hastalık tekrar teşhis edilmiştir [35].

Afrika'da, Şap hastalığının yayılmasında; Afrika bufaloları ve impalaların önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Güney Afrika'daki, Kruger Ulusal Parkı'nda, Şap hastalığı yönünden persiste enfekte bufalo oranı %60 olarak tespit edilmiştir [41]. Kuzey Afrika'da; Fas, Cezayir ve Tunus'da uygulanan koruma amaçlı aşılama ile 1999 yılından beri Şap hastalığı bildirilmemiştir [39]. Güney Afrika'da, 2000 yılının sonlarında bir domuz çiftliğinden köken alan, O serotipi salgını ortaya çıkmış ve duyarlı hayvanların ring aşılama yöntemi ile aşılama kontrol altına alınmıştır [41]. Zimbabve, Namibya, Botswana ve Güney Afrika Cumhuriyeti hariç, geri kalan Afrika ülkelerinin çoğunda Şap hastalığı endemik olarak seyretmektedir [23].

Asya'nın birçok ülkesinde (Kamboçya, Laos, Malezya, Filipinler, Tayland ve Vietnam) Şap hastalığı endemik olarak görülmektedir [39]. Hastalığın 1929 yılından beri görülmediği Tayvan'da, 1997 yılında ortaya çıkmıştır. Çin'in bazı bölgelerinde ve Tayland'da 1999 yılında Şap virusunun O serotipinin farklı bir türü (pan-Asya tip O) tespit edilmiştir. 1908'den beri hastalık görülmeyen Japonya'da ve 1934'den beri hastalık görülmeyen Kore'de ise, 2000 yılında pan-Asya tip O serotipi belirlenmiştir [31]. Dünya Şap Hastalığı Referans Laboratuvarı'nda virusun O serotipi, pozitif klinik örneklerden en yaygın tespit edilen tiptir [14].

Türkiye'de Durum

Türkiye'de Şap hastalığı ile ilgili ilk istatistiksel bilgiler, 1914 yılında yayınlanmıştır. 1914 yılından beri değişik tarihlerde Şap virusunun; A, O, C, SAT-1 ve Asia-1 serotipleri izole ve identifiye edilmiştir. 1963 yılında SAT-1 serotipi saptanmışken, 1973 yılında ilk defa Asia-1 serotipi tespit edilmiştir. 1984-1999 yılları arasında sadece doğu illerinde sınırlı sürelerde dolaşımında kalmış ve 2002 yılından 2006 yılına kadar görülmemiştir. A ve O serotipleri ise 1952 yılından beri endemik olarak gözlenmektedir [2,44].

Ülkemizde halen seyretmekte olan A serotipi, ilk olarak 2005 yılı Ağustos ayında tespit edilen A/IRN/2005 suşudur. Bu suş özellikle 2006 ilkbaharında büyük problemlere sebep olmuştur [26]. Ülkemizde halen seyretmekte olan O serotipi suşu ise, 2006 yılından beri ülkemizde sığır, koyun ve keçilerde görülmekte olan ve 2007 yılı Şubat, Nisan ve

Eylül aylarında Trakya'ya kadar ulaşan O serotip PanAsia-2 alt tipinin pandemik bir suşudur [29].

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından, 2008 yılında Avrupa Birliği destekli ve üç yıl süreli "Türkiye'de Şap Hastalığı'nın Kontrolü Projesi" başlatılmıştır. Bu proje kapsamında; Türkiye genelinde sığır varlığının yılda iki kez, koyun varlığının ise yılda bir kez olmak üzere üç yıl süre ile yoğun aşılanması, hastalığın surveyansının yapılması ile hastalık takibi ve dezenfeksiyonu planlanmıştır. Büyük ruminantların Trakya'da ve Anadolu'da sınır illerinde (Ağrı, Ardahan, Artvin, Gaziantep, Hakkâri, Hatay, Iğdır, Kars, Kilis, Mardin, Şanlıurfa, Şırnak, Van) trivalan, diğer illerde ise bivalan Şap aşısı ile aşılanması kararlaştırılmıştır. Tüm bölgelerde hastalık çıkması durumunda sıkı karantina yöntemleri ile bu bölgelerden canlı hayvan ve risk taşıyan ürünlerin çıkışına izin verilmemiş, ülkemizin Trakya Bölgesi'nde hasta ve hastalıktan şüpheli hayvanlara kesim metodu uygulanmıştır [43].

Trakya'da 2007 yılı Kasım ayından bu yana Şap hastalığı görülmediği için Trakya kesiminin "Aşılı Arılık" statüsü için Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü'ne (Office International des Epizooties/World Organization for Animal Health, OIE) başvuru yapılmıştır. Başvuru, 24-28 Mayıs 2010 tarihleri arasında Fransa'da düzenlenen OIE Genel Kurulu'nda değerlendirilerek, Trakya "Şap Hastalığından Aşılı Arılık" statüsü kazanmıştır [42].

2015 yılı Eylül ayında sığır dil epiteli örneklerinde A serotipinin alt tipi olarak nitelendirilen genotip 7 (medyada Nepal-84 adıyla yer alan) suşunun tespit edildiği bildirilmiştir [45].

Etiyoloji

Şap hastalığı etkeni, Picornaviridae ailesinin Aphtovirus alt grubu (genusu) içinde sınıflandırılır. Virusun, 7 serotipi (A, O, Asia, C, SAT1, SAT2, SAT3) ve 67' den fazla alt tipi vardır [6,22,44].

Şap virusu diğer Picornaviruslar gibi zarsız ve ikosaedral yapıdadır. Yaklaşık 40 nm çapındaki kapsid, 42 kapsomerden oluşmuştur [8]. Şap virüsü, hücrelere reseptör-aracılı endositozun bir mekanizması ile girer [16]. Şap virüsünün temel yapısal proteinleri (VP1, VP2, VP3, VP4), Picornaviridae ailesinde yer alan diğer viruslarındaki karşılıklarından daha küçüktür [19].

Virus genomu, yapısal ve yapısal olmayan proteinlerin oluşturduğu tek bir polipeptit yapısındadır. Bu proteinlerden 4 tanesi, Şap virusunun kapsitini oluşturan yapısal proteinler, 8 tanesi (L, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C ve 3D) ise yapısal olmayan proteinlerdir [5,16].

Şap virusu, pH 7-9 arasında stabil olmakla birlikte en dayanıklı olduğu pH değerleri 7.2 ile 7.6 arasındadır. Bunun dışındaki pH değerlerinde ve 50°C'nin üzerinde süratle inaktive olur. Asit (asetik, formik, sitrik, sülfürik asitler) ve alkali (sodyum karbonat, sodyum hidroksit) pH değerlerindeki çeşitli kimyasal maddeler Şap virusunu inaktive ederler. Saha şartlarında, Şap virusunun inaktivasyonu için %4'lük sodyum karbonat ve %1'lik sodyum hidroksit kullanılabilir [1,36].

Etken, in vivo olarak sığır dilinde, süt emen yavru farelerde, hamsterlerde, kobay ayak tabanlarında ve in vitro olarak dana böbrek, dana tiroid, dana testis, domuz böbrek, kuzu böbrek primer ve BHK 21, IBRS-2, MVPK- 1 HmLu devamlı hücre kültürlerinde üretilmektedir [18].

Şap hastalığının moleküler epidemiyolojisi, 1987'den beri, virus izolatları arasındaki genetik uzaklığın karşılaştırılması temeline dayanmaktadır. Serotip A'nın, Avrupa ve Asya serotipleri içerisinde antijenik olarak en değişken serotip olduğu düşünülmektedir. Şap viruslarının genetik farklılığını belirlemek amacıyla genetik haritalarının çıkarılmasında antijenik anlamda değişkenlik gösteren genomun VP1 bölgesi kullanılmaktadır [28].

Epidemiyoloji

Hastalığın doğal epidemiyolojisinde sığır, domuz, koyun ve keçi, özellikle Asya ve Güney Amerika'da mandalar, Afrika'da Afrika bufaloları ve impalalar büyük öneme sahiptirler [2].

Şap hastalığı direkt ve indirekt olarak yayılmaktadır. Şap hastalığından etkilenen hayvanlar, solunum, deri, sekret ve ekstrekleri ile virus saçarlar. Hasta veya inkubasyon periyodundaki hayvanlar dokularında, süt, sperma veya ovumlarında virusu bulundururlar. Sperma, boğalarda klinik belirti ortaya çıkmadan da enfektiftir ve suni tohumlama ile virüs yayılabilir. Süt bezleri önemli bir virüs çoğalma bölgesi olup, klinik belirtiler ortaya çıkmadan önce sütte virüs bulunur. Klinik belirti gösteren hayvan-

lar enfeksiyonun ana kaynağı olarak kabul edilir. Bu hayvanlar klinik belirtiler ortaya çıkmadan 4-7 gün önce virüs saçmaya başlar ve genellikle enfeksiyonu izleyen iki hafta içerisinde organ ve dokulardan virüs temizlenir [9].

Şap virusunun özellikle serotip ya da topotip düzeyinde konakçı spesifitesi hakkında yeterli bilgiler olmamasına rağmen, konakçı spesifitesinin, Şap virusunun yayılımı ve persistensini anlamada en önemli epidemiyolojik faktör olduğu belirtilmektedir. İnkübasyon periyodu, hastalık sırasında dışarı saçılan virüs partikül miktarı, virüsün hava yolu ile yayılma özelliği, virüsün dışkı ve karkasta canlılığını sürdürebilmesi, taşıyıcılık özelliği ve duyarlı konakçı türünün fazlalığı gibi faktörler, hastalığın epidemiyolojisini belirlemektedir. Şap virusunun sahip olduğu yüksek mutasyon hızı ve populasyon yapısı onun hızlı evrimini bir ölçüde açıklayabilmektedir. Ayrıca virüsün genomunda oluşan minor yapısal değişikliklerin konakçı özgüllüğünde değişime yol açtığı bilinmektedir. Ancak konakçı özgüllüğü, Türkiye'de Asia-1 serotipinin epidemileri sonrasında neden dolaşımda kalmadığını (persistensi) ya da A serotipinin O serotipine göre daha kısa süre dolaşımda kalabildiğini tam olarak açıklayamamasına rağmen, topotipin sahip olduğu virulens ve konakçı aralığına bağlı olarak dolaşımda kaldığı düşünülmektedir [7,11].

Şap hastalığı mihraklarının yaklaşık %95'inde bulaşma direk temasla olur [23]. Ancak hastalığın önemli yayılma yolları hayvan hareketleri ve kontamine hayvan ürünleridir. Veziküllerin oluşmasından önce enfekte hayvanlardan virüs saçılımı epidemiyolojik yönden önemlidir. Bu süre, sığır ve koyunlarda 5 gün, domuzlarda 10 güne kadar uzayabilir. Hastalık ayrıca, enfekte hayvanların dışkıları, araçlar, insanlar ve daha birçok cansız vektörle yayılabilir. Virüsün özellikle deniz üzerinde, rüzgârla 100 km'ye kadar taşınabileceği ileri sürülmüştür [17].

Hayvanların temas yolu ile Şap virusuna maruz kalmasından sonra subklinik bir enfeksiyon oluşabilir. Enfeksiyondan sonra 4 hafta içerisinde farinkste virüs çoğalması gerçekleşir ve virüs saçılır, ancak klinik belirti görülmez [3,15]. Taşıyıcı hayvanlarda Şap virusu yumuşak damağın dorsalinde stratum germinativumda, farinkste ve tonsillerde persiste kalır, çoğalır ve taşıyıcılık süresince devamlı olarak düşük düzeyde saçılır [23].

Klinik Belirtiler ve Patogenez

Hayvanlar prodromal ve enfeksiyonun klinik olarak seyrettiği dönemlerde yüksek titreli virus taşıyarak, salya ile virüsü saçmaktadır. Virusun respiratorik bölge duvarından girişi ve primer enfeksiyon oluşumu inhalasyon yolu ile alınan virus miktarına bağlıdır. Yumuşak damağın dorsal yüzü, üst solunum yolları ve nazofarinksten giren virüs replike olarak [3,6], lenfatik sistem ve kan dolaşımına geçer. Virus viremi ile başta sindirim sisteminin üst kısmı olmak üzere değişik organ ve dokulara yayılarak çoğalır. Meme bezleri, deri, tükrük bezleri, tiroid, adrenal bezler ve kas dokuları, özellikle kalp kası başlıca virus çoğalma bölgeleridir [13].

Hastalığı atlatan hayvanlarda yüksek düzeyde antikör olmasına rağmen, virus farengiyal bölgede barınarak persiste enfeksiyona yol açabilir [46].

Şap hastalığı, virusun dozuna, suşuna, giriş yerine bağlı olarak klinik veya subklinik belirtiler gösterir. Hastalığın inkubasyon süresi virus dozuna bağlı olup [12], 2-15 gün arasındadır [46].

Sığırlarda hastalık yüksek ateş ve iştahsızlık ile başlar, ayrıca depresyon ve süt veriminde azalma görülür. Ateş iki gün içinde normale döner. İkinci ve üçüncü günlerde virüs, ağız boşluğu özellikle dil, meme derisi ve interdigital dokulara yerleşerek burada 0,5-10 cm çapındaki veziküllerin oluşumuna neden olur. Bu bölgelerde virusun damarlara etkisiyle interstisyel dokuya seröz bir eksudat sızar. Bu eksudat epitel tabakaya geçerek str. spinozum hücrelerinin tonofibrillerini ayırır (spongiosis) ve spinozum hücreleri şişer. Bu hücrelerin sitoplazmaları eozinofilik bir hal alır ve hücrelerin akantolizisi sonucu mikroskopik veziküller, bunların birleşmesi ile de gözle görülebilen veziküller oluşur. Bu aşamada ağızdan ip tarzında uzayarak akan salya başlar [6,13,20]. Bu veziküllere dilde, dilin özellikle dorsal ve dorsolateralinde, yanak ve dudakların iç kısımlarında, sert damakta, diş etlerinde, burun, merme ve burun delikleri çevresinde, memede, tırnak bölgesinin korium koronaryumunda ve ön midelerde rastlanır [2,20]. Vezikülerden başka rumen ve abomazumda peteşiyel kanama ve ülserler, bağırsaklarda peteşiler, akciğer ve karaciğerde ödem, dalakta büyüme, epikartta kanama ve hidroperikardiyum da gözlenebilir [6].

Kısa sürede sindirim hareketleri ile veziküller patlar ve yerlerinde erozyonlar kalır. Erozyonların üzerini 24 saat içerisinde gri-beyaz kataral-irinli bir eksudat örter ve sekonder bakteriyel bir enfeksiyon şekillenmezse 5 günde iyileşebilirler. Erozyonların yerlerinde 6 ay kadar gözlenebilen lökoplaklar oluşur. Ağız mukozasındaki lezyonların benzerine rumenin pila ruminislerinde de belirgin olarak rastlanır [6, 20].

Genç hayvanlarda özellikle daha önce hastalığın gözlenmediği bölgelerde vezikül oluşmadan akut miyokarditis oluşabilir. Bazen vezikülasyon ve miyokarditis birlikte gözlenebilir. Miyokarditise ilişkin lezyonlar, ventriküler kaslarda, özellikle Musculus papillaris'lerde, etrafı hiperemik bir çizgi ile çevrili soluk alanlar şeklinde oluşabilir. Kalpteki lezyonların bu görünüşü genel olarak kaplan postu manzarası olarak tanımlanır. Kalp kasında mikroskopik olarak hiyalin dejenerasyonu ve nekroz ile birlikte özellikle lenfosit ve histiyositlerden oluşan mononükleer hücre infiltrasyonu görülür [2,6,20].

Koyunlarda belirtiler sığırlardakine benzemektedir, fakat daha hafif seyreder ve bazen varlığı bile anlaşılabilir. Lezyonlar özellikle diş dipleri ile dilin arka ve dorsal bölgesinde olup, genellikle vezikül oluşmadan eroziv-ülseratif bir hal alır. Ağızdaki lezyonlar küçük ve çabuk kaybolan niteliktedir. Çoğu zaman ayaklar daha duyarlıdır, topallık klinik belirtilerin başında gelir [6,20,24].

Domuzlarda ise lezyonlar özellikle ayaklarda oluşur ve ilk klinik belirti topallıktır. İnkubasyon süresi sığırlara göre daha uzundur. Domuz yavrularında akut miyokarditis ve buna bağlı ölümler görülür [6,13,20].

Teşhis

OIE tarafından dört virolojik teşhis metodu tanımlanmıştır. Bu metodlar; virus izolasyonu, antijen ELISA, komplement fikzasyon testi ve nükleik asit tanımlama metodlarıdır [5]. Spesifik antikör yanıtlarının belirlenmesi ile Şap hastalığının teşhisinde OIE tarafından tanımlanan serolojik metodlar kullanılmaktadır [38]. Şap virusunun tip tayininin; Hastalığın teşhisi dışında epizootoloji ve aşılama açısından da çok büyük önemi vardır. Bu açıdan klinik olarak hastalığın teşhisi yapılırsa bile kesinlikle tip tayini için laboratuara numune gönderilmelidir. Ayrıca, gelen serumlarda antikör prevalansı araştır-

rılarak hastalığın teşhisi ve antikör seviyeleri tespit edilmelidir. Belirlenen antikör düzeyleri ışığında aşılama stratejisi belirlenmelidir [34].

Tanı amacı ile hasta hayvanların açılmamış veya yeni açılmış veziküllerin sıvısı, epitel dokusu, O/P (özofagofarengiyal) sıvısı, kan veya süt, ölen hayvanların ise kalp kası, kan veya diğer organları kullanılabilirse de en uygun materyal epitel dokusudur [33].

Şap hastalığının tanısı ve saha suşlarının tiplendirilmesinde komplement fikzasyon, hemaglutinasyon inhibisyon, koaglutinasyon, mikronötralizasyon gibi testler kullanılabilir. Şap virusunun tespitinde, referenz standart metot olarak kabul edilen virus izolasyonu oldukça duyarlı bir metot olsa da, fazla iş gücü gerektirmesi, pahalı olması, örnek kontaminasyonu gibi bir takım olumsuzluklar nedeniyle çok pratik olmamaktadır. Ayrıca, canlı virus ile çalışılması dolayısıyla çevrenin kontaminasyon riski testin en önemli olumsuz yanı olarak bildirilmektedir [25].

Şap virusunun yapısal olmayan virus proteinerine karşı oluşan antikörlerin tespit edilmesini tanımlamak amacıyla NSP ELISA kitleri hazırlanmıştır. NSP ELISA'lar, özellikle epidemiyolojik amaçlı araştırmalarda, hastalık geçirmiş hayvanları aşılanmış hayvanlardan ayırt etmede ve sahadaki taşıyıcılık durumunun tespitine yönelik olarak eradikasyon ve kontrol çalışmalarında kullanılmaktadır [4,34]. NSP antikör testlerinde, Şap virusunun farklı 7 serotipinin antijenlerine ihtiyaç duyulmamaktadır. Testler sadece enfeksiyon için spesifiktir [37].

Son yıllarda yüksek spesifite ve duyarlılığa sahip serotip spesifik PCR teknikleri ve duyarlılığı yükseltmiş RT-PCR ELISA tekniği geliştirilmiştir. Viral antijenler ELISA ve RT-PCR ile belirlenmektedir [1].

Ayırıcı Tanı

Gerek klinik muayenede gerekse laboratuarda, gönderilen numunede Şap hastalığı tespit edilemediği durumlarda, Şap hastalığı ile karışan hastalıklar göz önünde bulundurulmalıdır. Mukozal lezyonlar, ayak lezyonları, salivasyon ve burun akıntısı gibi lezyonların görüldüğü vakalarda ayırıcı tanı kriterleri gözden geçirilmelidir. Hastalık; Bovine viral diyare-mukozal hastalık, sığır vebası, mavi dil, ma-

lignant kataral fever ve papuler stomatitis ile meme lezyonları yönünden de çiçek ve herpestik mamillitise karışabilir [9,21].

Kontrol ve Mücadele

Şap hastalığının kontrolünde; enfekte ve taşıyıcı hayvanların kesimi ile Şap virusuna duyarlı hayvanların düzenli aşılanmasını kapsayan iki temel strateji vardır [11]. Bulaşma kaynakları çok fazla olduğundan hastalıktan korunma çok kolay olmamaktadır [32].

Şap hastalığı ile mücadelede geçerli olan kurallar OIE'nin "Hayvan Sağlığı Kodu"nda belirtilmiştir. Bu kurallara göre ülkenin bir bölgesi, ülke geneli veya birkaç bölge birlikte değerlendirilebilir. Hastalık mücadelesinde uygulanan stratejiye göre bölgeler; aşılamanın olmadığı hastalıktan temiz bölge, gözetim altındaki bölge, aşılama ile hastalıktan arındırılmış bölge, tampon bölge ve enfekte bölge şeklinde tanımlanmaktadır.

Şap hastalığının kontrolü, ülkenin hastalık kontrol politikaları ve epidemiyolojik durumuna bağlıdır. Hastalığın görülmediği ülkelerde kontrol, hastalığın var olduğu ülkelere hayvan ve hayvansal ürünlere uygulanan sıkı sınırlamalar ile hastalığın ülkeye girişinin önlenmesine yöneliktir. Bu ülkelerde karantina ve salgın görülmesi durumunda zorunlu kesim uygulanır. Hastalığın endemik olduğu ülkelerde ise uygun serotipte inaktif aşılarla yapılan koruyucu aşılama ve sağlık uygulamaları kombine edilerek hastalığın insidensinin düşürülmesine yönelik önlemler alınmaktadır [10]. Aşılanma ile oluşan koruyucu bağışıklık, doğal enfeksiyon nedeniyle oluşan bağışıklıktan daha kısa sürelidir. Bu nedenle yılda iki veya daha fazla aşılama ihtiyacı vardır [41].

Kontrol programlarında kullanılacak ve aşı antijen rezervlerinde saklanacak aşı suşlarının seçimi, salgınlardan toplanan saha izolatlarının uygun aşı suşları ile uyumlu olması temeline dayanır [30].

Sonuç

Şap hastalığı dünyanın birçok bölgesinde endemiktir ve canlı hayvan/hayvan ürünlerinin uluslararası ticaretinde her zaman önemli ölçüde sınırlamaya neden olmaktadır. Dünya Ticaret Örgütü'nün birçok sınırlamayı kaldırması ile Şap hastalığı daha da

büyük bir önem kazanmıştır. Hastalığın yayılmasını önlemek için yapılan yasal düzenlemelerin denetiminin sıkı tutulması, hayvancılık endüstrisinin uyumunu zorlaştırarak yasal olmayan ticarete ivme kazandırmış ve bu da hastalığın yayılmasını arttırıcı bir etki yapmıştır.

Şap hastalığının kontrolü; etkili ve iyi desteklenmiş bir devlet veteriner servisine bağımlıdır. Ancak, Şap hastalığı kontrolünün sağlayacağı ekonomik faydanın bilincinde ve iyi eğitilmiş bir yetiştirici toplumu olmadan bunu gerçekleştirmek imkânsızdır.

Son yıllarda, Şap hastalığının dünyada hızlı bir yayılım göstermesi ve çok sıkı tedbirler alan ülkelerde bile görülmesi, hastalıkta alınan önlemlerin yeniden gözden geçirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Şap hastalığının kontrolü, ülkenin hastalık kontrol politikaları ve epidemiyolojik durumuna bağlıdır. Hastalıktan temiz ülkelerde kontrol, hastalığın var olduğu ülkelerden yapılan hayvan ve hayvansal ürünlere uygulanan sınırlamalar ile hastalığın ülkeye girişinin önlenmesine yöneliktir [41]. Bu ülkelerde bir salgının görülmesi durumunda, zorunlu kesim ya da karantina ve enfekte bölgesinin çevresinde aşılama uygulanır. Hastalığın endemik olduğu ülkelerde ise uygun serotipte inaktif aşılarla yapılan koruyucu aşılama ile sağlık uygulamaları kombine edilerek hastalığın insidensinin düşürülmesine yönelik önlemler alınmaktadır. Aşılama hastalığın kontrolünde önemli bir araç olmasına rağmen, aşılamanın başarısına birçok faktör etki eder ve bu yüzden tek başına hastalığın kontrolünde başarılı olması beklenemez. Aşılama ile birlikte mutlaka hayvan hareketlerinin de kontrol edilmesi ve sınırlandırılması (karantina) gerekmektedir.

Kaynaklar

1. **Aftosa F, (2014).** *Foot and Mouth Disease. The center for Food Security&Public Health.*Erişim:http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/foot_and_mouth_disease.pdf Erişim Tarihi:05.12.2015
2. **Alexandersen S, Mowat N, (2005).** *The structure of foot-and-mouth disease virus. Current Topics in Microbiology and Immunology (Foot-and-Mouth Disease Virus).* Mahy B.W.J (ed.), Springer, New York, 9-33.
3. **Alexandersen S, Oleksiewicz MB, Donaldson AI, (2001).** *The early pathogenesis of foot-and-mouth disease in pigs infected by contact: a quantitative time-course study using TaqMan RT-PCR.* J Gen Virol, 82, 747-755.
4. **Clavijo A, Zhou E-M, Hole K, Galic B, Kitching P, (2004).** *Development and use of a biotinylated 3ABC recombinant protein in a solid-phase competitive ELISA for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus.* J of Virological Methods, 120, 217-227.
5. **Clercq K, Goris N, Barnett PV, MacKay DK, (2008).** *The importance of quality assurance/quality control of diagnostics to increase the confidence in global foot and mouth disease control.* Transboundary and Emerging Diseases, 55, 35-45.
6. **Çiftçi MK, Ortatatlı M, Erer H, Hatipoğlu F, Özdemir Ö, (2015).** *Şap Hastalığı. Veteriner Sistemik Patoloji 1.cilt (Sindirim-Solunum), 1. Baskı,* Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 5-8.
7. **Davies G, (2002).** *Foot and mouth disease.* Research in Vet Sci, 73, 195-199.
8. **Danes M, Gruia M, Borca M, (1995).** *FMD Primary Diagnosis. Comparative data on the use of sandwich ELISA, complement fixation and cell culture isolation.* The Journal of the Pasteur Institute Romania Studies and Research in Veterinary Medicine, 28-32.
9. **Dinter Z, Morein B, (1990).** *Virus Infections of Ruminants.* Elsevier Science Publishers BV. 506-508.
10. **Doel TR, (2003).** *FMD vaccines.* Virus Res, 91, 81-99.
11. **Domingo E, Escarmis C, Baranowski E, Ruiz-Jarobo C, Carrillo E, Nunez JI, Sobrino F, (2003).** *Evolution of foot-and-Mouth Disease Virus.* Virus Res, 91, 47-63.
12. **Donaldson A, (1987).** *Foot and mouth disease: The principal features.* Irish Vet J, 41, 325-327.
13. **Fenner F, Bachmann A, Gibbs J, Murphy A, Studdert J, White O, (1987).** *Veterinary Virology,* Academic Press Inc, London.
14. **Ferris NP, Donaldson AI, (1992).** *The World Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease: a review of thirty-three years of activity (1958-1991).* Rev Sci Tech, 11, 657-684.
15. **Fondevila N, Sanchez A, Smitsaart E, Schudel AA, (1996).** *Studies of the persistence of FMD virus in bovines, ovines and llamas.* Rep. of the Sess.of Res. Gr. Of the Stand. Tech. Comm. Eur. Comm. For the Cont. of FMD, Israel.
16. **Fry EE, Stuart DI, Rowlands DJ, (2005).** *The structure of foot-and-mouth disease virus. Current Topics in Microbiology and Immunology (Foot-and-Mouth Disease Virus).* Mahy B.W.J (ed.), Springer, New York, 72-94.
17. **Gürhan Sİ, (1989).** *Şap hastalığının epidemiyolojisi.* Vet Hek Derg, 99-106.
18. **Gürhan Sİ, (1993).** *Türkiye de izole edilen A ve O tipi şap virusu suşlarının antijenik varyasyonlarının SDS-PAGE ile incelenmesi.* Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
19. **Jackson T, King AMQ, Stuart DI, Fry E, (2003).** *Structure and receptor binding.* Virus Research, 91, 33-46.
20. **Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, (2006).** *Foot and mouth disease.* In " *Pathology of Domestic Animals* ", 5 th ed., Academic Press Inc. Ltd. London, 135-137.

21. Kalaycı G, (1999). *Batı anadolu tampon bölgesinden izole edilen şap viruslarının elisa ve komplement fikzasyon testlerine alternatif olarak koaglutinasyon test ile serotiplendirilmesi ve persiste enfekte hayvanların saptanması*. Doktora Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
22. King AM, King AMQ, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypiä T, Knowles NJ, Lemon SM, Minor PD, Palmenberg AC, Skern T, Stanway G, (2000). *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*". Picornaviridae. New-York, San Diego, R.B. Academic Press. 657-673.
23. Kitching P, (1998). *A recent history of foot and mouth disease*. J Comp Path, 118, 89-108.
24. Kitching RP, (2002). *Identification of foot-and-mouth disease virus carrier and subclinically infected animals and differentiation from vaccinated animals*. Rev Sci Tech Off Int Epiz, 21, 531-538.
25. Kitching RP, Hammond J, Jeggo M, Charleston B, Paton D, Rodriguez L, Hecker R, (2007). *Global FMD control-Is it an option? Vaccine*, 26, 5660-5664.
26. Klein J, Hussain M, Ahmad M, Normann P, Afzal M, Alexandersen S, (2007). *Genetic characterisation of the recent foot-and-mouth disease virus subtype A/IRN/2005*. Virology Journal, 4, 122.
27. Knowles NJ, Samuel AR, Davies PR, Kitching RP, Donaldson AI, (2001). *Outbreak of foot-and-mouth disease virus serotype O in the UK caused by a pandemic strain*. Vet Rec, 148, 258-259.
28. Knowles NJ, Samuel AR, (2003). *Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus*. Virus Res, 91, 65-80.
29. Knowles NJ, Nazem Shirazi MH, Wadsworth J, Swabey KG, Stirling JM, Statham RJ, Y Li, Hutchings GH, Ferris NP, Parlak U, Ozyörük F, Sumption KJ, King DP, Paton DJ, (2009). *Recent spread of a new strain (A-Iran-05) of foot-and-mouth disease virus type a in the middle east*. Transboundary and emerging diseases, 56, 157-169.
30. Lombard MF, Fussel AE, (2007). *Antigen and vaccine banks: technical requirements and the role of the European antigen bank in emergency foot and mouth disease vaccination*. Rev Sci Tech Off Int Epiz, 26(1), 117-134.
31. Mahy BWJ, (2005). *Introduction and history of foot-and-mouth disease virus*. Curr. Top. Microbiol Immunol, 288, 1-8.
32. Mort M, Baxter J, Bailey C, Convery I, (2008). *Animal disease and human trauma: the physiological implications of the 2001 UK FMD disaster*. J. Appl. Anim. Welf. Sci, 11(2), 133-148.
33. OIE (Office International des Epizooties/World Organization for Animal Health) 2000. *Foot and Mouth Disease*. Erişim: www.oie.int Erişim tarihi: 12.06.2005
34. OIE (Office International des Epizooties/World Organization for Animal Health) 2004. *Foot and Mouth Disease*, In: *OIE Standards Commission, Ed: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Erişim: www.oie.int Erişim tarihi: 06.09.2009
35. OIE (2010-2011). *Hayvan sağlığı bilgileri, haftalık hastalık bilgisi-WAHID Interface*. Erişim: [\[http://www.oie.int/wahis/public.php?page=weekly_report_index\]](http://www.oie.int/wahis/public.php?page=weekly_report_index). Erişim Tarihi: 11.05.2011
36. Olechnowitz AF, Engler E, (1970). *pH inactivation of the foot-and-mouth disease virus*. Arch Exp Veterinarmed, 24, 461-471.
37. Parida S, Fleming L, Gibson D, Hamblin PA, Grazioli S, Brocchi E, Paton DJ, (2007). *Bovine serum panel for evaluating foot-and-mouth disease virus nonstructural protein antibody tests*. J Vet Diagn Invest, 19, 539-544.
38. Re'mond M, Kaiser C, Lebreton F, (2002). *Diagnosis and screening of foot and mouth disease*. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, 25, 309-32.
39. Rweyemamu MM, Roeder P, Mackays D, Sumption K, Brownlie J, Leforban Y, Valarcher J F, Knowles NJ, Saraiva V, (2008). *Epidemiological patterns of foot-and-mouth disease worldwide*. Transboundary and Emerging Diseases. 55(1), 57-72.
40. Sorbino FM, Saiz M, Jimenez-Clavero M, Nunez JI, Rosas M, Baranowski E, Ley V, (2001). *Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat*. Vet Res, 32(1), 1-30.
41. Suttmoller P, Barteling SS, Olascoaga RC, Sumption KJ, (2003). *Control and eradication of foot-and-mouth disease*. Virus Res, 91, 101-144.
42. Şap Enstitüsü Müdürlüğü (2010). *Şap hastalığı*. Erişim: [\[http://www.sap.gov.tr/sap_hastaligi.htm\]](http://www.sap.gov.tr/sap_hastaligi.htm). Erişim tarihi: 06.08.2010
43. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü (2009). *Şap hastalığı*. Hayvan Hastalık ve Zararlıları ile Mücadele Programı Kitapçığı, 16-21.
44. Tufan M, (2006). *Animal health authorities and transboundary animal diseases in Turkey*. J Vet Med, 53, 35-37.
45. Van İl Gıda Tarım Hayvancılık Müdürlüğü (2015). *Şap bilgilendirme toplantısı*. Erişim: <http://van.tarim.gov.tr/Haber/110/sap-bilgilendirme-toplantisi> Erişim tarihi: 15.12.2015
46. Woodbury L, (1995). *A review of possible mechanisms for the persistence of foot and mouth disease virus*. Epidemial Infect, 114, 1-13.

Gıda Endüstrisinde Nanoteknoloji Uygulamaları

Erdem SAKA¹, Göknur TERZİ GÜLEL²

¹ İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü Hay. Sağ. ve Yet Şb. Müd. Samsun-Türkiye

² Ondokuzmayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Samsun-Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 13.11.2015, Kabul Tarihi / Accepted: 15.12.2015

Özet: Nanoteknoloji, nanometre ölçeğindeki materyal, sistem ve cihazların geliştirilmesi ile ilgilenen bilim ve teknoloji alanıdır. Nanoteknoloji tıp, tekstil kozmetik, elektronik, ilaç, ziraat ve gıda sanayi gibi birçok sektörlerde uygulama alanı bulmuştur. Son yıllarda gıda nanoteknolojisi alanındaki gelişmeler, yenilikçi ve daha sağlıklı gıdaların geliştirilmesine olanaklar sağlamaktadır. Gıda nanoteknolojisi, gıda endüstrisi sektöründe özellikle gıda işleme, muhafaza, ambalajlama, nano katkı maddeleri ve nanosensörlerinin geliştirilmesi gibi birçok alanda araştırma alanlarını kapsamaktadır.

Anahtar kelimeler: Nanoteknoloji, gıda endüstrisi, biyoaktif maddeler, nanosistemler

Nanotechnology Applications In The Food Industry

Abstract: Nanotechnology, a science and technology branch concerning with developing of material, is a system and devices in nanometer scale. Nanotechnology has found field of application in so many sectors like medicine, textile, cosmetics, electronics, medication, agriculture and food industry. In recent years, improvements on field of food technology provide opportunity for further development of innovative and healthier food. Food nanotechnology covers research fields in so many fields like especially development of food processing, preservation, packaging, nano additive agents and nanosensors in sector of food industry.

Key words: Nanotechnology, food industry, bioactive substances, nanosystems

Giriş

Nanoteknoloji günümüzde tekstil, elektronik ve ilaç sanayinden gıda ve ziraat alanına kadar birçok alanda önemli araştırma ve uygulama alanı bulmuştur. Son yıllarda tüketiciler yüksek kalitede, doğal, taze, mikrobiyolojik açıdan güvenli, koruyucu ve katkı maddesi içermeyen, raf ömrü uzun gıdaları tüketmek istemektedirler. Bu nedenle gıdaların daha uzun ömürlü ve kaliteli olmasını sağlamak amacıyla günümüzde nanoteknoloji alanındaki çalışmalara ağırlık verilmiştir [36, 37].

Nanoteknoloji uygulamaları kullanılarak üretilen nanoparçacıklar ile gıda maddelerine tekstür ve aroma gibi istenilen özelliklerin kazandırılması sağlanabilmektedir. Özellikle antimikrobiyal paketleme, biyobozunur malzemeler ve yenilebilir filmler ile gıdaların güvenilirliği ve raf ömrü güvence altına alınmaktadır. Akıllı ambalajlar ve nanosensörler ile gıdalardaki bozulma belirtileri önceden tespit edilebilmektedir [36,37].

Bu derlemede nanoteknolojinin gıda endüstrisinde kullanım alanları gıdaların işlenmesi ve fonksiyonel ürünlerin geliştirilmesi amacıyla kullanılan nanoemülsiyonlar, biyoaktif maddelerin taşınması ve kontrollü salınımını sağlayan nanokapsüller, patojenlerin tespiti ve gıda güvenliğinin artırılması amacıyla kullanılan nanosensörler ve yeni paketleme sistemlerinin geliştirilmesi başlıkları altında ele alınmıştır.

Nanoteknolojinin Tanımı

“Nano” kelimesi Yunanca ve Latince kökenli bir sözcük olup, cüce, bodur anlamına gelmektedir. “Nanoteknoloji”, terimi “nanometre” teriminden gelmektedir. Nanometre temel olarak bir ölçüm skalasıdır ve metrik sistem içinde bir metrenin milyarda biri veya bir milimetrenin milyonda biri olarak ifade edilmektedir [22]. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Nanoteknoloji Girişimi (NNI) tarafından yapılan tanıma göre nanoteknoloji 1-100 nanometre arasındaki boyutlara sahip maddelerin incelenmesi ve işlenmesi olarak tanımlanmaktadır [1].

Nanoteknolojinin Genel Kullanım Alanları

Nanoteknoloji tıbbi uygulamalardan biyoteknolojiye, elektronikten gıdaya kadar pek çok alanda kullanılmaktadır. Nanoteknoloji tekstil alanında çorap ipliğine gümüş nano parçacıkların uygulanması ile bakteri barındırmayan ve kokuyu engelleyen çorapların üretimi sağlamaktadır. Bunun yanında sensörlerin kullanıldığı kumaşlar ile komut veren, hisseden ve enerji üretebilen giysilerin yapımı sağlanmıştır. Suyu itebilen kumaşların kullanılmasıyla kirlenmeyen, yıkama ve ütümeye ihtiyaç duyulmayan elbiseler üretilmiştir. Elektronik ve optik özelliğe sahip kumaş ipliğinin kullanılmasıyla aydınlatma özelliğine sahip giysilerin üretilmesi sağlanmıştır [3,6]. Nanoteknoloji tarım alanında bitki ve hayvan ıslahının sağlanması, bitki hastalıklarının önlenmesi, zirai ilaç kullanımının azaltılması ve hastalıkların tespiti gibi alanlarda kullanılmaktadır [22]. Nanoteknoloji kozmetik sanayinde; nano-kapsüller içeren aktif malzemelerden üretilmiş kırışık önleyici kremlerin yapımı, kimya sanayinde; nanoparçacıkların fotokatalitik etkileri ile optimum yüzey temizleme özelliğine sahip boyaların üretimi ve kendi kendini temizleyebilen binaların yapımında kullanılmaktadır. Elektronik alanında nanoteknoloji; mevcut hafıza aygıtlarından 10-100 kat fazla kalıcı belleğe sahip bilgisayarlar ve karbon nanotüp transistörler ile geleceğin ultra hızlı ve küçük bilgisayarlarının üretiminde kullanılmaktadır [2,4].

Nanoteknolojinin Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları

Nano gıda; gıdaların üretimi, işlenmesi ve ambalajlanması sırasında nanoteknoloji tekniklerinin kullanılması olarak tanımlanmaktadır. Bu teknik, gıdaların nanomakineler tarafından üretildiği veya modifiye edildiği anlamına gelmemektedir. Gıda nanoteknolojisi basit anlamda gıda sektörü için nanobilim uygulamalarını kapsamaktadır. Daha spesifik anlamda ise nano bilim ve mühendislik ile gıdaların yapısı, dokusu ve kalitesi üzerinde yeni atılımlar ve uygulamalar geliştirmek olarak tanımlanmaktadır [22].

Gıda endüstrisinde nanoteknoloji uygulamaları kaliteleri ve güvenilir gıda üretimi için gıda paketlenme sistemlerini geliştirmek, biyosensörler kullanılarak gıdaların izlenebilirliğini sağlamak, aktif ve akıllı paketlenme sistemleri geliştirerek bakterilerin

tanımlanması sağlamak gibi bazı uygulamaları içermektedir [22,41].

Gıda katkı maddeleri, besin takviyeleri, hafif ve antibakteriyel özellikte yiyecek ve içecek kaplarının yapılması gıda nanoteknolojisinin asıl odak noktasını oluşturmaktadır. Nanoparçacıkların gıda ambalajlarında kullanılması ile ambalajların çevre koşullarına karşı daha dayanıklı, esnek, ışığa ve gazlara karşı koruyucu özellik kazanması sağlanmaktadır [32].

Nanoteknolojinin gıda alanındaki uygulama alanları dört ana başlık altında toplanmaktadır. Bunlar:

- Gıdaların işlenmesi ve fonksiyonel ürünlerin geliştirilmesi,
- Biyoaktif maddelerin taşınması ve kontrollü salınımı,
- Patojenlerin tespiti ve gıda güvenliğinin artırılması,
- Paketleme sistemlerinin geliştirilmesi'dir.

Gıdaların İşlenmesi ve Fonksiyonel Ürünlerin Geliştirilmesi

Nanoemülsiyonlar: Mekanik kesme kuvveti kullanılarak, birbiri içinde çözünmeyen ya da kısmi olarak çözülen su ve yağ gibi iki sıvı fazın damlacıklar halinde dağılmasıyla oluşan karışıma emülsiyon adı verilmektedir. Damlacık çaplarının ortalama 20-100 nm olduğu sıvı fazdaki ve nano ölçekteki yapılar, nanoemülsiyonlar olarak ifade edilmektedir [28, 29].

Nanoemülsiyonlar yapılarını oluşturan ve saydam görünmelerini sağlayan nanodamlacıklar vasıtasıyla sedimentasyon ve kremleşmeyi engelleyerek biyoaktif ürünlerin transportunun gerçekleştirilmesi amacıyla geliştirilen önemli sistemlerden biridir. Nanoemülsiyonların, lipaz gibi yüzey aktif maddeler için substratların erişilebilirliklerini artırdıkları belirtilmiştir. Nanoemülsiyonlar ürün görünümünü iyileştirmekle birlikte nanokapsülleme ile yağların biyoyararlanımı ve yağda çözünebilen besinlerin sindirimini artırmaktadır [28].

Nanoemülsiyonların, bağırsaklarda biyoyararlılığı çok düşük olan koenzim Q10'in (CoQ10) nanoemülsifiye edilmiş formlarının kullanımı ile biyoyararlılığı önemli ölçüde artırdığı bildirilmek-

tedir [44]. β -karoten içeren nanodispersiyonların kullanımı ile karoteoidlerin sindirim sisteminden geçişleri süresince suda çözünmelerinin sağlandığı ve biyoyararlıklarının artırıldığı bildirilmiştir [31]. E vitamini yağda çözünür özellikte olmasından dolayı meyve sularına katıldığında ürünün görünümünü olumsuz etkiler. Bu olumsuzluğun giderilmesi amacıyla nanoemülsiyonlar kullanılarak meyve sularınının daha berrak olması sağlanmaktadır [13].

Biyoaktif Maddelerin Taşınması ve Kontrollü Salınımı

Nanokapsüller: Proteinler, vitaminler, esansiyel yağlar, antioksidanlar ve mineraller gibi çeşitli besin öğelerinin biyoyararlılığını artıran, onları olumsuz çevre şartlarından koruyarak vücutta hedeflenen dokulara taşınmasını sağlayan taşıma sistemleridir. Nanokapsüller gıdaların işlenmesi ve muhafazası esnasında depolama koşullarının etkisi ile biyoaktif maddelerin zararlı bileşenlere dönüşmelerini engellenmektedirler [17].

Gıdalarda mikroenkapsülasyon teknolojisinin kullanımı ile, koruyucu bir bariyer sağlanması, hoş olmayan lezzet ve tadın maskelenmesi, biyoyararlanımın artırılması, kontrollü salınım, suda çözünmeyen gıda ve katkı maddeleri için sulu bir ortam içinde dağılımın sağlanması gibi etkiler sağlanmaktadır [12]. Gıda alanında yapılan çalışmalarda mikrokapsüllenmiş balık yağının ekmeclere eklenmesi ile balık yağının hoş olmayan kokusu ve tadının maskelendiği bildirilmiştir [34]. Mısır içerisinde bulunan başlıca protein olan zein nanomalzemesi, aroma maddesi olarak ve diyet takviyelerinde kullanılmaktadır [40].

Lipozomlar: Lipozomlar polimer esaslı nanopartiküller içerisinde üstün avantajlar sunan, tek veya birçok tabakadan oluşmuş veziküler yapıdaki taşıma sistemleri olarak tanımlanmaktadır [18]. Lipozomlar toksik yapıda olmayan, biyolojik olarak parçalanabilen ve immunojenik karakterde olmayan maddelerdir. Lipozomlar ilaç taşıyıcı özellikleri ile tıp ve biyomühendislik alanında, bunun yanında su içerisinde çözünebilir ve çözünemeyen molekülleri tutabilme fonksiyonları ile gıda ve tarım endüstrisinde kullanılmaktadır [25].

Gıda sektöründe yapılan çalışmalarda, kapsüle edilmiş enzimlerin kullanılması ile ürünlerin kalitesinin artırılması, fermentasyon süresininin kı-

saltılması ve kimyasallara karşı korunma amaçlanmaktadır [20]. Laktoz intoleransı olan hastalar için geliştirilen ürünlerde, laktozun glikoz ve galaktoza parçalanması ile oluşan yüksek şekerli tadın önlenmesi amacıyla lipozomlara kapsüllenen β -galaktosidaz enziminin $+5^{\circ}\text{C}$ 'de 20 gün ile 1 ay arasında enzim aktivitesini koruduğu belirtilmektedir [23].

Patojenlerin Tespiti ve Gıda Güvenliğinin Artırılması

Nanosensörler: Gıda işleme zinciri boyunca gıdanın bozulması ya da tahribatına neden olan patojenlerin veya kimyasal kirleticilerin tespitine yönelik ve ürünlerin takip edilmesi amacıyla nano bazlı sensörler kullanılmaktadır. Bu amaçla yüksek işlem algılama özelliğinde, basit, düşük maliyetli, kolay geri dönüşümlü ve etikete ihtiyaç duyulmayan çok duyarlı karbon nanotüp tabanlı biyosensörler geliştirilmiştir. Geliştirilen bu sensörler ile gıdalar üzerindeki mikroorganizma, toksik proteinler ve bozulmuş ürünlerin tespitine yönelik çalışmalar devam etmektedir [15].

Gıda mikrobiyolojisi için zaman faktörünün önemi düşünüldüğünde patojenleri gün, saat hatta dakikalar ile tespit edebilen nanosensörlerin geliştirilmesi hayati önem taşımaktadır. Bu tür nanosensörler gıda maddeleri içerisine doğrudan yerleştirilerek, gıda bozulmaları sırasında açığa çıkan kimyasalları tespit edebilen "elektronik dil" ya da "burun" olarak adlandırılan sistemler geliştirilmiştir [19]. Nanopartiküller, ambalaj malzemelerinde reaktif partiküller olarak kullanılmaktadır. Nanosensör olarak adlandırılan bu malzemeler sayesinde, çevresel değişikliklerin (oksijen, sıcaklık, nem vs.) gıda üzerinde şekillendirdiği yıkım ürünlerinin oluşturduğu gıda bozulmalarının tespit edilmesi mümkündür [8].

Gıdaların son kullanma tarihleri, maruz kaldıkları dağıtım ve saklama koşulları dikkate alınarak belirlenmektedir. Özellikle taşıma ve muhafaza aşamaları sırasında soğuk zincir kurallarına dikkat edilmediği durumlarda şekillenen ısı değişiklikleri nedeniyle gıdalar patojenler açısından risk taşımaktadır. Ambalaj sistemleri üzerindeki mikrogözenekler ve kusurlar, gıdanın yüksek oranda oksijene maruz kalmasına ve istenmeyen değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bazı kimyasal bileşikler, patojenler ve toksinleri tespit edebilen nanosensörlerin gıda ambalajlarına entegre edilmesi ile gıdala-

rın tazeliklerinin korunması ve son kullanma tarihlerinin belirlenmesindeki hataların ortadan kaldırılması sağlanmaktadır. [32].

Gıdalar üzerinde bakteri, virüs ve toksin gibi alerjenlerin algılanmasına yönelik nanosensörlerin kullanılmasına ilişkin çok sayıda araştırma yapılmaktadır [14,39]. Bu konuda poli (dimetil-siloksan) çipleri üzerinde 0.5 ng/ml'lik limitlerde *S.aureus* enterotoksin B antikörlerini tespit edebilen biosensörler, ayrıca aynı anda *Salmonella* spp. *L.monocytogenes* ve *E.coli* O157'yi tespit edebilen nanoveziküller geliştirilmiştir [14]. Nano titanyum dioksit (TiO₂) ile kapsüllenmiş ambalaj filmlerinin taze meyve ve sebzelerin yüzeyinde *E. coli* kontaminasyonunu azaltmak amacıyla kullanılabileceği bildirilmektedir [39].

Paketleme Sistemlerinin Geliştirilmesi

Gıdalar fiziksel, kimyasal ve biyolojik tehlikelerle kontaminasyonun engellenmesi, bunun yanında oksijen, su buharı ve ışık gibi dış etkilere korunması amacıyla ambalajlanmaktadır. Kullanılan ambalajların özellikleri gıdanın kalitesi ve raf ömrünün belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Kullanılan materyalin gözenek sayısı, genişliği, dış ortamdan gelebilecek nem ve değişik gazlar, ürün kalitesi üzerine etki etmektedir. Gıda ambalajlarında nanoteknolojiye dayalı malzemelerin kullanımı ile üretim için enerji girişinin azaltılması, taşıma ve depolama aşamalarında gaz ve ışık girişine karşı bariyer korumasının artırılması, CO₂ emisyonunun azaltılması ve insan sağlığını tehdit eden tüm etkileşimlerin en düşük düzeylere indirilmesi gibi çevresel ve ekonomik avantajlar sağlamaktadır [9,11].

Nanoteknoloji gıda ambalajlaması alanında nanokompozit ambalaj malzemeleri, biyobozunur nanokompozit ambalaj malzemeleri, aktif ve akıllı nano ambalajlar olmak üzere üç farklı kategoride kullanılmaktadır [7].

Nanokompozit Ambalaj Malzemeleri: Günümüzde gıda ambalaj sanayinde kullanılan malzemelerin büyük bir bölümünün fosil yakıtlarından elde edilen ve biyo bozunurluğu pratik olmayan ürünler olması nedeniyle, ambalaj malzemelerinin ciddi çevresel sorunlar meydana getirdiği belirtilmektedir [24]. Gıdaların kalitesini artırmak, raf ömrünü uzatmak ve ambalaj atıklarının azaltılmasını sağlamak için sentetik ve yenilebilir (biyobozunur) ambalaj

malzemelerinin üretimi yönünde çalışmalar yapılmaktadır [38].

Nanokompozitler bir ya da daha fazla boyutlu, 100 nanometreden (nm) daha küçük nano-malzeme içeren polimerlerdir [27]. Bu polimer nanokompozitler ısıya dayanıklı, güçlü ve yüksek bariyer malzemeleri içeren ürünlerdir [21]. Nano parçacıklar plastik veya film içinde yayılarak nem, oksijen ve karbondioksitin gıdaya temasını engelleyecek şekilde bariyer oluştururlar. Plastik malzemelere en çok eklenen nanokil malzemesi montmorillonite (MMT)'dir. Nanokompozitler düşük yoğunlukta, şeffaf yapıda, koku, oksijen ve su buharı geçirgenliği düşük, iyi yüzey özelliğine sahip ve geri dönüşüm sağlayan ambalajların geliştirilmesini sağlamaktadır. Bütün bu nanokompozit özelliklerin geliştirilmesi için genellikle %5'ten az oranda nanopartikül kullanılmaktadır [5]. Gıda ambalajında en sık kullanılan polimerler arasında polietilen, polipropilen, polistiren, polivinil klorür (PVC) ve polietilen tereftalat (PET) yer almaktadır [26].

Biyobozunur Nanokompozit Ambalaj Malzemeleri: Biyobozunur polimerler yenilenebilir tarımsal hammaddeler, hayvansal kaynaklar, deniz, gıda sanayi işleme atıkları ya da mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir. Yenilenebilir hammaddelerin yanı sıra bu ambalaj malzemelerinde karbondioksit, su ve kaliteli gübre gibi çevre dostu biyolojik ürünler de kullanılmaktadır [38]. Artan çevre bilincinin etkisiyle biyolojik olarak parçalanmayan ambalaj malzemelerinin çevresel atık sorunlarına neden olması biyobozunur ambalajlama materyallerinin geliştirilmesini gündeme getirmiştir [30].

Gıda ambalajlama sektöründe biyopolimerlerin kullanımı ile, plastik bazlı ambalajlamaya bağımlılık azalmakta ve yenilenebilir tarımsal kaynakların değerlendirilmesi mümkün olmaktadır. Biyopolimer kategorisinde değerlendirilen polisakkaritler, proteinler ve lipidlerden üretilen yenilebilir film ve kaplamaların kullanımı gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır [10,16].

Son yıllarda biyobozunur nanokompozitler arasında polilaktik asit (PLA), polihidroksibütirat (PHB), polikaprolakton (PCL), polibütülen süksinat (PBS), nişasta ve derivatları gibi alifatik polyessterler üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Bu maddeler biyobozunurdur ve gıdaların tat, koku ve görünüş gibi organoleptik karakteristiklerini geliş-

tirirler. Ambalaj materyalinin hacmini ve ağırlığını azaltırlar, gıdanın raf ömrünü uzatarak, iç bileşenlerini kontrol altında tutarlar [35,43]. Aktif ve Akıllı Paketleme Sistemleri: Aktif paketleme sistemleri gıdaların yüksek kaliteli olmasını sağlamak, muhafaza sürelerini artırarak raf ömürlerini uzatmak amacı ile geliştirilmiştir. Aktif ambalajlama gıdayı dış etkilere koruyan bir bariyer olmanın yanı sıra ambalaj içindeki ortamı kontrol edebilen ve tepki veren ambalaj sistemidir. Aktif paketleme teknolojisi, oksijen yakalayıcılar, nem düzenleyiciler, karbondioksit düzenleyiciler, etilen yakalayıcılar ve antimikrobiyal paketleme sistemlerinden oluşmaktadır [42]

Akıllı paketleme sistemleri, depolama ve taşıma esnasında paketlenmiş gıdanın kalitesi hakkında bilgi vermek için gıdanın durumunun izlemeye alındığı paketleme sistemleridir. Akıllı ambalajlama teknolojisinde kullanılan çeşitli indikatörler (tazelik indikatörleri, zaman-sıcaklık indikatörleri), ve sensörler (gaz sensörleri, floresan esaslı oksijen sensörleri, biyosensörler) sayesinde tüketiciye ambalaj içindeki gıdanın kalitesi hakkında bilgi sağlanır [33].

Sonuç

Nanoteknoloji yakın gelecekte başta gıda endüstrisi olmak üzere pek çok endüstri alanında yeni ufuklar açacaktır. Nanoteknoloji gıda sanayinde yeni gıda ürünlerinin geliştirilmesi, gıdaların besin değerlerinin artırılması, patojenlerin tespiti, gıda kalitesinin izlenmesi gibi pek çok faydalar sağlamaktadır. Nanoteknoloji uygulamaları ile geleneksel paketleme teknikleri yerini akıllı ambalajlara bırakacaktır. Bu şekilde gıdaların bozulma belirtilerinin önceden tespit edilmesi, gıda güvenilirliği ve raf ömrünün güvence altına alınması sağlanacaktır.

Nanopartiküllerin gıda alanında kullanımı tüketicilerde endişe yaratmaktadır. Nanopartiküllerin insan sağlığı üzerine nasıl bir etkisinin olacağı ve maruz kalabilecekleri maksimum limitlerin bilinmemesi nedeniyle tüketiciler nanoteknoloji uygulamalarına karşı temkinli yaklaşmaktadır. Gıdaların işlenmesi ve ambalajlanması aşamalarında nanomateryallerin kullanımı konusundaki bu endişelerin yapılan araştırmaların artırılması, yeni yaklaşımlar, ulusal ve uluslararası yasal ve bilimsel düzenlemeler ile giderilebileceği düşünülmektedir.

Nanoteknolojinin gıda alanında uygulanmasına yönelik çalışmaların sürdürülmesi ve desteklenmesi için gerekli teşvikler sağlanmalıdır. Bu sayede daha az enerji kullanılarak daha verimli, ucuz ve güvenilir ürünlerin elde edilmesi mümkün olacaktır.

Sonuç olarak nanoteknoloji alanında yapılan çalışmalar ile mevcut gıda işleme sistemleri değiştirilerek gıdaların besleyici değerinin artırılması, sağlıklı ve güvenilir gıda tüketimi sağlanacaktır.

Kaynaklar

1. **Anonim**, (2005). *U.S. National nanotechnology initiative, the national nanotechnology initiative strategic plan*. Erişim Adresi: http://www.nanoscience.gatech.edu/news/news/05_05_18_NNI.pdf, Erişim Tarihi: 14.02.2015.
2. **Anonim**, (2008). *Risk governance of nanotechnology applications in food and cosmetics*. Erişim Adresi: <http://www.nanowerk.com/nanotechnology/reports/reportpdf/report125.pdf>, Erişim Tarihi: 14.02.2015.
3. **Anonim**, (2010). *Report on Nanotechnology & Textiles Medical Textiles, Sport/OutdoorTextiles*. Erişim Adresi: http://www.nanotec.it/public/wp-content/uploads/2014/04/ObservatoryNano_FocusReport2010_MedicalTextiles_Sport_OutdoorTextilesv2.pdf, Erişim Tarihi: 12.02.2015.
4. **Anonim**, (2015). *Action plan nanotechnology federal ministry of education and research*. Erişim Adresi: http://www.lai.fuberlin.de/homepages/nitsch/publikationen/Germany_ActionPlanNanotechnology_2015.pdf, Erişim Tarihi: 10.02.2015.
5. **Arora A, Padua GW**, (2010). *Review: Nanocomposites in food Packaging*. *J Food Sci*. 75(1), 43-49.
6. **Bayındır M**, (2006). *Nano teknoloji tekstil emrinde, Bilim ve Teknik Aralık/2006:1*.
7. **Bente F, Hellstorm T, Henrysdotter G, Hjulmand-Lassen M, Rüdinger J, Sipilainen Malm T, Solli E, Svensson K, Tharkelsson EA, Tuomaala V**, (2000). *Active and intelligent food packaging, a nordic report on legislative aspects*. *Nordic Council of Ministers, Copenhagen*. 13-21.
8. **Bouwmeester H, Dekkers S, Noordam MY, Hagens WI, Bulder AS, de Heer C, Wijnhoven SW, Marvin HJ, Sips AJ**, (2009). *Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production*. *Regul Toxicol Pharm*. 53(1), 52-62.
9. **Buzby JC**, (2010). *Nanotechnology for food applications. More questions than answers*. *J Consum Aff*. 44(3),528-545.
10. **Cha DS, Chinnan MS**, (2004). *Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review*. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 44(4), 223-37.
11. **Chau CF, Wu SH, Yen GC**, (2007). *The development of regulations for food nanotechnology*. *Trends Food Sci Technol*. 18, 169-280.
12. **Chaudhry Q, Scotter M, Blackburn J, Ross B, Boxall A, Castle L, Aitken R, Watkins R**, (2008). *Applications and*

- implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Addit Contam.* 25(3), 241-258.
13. **Chen CC, Wagner G,** (2004). Vitamin E nanoparticle for beverage applications. *Chem Eng Res Des.* 82,1432- 1437.
 14. **Chen CS, Durst RA,** (2006). Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7 *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* with an array-based immunosorbent assay using universal protein Gliposomal nanovesicles. *Talanta.* (69), 232–238.
 15. **Cui Y, Wei Q, Park H, Lieber CM,** (2001). Nanowire nanosensors for highly Sensitive And selective detection of biological and chemical species. *Science.* 293, 1289–1292.
 16. **Dawson LP, Acton JC, Ogale AA,** (2002). Biopolymer films and potential applications to meat and poultry products. *Fresh Meat / Packaging II. Proceedings of the 55th Annual Reciprocal Meat Conference,* 75-82. Michigan-USA.
 17. **Dion M, Luykx AM, Peters RJB, Van Ruth SM, Bouwmeester H,** (2008). A review of analytical methods for the identification and characterization of nano delivery systems in food. *J Agric Food Chem.* 56: 8231-8247.
 18. **Fenske, DB, Chonn A, Cullis PR,** (2008). Liposomal nanomedicines: an emerging field. *Toxicol Pathol.* 36 (1), 21–29.
 19. **Garcia M, Aleixandre M, Gutiérrez J, Horrillo MC,** (2006). Electronic nose for wine discrimination. *Sens Actuators B Chem.* 113, 911-916.
 20. **Gomes-Hens A, Fenandez-Romero JM,** (2006). Analytical methods for the control of Liposomal deliver system. *Trends Anal Chem.* 25(2), 167-168.
 21. **Henriette MC,** (2009). Nanocomposites for food packaging applications. *Food Res Int.* 42, 1240–53.
 22. **Joseph T, Morrison M,** (2006). Nanotechnology in agriculture and food. Erişim Adresi: <http://www.nanowerk.com/nanotechnology/reports/reportpdf/report61.pdf>, Erişim tarihi: 27.02.2015.
 23. **Rao DR, Chawan CB, Veeramachaneni R,** (1995). Liposomal encapsulation of betagalactosidase comparison of 2 methods of encapsulation and invitro lactose digestibility. *J Food Biochem.* 18(4): 239-251.
 24. **Kirwan MJ, Strawbridge JW,** (2003). *Plastics in food packaging.* R Coles, D McDowell and MJ Kirwan eds. *Food Packaging Technology.* CRC Press Inc, Oxford London. p.174-240.
 25. **Lasic DD,** (1998). Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol.* 16, 307–321.
 26. **Marsh K, Bugusu B,** (2007). Food packaging-roles, materials, and environmental issues. *J Food Sci.* 72(3), 39-55.
 27. **Matthews FL, Rawlings RD,** (1999). *Composite materials: Enginerig and science. First Edition.* Oxford London: CRC Press LLC,p.168.
 28. **McClements DJ,** (2011). Food-grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 51:285–330.
 29. **McClements DJ,** (2010). Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Annu Rev Food Sci Technol.* 1, 241-269.
 30. **Rhim JW, Hong SI, Park HM, Ng KW,** (2006). Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *J Agric Food Chem.*54(16),5814-5822.
 31. **Ribeiro HS, Chu BS, Ichikawa S, Nakajima M,** (2008). Preparation of nanodispersions containing β carotene by solvent displacement method. *Food Hydrocolloids.*(22) 1,12-17.
 32. **Robinson DKR, Morrison MJ,** (2009). Nanotechnology developments for the agrifood sector - report of the observatory NANO. Erişim Adresi : http://nanopinion.eu/sites/default/files/full_report_nanotechnology_in_agrifood_may_2009pdf, Erişim Tarihi 05.03.2015.
 33. **Robertson GL,** (2006). *Active and intelligent packaging. In food packaging: principles and practice 2nd ed.* CRC Press, Boca Raton, Fl. 1-550.
 34. **Serfert Y, Drucsh S, Schwarz K,** (2010). Sensory odour profiling and lipid oxidation status of fish oil and microencapsulated fish oil. *Food Chem.* 4 , 968-975.
 35. **Sorrentino A, Gorrasi G, Vittoria V,** (2007). Potential perspectives of bio nanocomposites for food packaging applications. *Trends Food Sci Technol.* 18, 84-95.
 36. **Sürengil ve Kılınç,** (2011). Gıda - ambalaj sektöründe nanoteknolojik uygulamalar ve su ürünleri açısından önemi. *J FisheriesSciences.com.* 5(4), 317-325.
 37. **Tarhan Ö, Gökmen V, Harsa Ş,** (2010). Nanoteknolojinin gıda bilim ve teknolojis alanındaki uygulamaları. *Gıda.* 35 (3), 219-225.
 38. **Tharanathan RN,** (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends Food Sci Technol.* 14(3), 71-78.
 39. **Theinsathid P, Visessanguan W, Kingcha Y, Keeratipibul S,** (2011). Antimicrobial effectiveness of biobased film against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Adv J Food Sci Technol.* 3 (4): 294-302.
 40. **Torres-Giner S, Gimenez E, Lagaron JM,** (2007). Characterization of the morphology and thermal properties of Zein Prolamine nanostructures obtained by electrospinning. *Food Hydrocolloids.* 22, 601–614.
 41. **Valdes MG, Gonzalez ACV, Calzon JAG, Diaz-Garcia ME,** (2009). Analytical nanotechnology for food analysis. *Microchim Acta.*166, 1-19.
 42. **Vermeiren L, Devlieghere F, Beest VM, de Kruijf N, Debevere J,** (1999). Developments in the active packaging of foods. *Trends Food Sci Technol.* 10(3):77-86.
 43. **Zhao R, Torley P, Halley PJ,** (2008). Emerging biodegradable materials: Starch and protein based bio-nanocomposites. *J Mater Sci.* 43(9),3058-3071.
 44. **Zulli F, Belser E, Schmid D, Liechti C, Suter F,** (2006). Preparation and properties of Coenzyme Q10 nanoemulsions. *Cosmet Sci Technol.* 40-46.

Filogenetik Ağağlandırma Metotları

Seyyide SARIÇAM, H. Kaan MÜŞTAK

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Geliş Tarihi / Received: 02.09.2015, Kabul Tarihi / Accepted: 19.11.2015

Özet: Bu derlemede; filogenetik bilimi ve esasları, temel terminolojisi, ağağ gösterim şekilleri hakkında bilgi verilip, bir filogenetik analizde izlenmesi gereken adımlar anlatıldı. Analizde kullanılacak verinin taşınması gereken başlıca kriterler, veri tabanlarından referans birimlerin elde edilmesi ve genlerin analiz süreci ele alındı. Filogenetik ağağ oluşturmada kullanılan bilgisayar tabanlı metotların başlıca özellikleri ve üstünlükleri belirtildi. Analiz sonucu elde edilen ağağın güvenilirliği ve bu değerin yorumlanması üzerinde duruldu. Özetle bu derlemede temel filogenetik bilgisinin verilmesi amaçlandı.

Anahtar kelimeler: Ağağlandırma metotları, filogenetik, takson

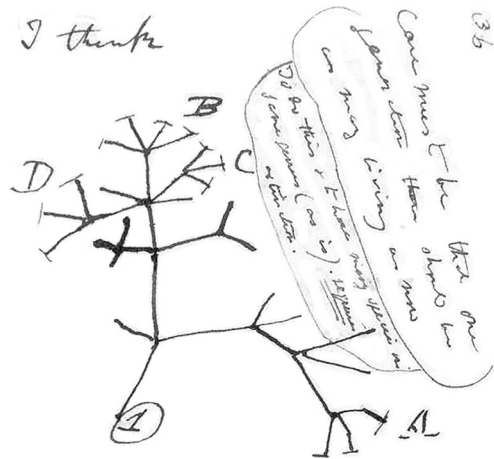
Phylogenetic Tree Construction Methods

Abstract: In this review; the knowledge about the phylogenetic science and its principles, basic phylogeny terminology, type of phylogenetic tree presentations were given and also the steps that must be followed in a phylogenetic analysis was mentioned. The main criteria for the data to be used in analysis, obtaining the reference units from databanks and the process of data analysis were described. The main features and advantages of the computer-based methods that were used to create phylogenetic trees were also showed. The reliability of the phylogenetic tree obtained from the results of analysis and the interpretation of these values were described. In summary it was aimed to give the basic phylogenetic knowledge.

Key words: Tree construction methods, phylogenetic, taxa

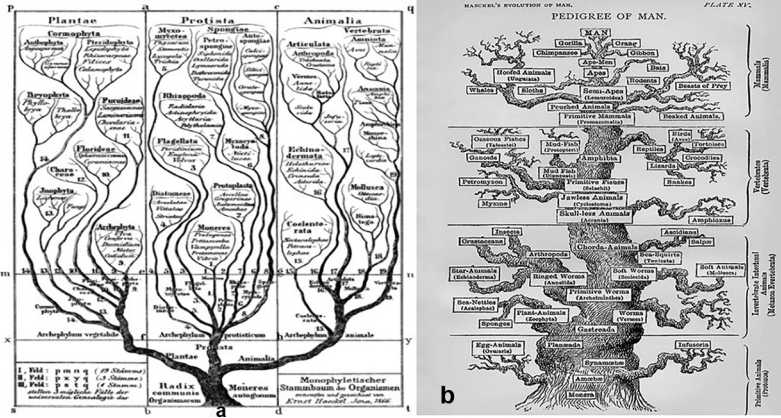
Giriş

“Filogenetik”, tüm organizma grupları arasındaki evrimsel ilişkiyi ata-soy ilişkileri şeklinde ortaya çıkarmayı amaçlar. Organizmaların sahip olduğu moleküler mekanizmalar, tek bir ataya sahip olduklarını göstermektedir. Ortak atadan evrimleşmeleri sayesinde türler, birbirleriyle ilişkilendirilebilirler [6,7]. Filogenetik sistematilerinin kurucularından Alman biyolog Emil Hans Willi Hennig, bu ilişkilendirmenin; türler arası morfolojik, fizyolojik, genetik, coğrafik ve ekolojik farklılıklar dikkate alınarak gerçekleştirilebileceğini ortaya koymuştur [12]. Saptanan filogenetik ilişkinin, grafiksel olarak gösterimi ise “filogenetik ağağlar” aracılığıyla olur. Organizmalar arası evrimsel ilişkileri gösteren bu filogeniler, “evrim ağacı” ya da “yaşam ağacı” olarak da bilinmektedir. Yaşam ağacı kavramı, tek atadan köken almış ve dallanarak farklılaşmış türleri tek bir konsept halinde göstermek için, ilk kez İngiliz biyolog Charles Darwin tarafından (1809-1882) evrim teorisinde kullanılmıştır (Şekil 1) [1].



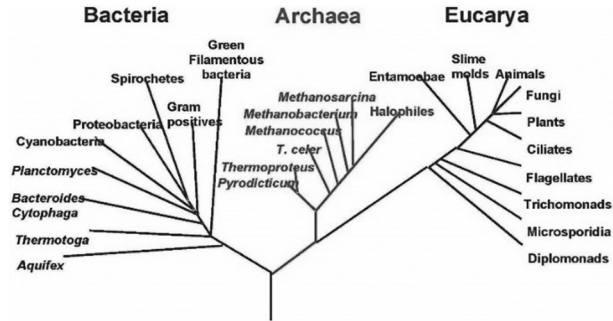
Şekil 1. Charles Darwin'in “Türlerin kökeni (1859)” bölüm IV’de kullandığı yaşam ağacı.

Alman biyolog Ernst Haeckel, Darwin’in görüşlerini benimseyerek biyogenetiğin temelini attığı çalışmaları (1834-1919) daha kapsamlı ve ayrıntılı yaşam ağağları oluşturmuştur (Şekil 2).



Şekil 2. a) Ernst Haeckel; 1866'da bitki, protista ve hayvanları kapsayan yaşam ağacını, b) 1879'da ise insan yaşam ağacını oluşturmuştur [18].

1970'lerin sonunda ise Carl Woese ve George Fox, prokaryot ve ökaryot ayrımını 16S rRNA analizleriyle ortaya koymuş ve filogenetik ağacın üç parçalı evrensel halini önermiştir (Şekil 3) [1].



Şekil 3. Carl Woese tarafından ortaya konan "Yaşamın filogenetik ağacı"

Filogenetik'te Kullanılan Temel Terminoloji

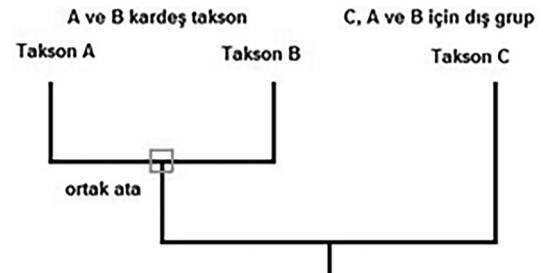
Takson

Canlıların sınıflandırılmasında, alemde türe kadar bir hiyerarşi içinde düzenlenmiş birimlerin (şube, sınıf, takım, familya, cins) her birine "takson" denir. Bir gruba takson denilebilmesi için, belirli bir kategoriye girebilecek derecede ayırt edici farklılıklara sahip olması gerekir. En üst kategorilerde yer alan taksonlar, daha aşağıdaki taksonları içine alan basamaklar şeklinde gösterilirler. Filogenetik ağaçlarda dallanma noktalarında bulunurlar (Şekil 5) [20]. Filogenetik ağaçta ortak bir atadan köken alan, birbiriyle yakın ilişkili taksonlara da "kardeş taksonlar" denir (Şekil 4) [6].

Dış Grup

Filogenetik ağaçta diğer tüm taksonlardan evrimsel süreçte açık bir biçimde en erken ayrılan taksona

denir. Diğer taksonlar, dış gruba kıyaslanınca birbiriyle daha yakından ilişkilidir. Bu nedenle ağacın köküne yakın bulunur (Şekil 4).



Şekil 4. Filogenetik ağaç birimleri

Klan

Ortak bir atadan gelen takson grubuna (Tür ya da popülasyonlar) "klan" ya da "monofiletik" denir. Bir monofiletik gruptaki taksonların paylaştığı bir ata, başka herhangi bir takson tarafından paylaşılmaz. Bu nedenle "tek kökenlilik" olarak da bilinmektedir (Şekil 5) [7].

Polifiletik ve Parafiletik grup

Birden fazla atadan oluşan türlere "polifiletik grup" ya da "çok kökenlilik" denir. Ortak atanın bütün türlerini içermeyen bazı gruplara ise "parafiletik" grup denir (Şekil 5) [3].

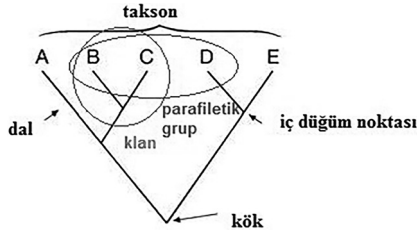
Soy

Bir filogenetik ağaçta ata-torun ilişkisini tanımlayan ve monofiletik gruba giden dala denir.

Düğüm noktası

Filogenetik ağaçta komşu iki taksonun kesiştiği noktadır. Her düğüm bir taksonomik birimdir. "Hi-

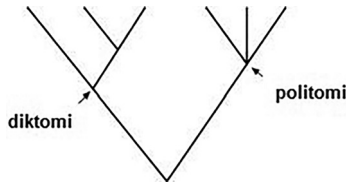
potetik taksonlar “ya da “çatallanma noktası” olarak da adlandırılabilirler (Şekil 5).



Şekil 5. Filogenetik ağaç birimleri

Diktomi ve Politomi

Filogenetik ağacın dallanma modeline ya da desenine denir. Bu model ayrık iki ana dal üzerinde oluştuğunda “diktomi”; tek bir düğüm noktasından köken alan ikiden fazla ana dal üzerinde oluştuğunda “politomi” adını alır (Şekil 6) [7].



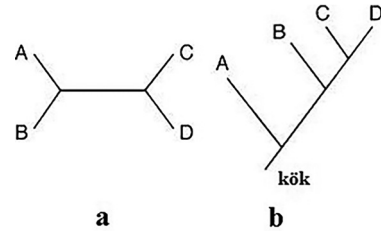
Şekil 6. Filogenetik ağaç birimleri

1962 yılında Emile Zuckerkandl ve Linus Pauling tarafından ortaya konulan “Moleküler Saat Hipotezi” (MSH); jeolojik geçmişte iki türün veya taksonların birbirinden ne zaman ayrıldıklarını tespit etmek için, moleküler değişim oranlarının kullanıldığı bir tekniktir. Moleküler saat belirlemede kullanılan moleküler veriler, nükleik asitlerde nükleotid dizileri veya proteinlerdeki aminoasit dizileridir [21]. “Gen saati, genetik saat ya da evrimsel saat” dendiği de olur [1].

Filogenetik Ağaç Gösterim Şekilleri

Köklü ve Köksüz Ağaçlar

Filogenetik ağaçlar, köklü ya da köksüz formatlarda hazırlanabilir. Köksüz ağaçta, her bir taksonun diğeriyle ilişkisi görülür ancak ortak ata tahmin edilemediği için evrimsel yönü yoktur. Bu evrimsel ilişkiyi belirlemek için kullanılan köklü ağaçlarda ise taksonlar, ortak bir atadan köken alarak yerleştirilir. Bundan dolayı köklü ağaç, köksüz filogenetik ağaçlara oranla daha fazla bilgi sağlamaktadır (Şekil 7) [7].



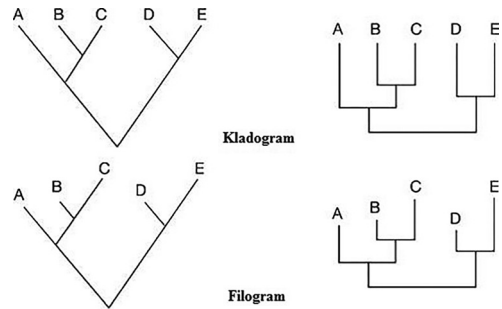
Şekil 7. a) Köksüz, b) Köklü filogenetik ağaç

Dendrogram, Kladogram ve Filogram

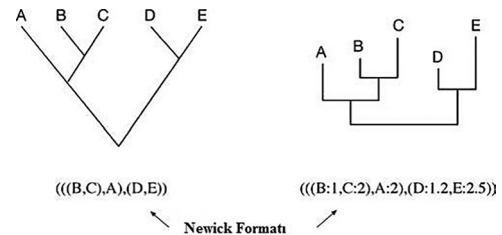
Filogenetik ağaçlarda, taksonlar arası ilişkiler tanımlanır. Bu gösterim, dendrogram, kladogram ve filogram gibi farklı yollarla gerçekleştirilebilir.

“Dendrogram”, yunanca ağaç (dendro) ve çizim (gramma) kelimelerinden köken almaktadır. Kümeleme ile hiyerarşik düzen halinde ele alınan verileri bir araya getiren en temel gösterimdir. Öbek ağacı olarak da bilinmektedir [23].

“Kladogram”, dal uzunluklarının önemli olmadığı filogenetik ağaç şekilleridir. Bu nedenle dal uzunlukları farklı değildir ve evrimsel yakınlık için bir anlamı yoktur. “Filogram”, ise dal uzunluklarının önemli olduğu filogenetik ağaç şekilleridir. Dal uzunlukları ile evrimsel uzaklıkların doğru orantılı olarak ifade edildiği gösterimdir (Şekil 8) [9].



Şekil 8. Kladogram ve Filogram



Şekil 9. Newick formatı.

Kladogram ve filogram çizimleri için geliştirilmiş bir format olan “Newick Formatı” ile taksonlar,

iç içe parantezler şeklinde yazılır. Bir monofiletik gruba ait taksonlar virgül ile ayrılarak parantez içinde belirtilir. Filogramlar ölçekli ağaçlar olduğu için, uzaklık önemini vurgulamak için de sayılardan yararlanılır (Şekil 9) [7].

Filogenetik Analizde İzlenecek Adımlar

Gen seçimi ve gene ait özellikler

Karşılaştırma yapmak için analiz edilecek örnekler ait genomik ya da proteomik veriler (DNA, RNA ya da aminoasit dizileri) toplanır. Bu aşamada referans birimin (Örn; belirli genler) seçilmesinde dikkat edilmesi gereken noktalar vardır. Bazı diziler diğerlerinden birkaç noktayla öne çıkar ve filogenide daha kullanışlı hale gelir.

Ele alınacak dizi tüm organizmalarda yapı ve fonksiyonunu korumuş olmalıdır. Örneğin; 16S rRNA, ribozomal küçük alt birimin yapısına katılan 16S ribozomal RNA molekülünün sentezinde kalıp olarak kullanılarak, tüm hücrelerde aynı fonksiyonda bulunur. Aynı zamanda kompleks sekonder yapısını da koruduğundan filogenetik ağaçlandırmada sıklıkla tercih edilir. Ökaryotik hücrelerde ise fonksiyonel olmayan diziler yani intronlar, çok yakın akrabaların filogenetik analizini saptırdığı için kullanılmamaktadır.

Elde edilen sekans verisi, yeteri kadar varyasyon göstermesinin yanında kolay sıralamanın mümkün olabilmesi için benzer diziler de -homolog kalıntılar- içermelidir. Örneğin; 16S rRNA, diğer iki ribozomal RNA molekülü ve pek çok şaperon protein ile katlanmış kendine özgü bir kuaternar yapıya sahip olduğundan; yapısında tüm bakterilerde korunmuş dizileri bulundururken, yakın türler arasında bile değişebilen ve değişken bölgeler olarak bilinen dizileri de içerir. Bu da, hem dizileri benzerliklerine göre sıralamanın hem de farklılıklarına göre tür ye da başka bir taksonomik birim düzeyinde ayırt edebilmenin mümkün olmasını sağlar.

Soylar arası ilişkilendirmede kriter olabilmesi için ağaçlandırmada kullanılacak dizi, horizontal olarak aktarılmamalı yani yalnızca ata bireyden yeni nesle vertikal olarak aktarılmalıdır. Organizmalar arasında horizontal gen alışverişinin olması, onların evrimsel açıdan ata-soy ilişkisinde gösterilmesini engeller [7,24].

Seçilen genin karşılaştırılması için kullanılan veri tabanları

Seçilen sekans verisinin karşılaştırılması ve filogenetik ağaçlandırma için kullanılacak olan "referans diziler" çeşitli veri tabanları aracılığıyla elde edilir.

Amerikan Ulusal Kütüphanesinin bir parçası olarak oluşturulmuş NCBI (National Center for Biotechnology Information); yerel veritabanları, bilgisayar destekli araştırmalar, dizi analizi yapan yazılımlara odaklanmış bir kuruluştur. Yapısına BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), GenBank ve Pubmed gibi uygulamaları ekleyerek daha kapsamlı hale gelmiştir. INSDC'nin (International Nucleotide Sequence Databases) bir parçası olarak DNA dizilerini toplayan GenBank; DDBJ ve EMBL ile işbirliği içerisinde [13].

EMBL (European Molecular Biology Laboratory), Avrupa Birliği üyesi devletlerin bilimsel topluluklarına eğitim ve hizmet vermektedir. Avrupa'yı bir uçtan diğer uca kapsayan; ana laboratuvar, Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü (EMBL-EBI), yapısal biyoloji araştırmaları üzerine ve fare biyolojisi üzerine çalışan 5 enstitüden oluşturmaktadır [14].

DDBJ (DNA Data Bank of Japan), nükleotid dizi verilerini toplayarak; yaşam bilimleri araştırma aktivitelerine, süper bilgisayar sistemleri ve serbestçe kullanılabilir verileri ile destek sağlamaktadır [15].

PDB (Protein Data Bank), nükleik asitler ve proteinleri kapsayan biyolojik moleküllerin üç boyutlu yapılarını araştırmakta ve bunları toplamaktadır [13].

Genlerin analizi

Hizalama: Ele alınan dizileri karşılaştırmak için ilk olarak hizalama yapılır. Dizilerin hizalanması, filogenetik analiz sürecindeki en kritik adımdır. Çünkü evrimsel süreçte dizinin uygun pozisyonlarını saptamak, yalnızca doğru hizalama ile doğru filogenetik çıkarım elde edildiği için oldukça önemlidir. Yanlış hizalama, final ağacında sistematik hatalara ya da tamamen yanlış bir ağaca neden olmaktadır. Bu nedenle diziler doğru bir şekilde hizalanmalıdır. Genel olarak doğru bir hizalama, benzer kalıntıların eşleşmesini ve benzer fizikokimyasal özelliklere uymasını sağlamalıdır. Sekonder yapısal elementler bilinir ya da tahmin edilirse, bunlar hizalamaya rehberlik edebilir.

Manuel düzenleme, hizalama kalitesinin yükseltilmesinde önemlidir. Belirsiz hizalanmış bölgelerin, filogenetik analizin öncesinde kaldırılması gerekir. Hizalamanın hangi bölümünde bunların kaldırılacağını, araştırmacının taktığı belirler. Bu nedenle oldukça sübjektif bir süreçtir.

Bunlara ek olarak, hizalama hatalarının düzeltilmesini ve ilişkisiz ya da yüksek derecede bağımsız dizilerin ortadan kaldırılmasını sağlayarak hizalama kalitesinin iyileştirilmesinde önemli olan otomatik yaklaşımlar vardır. Çeşitli programlar ile doğru hizalanmış diziler, filogenetik analize hazır hale gelir [7].

Çoklu Yer Değiştirmeler: İki dizi arası farklılığın basit bir ölçümü, hizalamadaki yer değiştirmelerin sayılmasıyla belirlenir. İki dizi arasındaki gözlenen uzaklığı, bu yer değiştirme oranı belirler. Ancak gözlenen bu sayı, gerçek evrimsel olayları yansıtmayıp rastgele bir mutasyon ile oluşmuş olabilir. Çoklu yer değiştirmeler ve bireysel pozisyonlarda değişimler diziler arası evrimsel uzaklığın saptanmasını zorlaştırır. Bu etki "homoplazi" olarak bilinir ve yanlış homoplazi, yanlış filogenetik ağaç oluşturmaya neden olur. Doğru homoplazi, yani diziler arası uzaklığı evrimsel olarak doğru şekilde bulmak için çeşitli istatistiksel modellere ihtiyaç duyar.

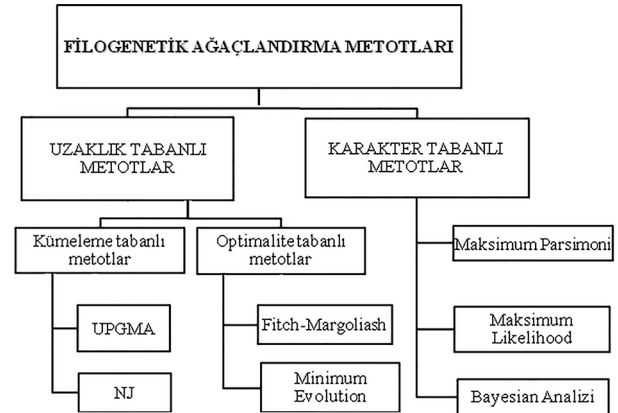
Yer Değiştirme Modellerinin Seçimi: Doğru homoplazi için, yer değiştirme modelleri veya evrimsel modeller olarak da bilinen istatistiksel modeller kullanılır. DNA filogenileri oluşturmak için, çok sayıda yer değiştirme modeli vardır. Bu modellerde, her bir nükleotid için uygulanan çoklu yer değiştirmeler yani mutasyonlar farklıdır. Birbirinden çok uzaklaşmış dizilerde, çok sayıda çoklu yer değiştirme tespit edilir. Yer değiştirme modelleri ile bu pozisyonlar doğru olarak saptanır. Bu, evrimsel uzaklığın istatistiksel metodun doğruluğuna bağlı olduğu anlamına gelir. Bu nedenle, yalnızca uygun diziler filogenetik ağaçlandırmada kullanılabilir [7].

Jukes-Cantor Modeli (JC Modeli): 1969 yılında oluşturulan ve tek parametrelili model olarak adlandırılan bu yer değiştirme modelinde; DNA dizilerinin, eşit olasılıkla birbirine dönüştüğü varsayılır. Bu nedenle eşit olasılıkla nükleotidlerin yerleştirilmesine dayanır. En basit nükleotid yer değiştirme modelidir. Evrimsel uzaklıkları kullanan bir formülle çalışır.

Kimura Modeli (K2P Modeli): 1980 yılında oluşturulan ve iki parametrelili model olarak adlandırılan bu yer değiştirme modelinde; DNA dizilerinin, transisyonlar ve transversiyonlar için farklı olasılıklarda birbirine dönüştüğünü yani yer değiştirdiğini varsayar. Bu nedenle daha karmaşık ama daha gerçekçi bir modeldir. Bu modele göre, transisyonlar transversiyonlardan daha sık meydana gelir ve bu da evrimsel uzaklıkların saptanmasında önemli bir kriterdir. Model, daha kapsamlı bir formüle dayanmaktadır [7,16].

Filogenetik Ağaçlandırma Metotları

Filogenetik ağaçlandırma metotları, dayandıkları esaslara göre "uzaklık tabanlı" ve "karakter tabanlı" olmak üzere ikiye ayrılırlar. Uzaklık tabanlı metotlar, taksonların aralarındaki uzaklıklara göre kümelendirilerek yerleştirilmesi ya da oluşturulan birden fazla ağaçtan optimal olanın seçilmesine göre kendi içerisinde ikiye ayrılırken; karakter tabanlı metotlar tek başlık altında toplanabilen metotlardır (Şekil 10).



Şekil 10. Filogenetik ağaçlandırma metotları

Uzaklık Tabanlı Metotlar

Tüm taksonların, aralarındaki uzaklıklar dikkate alınarak yerleştirildiği filogenetik ağaçlardır. Genetik uzaklık yöntemi, filogenetik ağacı oluşturmak için dizi grubunda her bir çift arasında değişikliklerin sayısını temel alır. Birbirlerine genetik uzaklığı en az olan türler birleştirilerek bir ağaç oluşturulur. Uzaklık metotları ile hizalanan diziler arasındaki farklılıkların miktarına göre ağaç oluşturulur [10]. Uzaklık metotları, diğer yöntemlerden daha kolay ve hızlıdır [3].

Kümeleme tabanlı metotlar (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average

(UPGMA): “Aritmetik Ortalama ile Ağırlıksız Çift Grup Metodu” olarak çevrilir. Kümelemenin en basit ve en hızlı metodudur. Köklü ağaçlar oluşturan ultrametrik (kökten tüm uçlara eşit uzunlukta dalları olan) bir ağaçlandırma bir metottur. Verileri uzaklık bakımından algoritmik olarak düzenleyerek taksonları kümeleyen bu metot, bu uzaklığı elde ederken bir formül kullanır [7]. En yakın iki taksonun gruplandırılmasından başlar. Artan uzaklık dikkate alınarak, tüm taksonları gruplamaya dayanır. Kademeli olarak uzaklık arttıkça taksonlar yeni gruplara girmeye ve birbirinden farklılaşmaya başlar [2]. Neighbor Joining (NJ) “Komşu Birleştirme Metodu” olarak çevrilen bu metot, 1987’de Saitou ve Nei tarafından önerilmiştir [11]. Verileri, genetik uzaklık bakımından kümeleyerek analiz eden bu kümelenme metodu, evrimsel saate dayandırılmadığı için köksüz ağaçlar oluşturulur. Köksüz filogenetik ağaç oluşturan en basit metottur [7].

Sonuç olarak algoritmik uzaklık metotları; optimal ağacı bulamaz çünkü alternatif ağaçlar oluşturamaz tek tip ağaç oluşturur, oluşturulan ağaçta her hangi bir dal değiştirilemez, hızlı ve kolay olduğu için başlangıç analizleri için kullanışlıdır. UPGMA köklü ve dal uzunlukları eşit ağaçlar oluşturan en hızlı ve basit yöntemken, bu metodun köksüz ve dal uzunlukları farklı ağaçlar oluşturan formatı ise Neighbor Joining metodudur [22].

Tablo 1. Kümeleme tabanlı metotların karşılaştırılması

	UPGMA	NJ
Esas	Uzaklık, kümeleme	Uzaklık, kümeleme
Ağaç sayısı	Tek	Tek
Formatı	Köklü, kladogram	Köksüz, filogram
Neden bu metot?	Başlangıç analizi yapılacaktır köklü basit bir ağaç elde etmek istenirse	Başlangıç analizi yapılacaktır köksüz basit bir ağaç elde etmek istenirse

Optimalite tabanlı metotlar: Özellikle geniş veri setleri kullanılarak filogenetik ağaçlandırma yapılacağına tercih edilen metotlardır. Bu nedenle kapsamlı ve daha yavaş bir hesaplama ile ayrıntılı araştırma gerektirir. Fitch-Margoliash ve Minimum Evolution olmak üzere iki temel metottan oluşur.

Fitch-Margoliash: Orijinal veri kümesi içinde uzaklıkları ve ağacın tüm dal uzaklıklarında minimum sapmaya dayanarak muhtemel ağaçlardan en iyisini seçer. İki taksonun rastgele bir düğüm noktasında kümelendirilmesiyle başlar ve uzaklıkları

tanımlamak için eşitlikler oluşturur. Kümelenen iki takson, yeni bir matris oluşturmaya yardım eder. Bu işlem, ağaç tamamlanıncaya kadar devam eder. Tüm ağaç topolojilerini araştırır ve gerçek uzaklıklardan en küçük sapmayla dal uzunluklarını hesaplar.

Minimum Evolution: Minimum Evrim yöntemi, benzer bir prosedür ile ağaç oluşturur ama muhtemel ağaçlar arasından en uygun olanı seçerken farklı bir optimalite kriteri kullanır. Farklı dal uzunluğunu bulurken kullandığı cebirsel eşitliğe dayanır [19].

Sonuç olarak Fitch-Margoliash ve Minimum evolution metodu, farklı aritmetiklerle uzaklığa dayalı birden fazla ağaç oluşturan optimalite metotlarıdır.

Tablo 2. Optimalite tabanlı metotların karşılaştırılması,

	Fitch-Margoliash	Minimum evolution
Esas	Uzaklık, optimalite	Uzaklık, optimalite
Ağaç sayısı	Çok	Çok
Formatı	İlaveli	İlaveli
Neden bu metot?	Daha geniş veri setlerinde, daha yavaş bir hesaplama	Daha geniş veri setlerinde, daha yavaş bir hesaplama
Farkları		Cebirsel eşitlik

Karakter Dayalı Metotlar

Karakter dayalı metotlar, daha karmaşık olduğu için daha fazla emek ve zaman isteyen metotlardır. Bunlar Maksimum parsimoni (MP), Maksimum likelihood (ML) ve Bayesian analizidir.

Maksimum Parsimoni: Bir gözlemin en az karmaşık olarak açıklanması “parsimoni” şeklinde tanımlanır. Bu nedenle bu ağaçlandırma yöntemi de incelenen diziler ile uyumlu bir ağaç elde etmek için gerekli en az mutasyonların saptanmasını esas alır. Başka bir deyişle “tutumluluk” olarak tanımlanabilir yani, biyolojik değişim süreci boyunca karmaşıklık yerine basit bir açıklama yaparak verilerin yorumlanmasıdır. MP yöntemi uygulanırken, dizi pozisyonlarının farklı puanlamaları tercih edilebilir. Örneğin; korunmuş bölgede gerçekleşen bazı mutasyonlar, değişken bölgedeki mutasyonlardan daha çok vurgulanmak istenebilir. Ya da transversiyonlar transisyonlardan daha önemli olarak vurgulanabilir. MP ile ağaçların oluşturulmasında ‘kesin’ ve ‘tahmini’ yaklaşımlar söz konusu olmaktadır. Çok zaman alıcıdır ve çok sayıda örnek ele alındığında kullanıma uygun değildir [3].

Maksimum Likelihood: Joseph Felsenstein tarafından 1981 yılında MP'ye alternatif olarak ortaya konulmuş bir yöntemdir [4]. Birçok olası ağaç içerisinde en iyi ağacı seçmede istatistiksel testler kullanma olanağı ortaya konmuştur. Bu nedenle, maksimum likelihood metodu, her ağaç topolojisini değerlendirir veya gözlenen verinin oluşturulması olasılığını hesaplar. Eğer ağaç doğruysa her dalın oluşturulma olasılıkları toplamı, gözlenen verinin oluşturulması olasılığını temsil eder. Bu olasılık, ağaçların olasılığı olarak kabul edilir. [3].

Bayesian Analizi: İngiliz istatistikçi Thomas Bayes (1702-1761) tarafından oluşturulduğu için

“Bayes Teoremi” olarak da bilinmektedir. Olasılık kuramı içinde incelenir ve bütün istatistikçiler için kabul edilir bir ilişkiyi açıklar. Bu teorem bir rasal (rastgele) değişken için olasılık dağılımı içinde koşullu olasılıklar ile arasındaki ilişkiyi gösterir. Olasılık teorisi içinde incelenen bir olay olarak B olayına, koşullu bir A olayı (yani B olayı bilindiği durumdaki A olayı) için olasılık değeri; A olayına koşullu olarak B olayı (yani A olayı bilindiği durumdaki B olayı) için olasılık değerinden farklıdır. Ayrıca Bayes teoremi, olasılık değeri hakkındaki subjektif inanışların güncelleştirilip değiştirilmesini sağlayan temel bir gereçtir [17].

Tablo 3. Karakter tabanlı metodların karşılaştırılması

	Maksimum Parsimoni	Minimum Evolution	Bayesian Analizi
Esası	Karakter	Karakter	Karakter
Ağaç sayısı	Çok	Çok	Çok
Formatı	İlaveli	İlaveli	İlaveli
Neden bu metod?	Puanlama ile vurgulanmak istenen nokta öne çıkarılır	Ağaçtaki her dalın olasılığı görülür.	Daha geniş veri setlerinde objektivite maksimum

Filogenetik Ağaç Doğruluk Ölçümü

Filogenetik ağaç oluşturduktan sonraki adım, istatistiksel olarak filogeninin güvenilirliğini değerlendirmektir. Bu amaca hizmet eden çeşitli analizler mevcuttur. En çok kullanılan “Bootstrapping”, bilgisayar tabanlı tekniklerin doğruluklarını yansıtan istatistiksel bir değer bulmaya yarayan bir analiz olarak tanımlanır. Bootstrap, elde edilen ağaçların dalları üzerinden parsimoni kriterini kullanarak istatistiksel yönden en güvenilir olan dalları belirlemede kullanılır [5]. Bootstrap değeri %0 ile %100 arasında değişir. Kress ve arkadaşlarının karakterize ettiği bootstrap destek değerlerine göre, %85’den büyükse çok güçlü, %70-85 arası güçlü, %50-70 arası zayıf ve %50’den küçükse çok zayıf şekilde tanımlanmıştır. Bootstrap desteğinin %70 ya da daha büyük oluşu genellikle doğru filogeninin tanımlanması ile ilişkilendirilir. Eğer belli bir dal için bootstrap desteği % 50’nin altında ise, dalı oluşturulan taksonların birbiriyle doğru olarak ilişkilendirilemediği düşünülür [8].

Kaynaklar

1. Woese C.R, Stackebrandt E, Macke T.J, Fox G.E. (1985). *A Phylogenetic Definition of the Major Eubacterial Taxa*. *System. Appl. Microbiol* 6: 143-151.
2. Morrison David A. (1996). *Phylogenetic Tree-building*. *International Journal for Parasitology*, Vol 26, No 6.
3. Freeman S, Herron J. C. (1999). *Evrimsel Analiz*. Çıplak, B, Başbüyük H, Karaytuğ, S, Gündüz, İ. (eds). Palme Yayıncılık. Ankara. 28-29: 438-708.
4. Felsenstein J. (1987). *Estimation of hominoid phylogeny from a DNA hybridization data set*. *Molecular Evolution*. 26: 123-31.
5. Felsenstein J. (1985). *“Confidence Limits on Phylogenies: an Approach using the Bootstrap”*, *Evolution*. 39: 783-791.

6. Singh Gautam B. (2015). *Fundamentals of Bioinformatics and Computational Biology, Methods and Exercises in MATLAB*. Vol 6: 235-270.
7. Xiong Jin. (2006). *Essential Bioinformatics*: 127-169
8. Kress W.J. (2005). *“The Molecular Phylogeny of Alpinia (Zingiberaceae): A Complex and Polyphyletic Genus of Gingers”*, *American Journal of Botany*. 92/1: 167-178.
9. Podsiadlo L., Polz-Dacewicz M. (2013). *Molecular evolution and phylogenetic implications in clinical research*. *Annals of agricultural and Environmental Medicine*. Vol 20.No 3: 455-459.
10. Mount D.W. (2001). *Bioinformatics Cold Spring Harbor Laboratory Press*. *Cold Spring Harbor, New York*. Chapter 3. *Alignment of pairs of sequences*: 52-137.
11. Saitou N, Nei M. (1987). *The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees*. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406- 425.
12. Onursal Sila Suzan, Uğur Avni. (1997). *Böceklerin Filogenisi*. *Türk.entomol.derg*. 21(1): 65-80.
13. Anonim. (2015). *RCSB Protein Data Bank*. Erişim adresi: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, Erişim tarihi: 30.05.2015.
14. Anonim. (2015). *European Molecular Biology Laboratory*. Erişim adresi: <http://www.embl.org/>, Erişim tarihi: 30.05.2015
15. Anonim. (2015). *DNA Data Bank of Japan*. Erişim adresi: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>, Erişim tarihi: 30.05.2015
16. Anonim. (2015). *Distance Methods*. Erişim adresi: <http://www.cs.rice.edu/~nakhleh/COMP571/Slides/Phylogenetics-DistanceMethods.pdf>, Erişim tarihi: 03.06.2015.
17. Anonim. (2015). *Bayes Teoremi*. Erişim adresi: http://tr.wikipedia.org/wiki/Bayes_teoremi, Erişim tarihi: 07.06.2015
18. Anonim. (2015). *Tree of Life*. Erişim adresi: http://en.wikipedia.org/wiki/Tree_of_life_%28biology%29, Erişim tarihi: 04.06.2015.
19. Anonim. (2015). *Phylogenetic Fundamentals*. Erişim adresi: <http://artedi.ebc.uu.se/course/X3-2004/Phylogeny/Phylogeny-Criteria/Phylogeny-Criteria.html>, Erişim tarihi: 27.05.2015.
20. Anonim. (2015). *Taksonomi*. Erişim adresi: <http://tr.wikipedia.org/wiki/Taksonomi>, Erişim tarihi: 04.06.2015.
21. Anonim. (2015). *Molecular Clock*. Erişim adresi: http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_clock, Erişim tarihi: 04.06.2015.
22. Anonim. (2015). *Model Based Distance Methods*. Erişim adresi: <http://www.life.umd.edu/labs/delwiche/MSyst/lec/Distance1.html>, Erişim tarihi: 06.06.2015.
23. Anonim. (2015). *Dendrogram*. Erişim adresi: <http://en.wikipedia.org/wiki/Dendrogram>, Erişim tarihi: 02.06.2015.
24. Anonim. (2015). *Molecular phylogenetic analysis using ribosomal RNA (rRNA)*. Erişim adresi: http://eebweb.arizona.edu/blast/rna_lecture.pdf, Erişim tarihi: 06.06.2015.
25. Anonim. (2015) Erişim adresi: http://www.cs.rice.edu/~nakhleh/COMP571/Slides/Phylogenetics_BuildingPhyloTrees.pdf Erişim Tarihi: 03.06.2015.