

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**

**BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ  
TEMEL BİYOTEKNOLOJİ DOKTORA TEZİ**

**HÜCRE KÜLTÜRÜ PASAJLARININ PPR VİRUS P GENİ  
DÜZEYİNDE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI VE  
TANISAL AMAÇLI GERÇEK ZAMANLI REVERZ  
TRANSKRİPTAZ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU  
(rtRT-PZR) PROTOKOLLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

**ENDER DİNÇER**

**Danışman Öğretim Üyesi**

**Prof.Dr.Aykut ÖZKUL**

**ANKARA - 2010**

## ÖZET

### **Hücre Kültürü Pasajlarının PPR Virus P Geni Düzeyinde Etkisinin Araştırılması ve Tanısal Amaçlı Gerçek Zamanlı Reverz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (rtRT-PZR) Protokollerinin Geliştirilmesi**

Peste Des Petits Ruminants (PPR), paramyxoviridae ailesinde, morbillivirus alt grubunda yer alan, hayvansal gıda üretiminin önemli bir bileşeni olan küçük ruminantların Asya ve Afrika' da artan öneme sahip, yüksek enfeksiyöz ve bulaşıcı karakterde hızlı yayılım gösteren önemli viral bir hastalıdır. Hastalık çoğu gelişmekte olan Asya ve Afrika ülkelerinde endemiktir ve % 90'a varan mortalite oranı ile seyreden salgınlar oluşturmaktadır. Etkenin teşhisine yönelik farklı serolojik ve moleküler teknikler zaman içinde önemli ilerlemeler kaydetmiştir. Etkenin en kısa zamanda ve en yüksek doğrulukta ortaya konması için geliştirilen en önemli tekniklerden biri 'gerçek zamanlı' PZR sistemidir.

Çalışmamızda kullanılan primer ve prob tasarımları tamamen 2001 yılında Türkiye'de izole edilen ve genom sekansı gen bankasına girilen PPRV/TU00 izolatu üzerinden yapıldı. PPRV'e ait olan N, P, L ve M gen bölgelerine spesifik primer – prob tasarımlarını kullanarak tek adımda viral RNA'nın kantitatif olarak tesbitinin gerçekleştirilmesi amaçlandı. Buna yönelik olarak, anabilim dalımıza farklı zamanlarda ulaşan ve konvansiyonel RT-PZR testi ile pozitif bulunmuş olan 45 adet koyun ve keçiye ait kan, serum ve organ numuneleri kullanıldı. PPRV RNA'sının kantitasyonu için in vitro transkripsiyon ve enfektif partikül sayısı bilinen virus sulandırılmaları kullanıldı. Plasmidlerden cRNA eldesi sırasında yaşanan sorundan dolayı titresi bilinen virus RNA 'sının bilinen miktarda oluşturulan örneklerin döngü eşik değerlerine karşılık başlangıçtaki kopyalarının logaritmik konsantrasyonlarının olduğu standart doğrular oluşturuldu. Yapılan denemelerde L gen bölgesine spesifik primer – prob dizaynları ile L geni için  $1,65 \times 10^1$ , P geni için 5,88 , M geni için  $1,01 \times 10^1$  ve N geni için  $1,73 \times 10^3$  kopya/ml'ye kadar saptanabildiği gözlemlendi.

Bununla beraber hastalığın çok ciddi sıkıntılar oluşturması uygun, etkin, sorunsuz aşı geliştirilmesine yönelik çalışmaların artmasına yol açmıştır. Çalışmamızın ikinci ayağı olarak virusun hücre kültürlerinde pasajlanması sonucu PZR ile çoğaltmış olduğumuz P geninde meydana gelen değişimlerin dizin analizi metodu yardımıyla incelenmesi ve tesbiti gerçekleştirildi. Ancak dizinler arasında değişimler gözlenmedi ve dizinlerin stabil oldukları tesbit edildi.

**Anahtar kelimeler:** PPRV, 'real time' RT-PZR, Dizin analizi, P gen.

## ABSTRACT

### **The Investigation of The Effects of Cell Culture Passages on The PPR Virus P Gene and Development of Realtime Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (rtRT – PCR) Methods for Diagnostic Purposes**

Peste Des Petits Ruminants (PPR) also known as sheep plague, caused by an agent belongs to morbillivirus genus of paramyxoviridae family, is a significant infectious, contagious, fast-spreading disease of the small ruminants which are the important source of livestock, with an increasing importance in Asia and Africa. The disease has an endemic course and outbreaks with 90% mortality rate can occur in most of the developing countries of Asia and Africa. There has been a significant progress in serological and molecular techniques for the diagnosis of the agent. One of the most considerable techniques which were developed to diagnose the agent in the shortest time period and also with the highest accuracy is Real time PCR. This is a rapid system to quantify the amplified products with a high sensitivity and certainty.

The primers and probs used in this study were designed on the genome of the isolate PPRV/TU00 which was isolated in 2001 in Turkey and submitted on gene bank. We aimed the one step quantitative determination of viral RNA by using the primer and probs specific for N, P, L and M genes of PPRV. For this purpose blood, sera and tissue (organ) samples belong to 45 sheep and goat which were received by our department and found to be positive by using PCR were used. For quantitation of RNA of PPRV; each gene region was cloned into plasmids. Also dilutions of a virus of known titer was used for quantitation incase of the problems which can occur at this stage. Trials have showed that it is possible to detect with L gene specific primers and prob designs; for L gene;  $1, 65 \times 10^1$ , for P gene; 5, 88 , for M gene;  $1, 01 \times 10^1$  and for N gene;  $1, 73 \times 10^3$  copy/ml. Due to the problem took place during cRNA acquisition from plasmids standard curves were created which have cycling threshold values of known amount of RNA samples from the virus of known titer correlative to logarithmic concentrations of starting copies. In addition because of the severity of the disease, the number of the studies, on developing suitable, efficient, trouble-free vaccines has increased.

At the second stage of our study the changes on P gene as a result of passaging the virus in cell cultures which was amplified by PCR were examined by sequence analysis method. However no changes were observed amongst sequences and it was decided that the sequences are stable.

**Anahtar kelimeler:** Peste des petits ruminants virus, PPRV RNA, ‘ real time’ PCR, Sequence analyzing.

## **İÇİNDEKİLER**

ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	v
ÖNSÖZ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ	ix
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1. PPR Etiyoloji	2
1.1.1.Yapısal Proteinler	3
1.1.2.Yapısal Olmayan Proteinler	5
1.1.3.Viral Replikasyon	5
1.2. Epidemiyoloji	8
1.3. Klinik Bulgular	8
1.4. Patogenez	9
1.5. Enfeksiyonun Tanısı	9
1.5.1.Virus İzolasyonu	9
1.5.2.Virus Antijenlerinin Tespiti	10
1.5.3.Viral RNA Tespiti	10
1.6. Koruma ve Kontrol	11
1.7. Amaç	12
<b>2. MATERYAL ve YÖNTEM</b>	13
<b>2.1. Materyal</b>	13
2.1.1. Hücre Kültürü	13
2.1.2. Virus	13
2.1.3. Tanısal Örnekler	13
2.1.4. Kimyasal ve Biyolojik Maddeler	15
2.1.5. Kullanılan Kitler	15
2.1.6. Kullanılan Cihazlar	15
<b>2.2. Yöntem</b>	16
2.2.1. Konvansiyonel Viroloji	16
2.2.1.1. PPR Virusun Üretilmesi	16
2.2.1.2 Plak Titrasyon ile Enfeksiyozite Tayini	16
2.2.1.3.Dizin Analizi İçin Hücre Kültürü Pasajları	17
2.2.2. Moleküler Viroloji ve Tanı	17
2.2.2.1.Viral RNA İzolasyonu	17
2.2.3. Kullanılan Primer ve Problar	18
2.2.3.1.Real Time RT – PZR için Tasarlanan Oligonükleotidler	20
2.2.3.2. P Gen Bölgesi Sekansı İçin Tasarlanan Oligonükleotidler	20
2.2.4. P Gen Bölgesi Dizin Analizi	20
2.2.4.1. Ters Transkripsiyon Reaksiyonu	20
2.2.4.2. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi	21
2.2.4.3. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması	22
2.2.4.4. Dizi Analizi	22
2.2.5. PPR Virus Kantitasyonu Amacıyla İn Vitro Transkripsiyon Standart Oluşturulması	23
2.2.5.1. Hedef Genlerin Amplifikasyonu	23

2.2.5.2. PZR ile çoğaltılan Bölgele rin pGEM -T Vektörlerine Klonlanması	24
2.2.5.3. Transformasyon	25
2.2.5.4. Plasmid İzolasyonu ve Klonların Analizi	25
2.2.5.5. Plazmidlerin Jelde Görüntülenmesi	26
2.2.5.6. PZR Ü rünü İçeren Kolonilerin Dondurulması	26
2.2.5.7. Plasmid DNA Dizin Analizi	26
2.2.5.8. Plasmid DNA Miktarının Hesaplanması	27
2.2.5.9. İn Vitro Transkripsiyon	28
2.2.6. PPR Virus RNA ‘ sının ‘ Real Time ‘ RT – PZR ile Gösterilmesi	28
2.2.6.1. QuantiTect (Qiagen, Almanya) Probe RT – PCR Kit	29
<b>3. ARAŞTIRMA BULGULARI</b>	31
3.1. Konvansiyonel Viroloji	31
3.1.1. PPR Virus Seri Pasajları	31
3.1.2. Enfektivite Tespiti	31
3.2. Moleküler Viroloji ve Tanı	32
3.2.1. Pasaj Viruslarına P Gen Dizin Analizi	32
3.2.2. QuantiTect Probe RT – PCR Kit	36
3.2.2.1. L Gen Bölgesinin ‘ Real Time ‘ RT - PZR ile Tespiti	36
3.2.2.2. P Gen Bölgesinin ‘ Real Time ‘ RT - PZR ile Tespiti	42
3.2.2.3. M Gen Bölgesinin ‘ Real Time ‘ RT - PZR ile Tespiti	45
3.2.2.4. N Gen Bölgesinin ‘ Real Time ‘ RT - PZR ile Tespiti	48
3.2.3. ‘ Real Time ’ RT-PZR ‘ nin Tanısal Niteliği	51
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	52
<b>KAYNAKLAR</b>	59
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	65

## ÖNSÖZ

Küçük ruminantların vebası (PPR), koyun ve keçilerde yüksek oranlarda ölüme neden olan viral bir hastalıktır. PPR özellikle ekonomisi hayvancılık temeline dayanan ülkelerde, çok büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

İlk olarak Batı Afrika' da 1942 yılında tanımlanan hasatalık, buradan subtropikal Afrika' ya, Arap Yarımadası'na, Ortadoğu ve Güneydoğu Asya' ya yayılmıştır. Ülkemizde ise 1990' lı yıllarda başlayan ve büyük salgınlara neden olan sığır vebası mücadelesi tamamlanmadan 1996 yılında resmi olmayan ilk vaka bildirilmiştir.

Ülkemiz ve bulunduğu coğrafyada çok ciddi ekonomik kayıplara yol açan etkene yönelik aşı çalışmaları ve etkenin hızlı ve güvenilir bir teknik ile ortaya konması son derece önemlidir. Sonuç olarak çalışmamızda; vero hücrelerinde yapılan seri pasajlar sonunda virus P gen bölgesinde meydana gelebilecek atenüasyondan sorumlu mutasyonların tespiti ve çalışmanın devamı olarak buradan hareketle, aşı suşu olabilecek viruslerin üretimini amaçladık. Etkenin hızlı ve güvenilir bir teknikle tanısına yönelik 'real time' RT – PCR tekniklerinin geliştirilmesi diğer önemli çalışma hedefimiz oldu.

Bu çalışma süresince yardımlarını esirgemeyen ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı' nın tüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan başta Sayın Prof.Dr. İbrahim BURGU ve anabilim dalının tüm öğretim üyelerine, doktoram boyunca bilgi ve beceri yönünde gelişmemde ve çalışmalarımnda çok büyük katkıları olan danışmanım sayın Prof.Dr. Aykut Özkul'a, tez izleme komitesi çalışmalarında olumlu yönlendirmeleri ile katkıda bulunan Sayın Prof.Dr. Mithat BOZDAYI ve Prof.Dr. K. Serdar DİKER 'e, dayanışma içinde görev yaptığım araştırma görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma, tez çalışmama büyük katkıları bulunan, destek ve anlayışları için aileme, en içten teşekkürlerimi sunarım.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Morbillivirus Partikülü	3
Şekil 1.2 Morbillivirus Replikasyonu	6
Şekil 3.1 PPRV'nün Vero hücresinde oluşturduğu CPE.	31
Şekil 3.2 Pasaj sayılarına göre virus enfektivitesindeki değişim	32
Şekil 3.3 PPRV/TU00'ın Vero hücre kültüründe yapılan pasajlarına ait P gen dizinlerinin çoklu karşılaştırması (multiple alignment).	33
Şekil 3.4 PPRV/TU00'ın Vero hücre kültüründe yapılan pasajlarına ait P gen amino asit dizinlerinin çoklu karşılaştırması (multiple alignment).	35
Şekil 3.5 PPRV RNA'sının Rotor gene 6000 Corbett 'real time' PZR sisteminde QP - RT-PZR kit ile standart oluşturulması (Her sulandırma iki kez çalışıldı. PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol. $10^1$ - $10^6$ : sulandırmalar)	38
Şekil 3.6 PPR RNA 'sı yönünden pozitif olan P85 için standart eğri	39
Şekil 3.7 Saha örneklerinin Rotor gene 6000 corbett 'real time 'PZR sisteminde Lgen bölgesi için QP - RT - PZR kit ile çoğaltılması (PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol).	40
Şekil 3.8 L gen bölgesine ait standart eğri ve saha örneklerini doğrusal düzlemde yerleşimi	40
Şekil 3.9 Saha örneklerine ait PPRV RNA'larının L gen bölgesi için yapılan 'real time ' PZR ürünlerinin % 1.5 'luk agaroz jelde görüntülenmesi (M: DNA Merdiveni, N:Negatif kontrol).	42
Şekil 3.10 PPR RNA 'nın Rotor gene 6000 corbett ' real time ' PZR sisteminde P gen bölgesi için QP - RT - PZR kit ile çoğaltılması (PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol).	43
Şekil 3.11 P gen bölgesine ait standart eğri ve saha örneklerini doğrusal düzlemde yerleşimi.	43
Şekil 3.12 Saha örneklerine ait PPRV RNA'larının P gen bölgesi için yapılan ' real time ' PZR ürünlerinin % 1.5 agaroz jelde görüntülenmesi (M: DNA Merdiveni; N: Negatif kontrol)	45
Şekil 3.13 PPR RNA'nın Rotor gene 6000 corbett ' real time ' PZR sisteminde M gen bölgesi için QP - RT - PZR kit ile çoğaltılması (PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol).	46
Şekil 3.14 M gen bölgesine ait standart eğri ve saha örneklerini doğrusal düzlemde yerleşimi.	46
Şekil 3.15 Saha örneklerine ait PPRV RNA 'larının M gen bölgesi için yapılan ' real time ' PZR ürünlerinin % 1.5 'luk agaroz jelde görüntülenmesi (M: Merdiven ).	48
Şekil 3.16 PPR RNA 'nın Rotor gene 6000 corbett ' real time ' PZR sisteminde N gen bölgesi için QP - RT - PZR kit ile çoğaltılması (PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol).	49
Şekil 3.17 N gen bölgesine ait standart eğri ve saha örneklerini doğrusal düzlemde yerleşimi.	49
Şekil 3.18 Saha örneklerine ait PPRV RNA'larının N gen bölgesi için yapılan ' real time ' PZR ürünlerinin % 1.5 'luk agaroz jelde görüntülenmesi (M: DNA Merdiveni, N: Negatif kontrol).	51
Şekil 3.18 Dört gen düzeyinde yapılan ' real time ' RT-PZR ile PPRV RNA'sının tespit oranları.	51

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1</b> Tezde kullanılan PPRV yönünden pozitif örneklerin orjinl ve hayvan türü bazında dağılımları	14
<b>Çizelge 2.2</b> Çalışmada kullanılan primer ve prob dizinleri	19
<b>Çizelge 2.3</b> Dizin analizinde kullanılan primerler ve genom lokalizasyonları	20
<b>Çizelge 2.4</b> Çalışmada kullanılan PCR mik s bileşenleri ve programı.	21
<b>Çizelge 2.5</b> Dizi analizi için uygulanan reaksiyon bileşenleri ve program	23
<b>Çizelge 2.6</b> Plasmidler için uygulanan dizi analizi reaksiyon bileşenleri ve programı	27
<b>Çizelge 2.7</b> QuantiTect Probe RT – PCR Kit ile hazırlanan karışım	29
<b>Çizelge 2.8</b> QuantiTect Probe RT – PCR Kit ile L gen bölgesi için sıcaklık döğüleri ve süreleri	29
<b>Çizelge 2.9</b> QuantiTect Probe RT – PCR Kit ile M gen bölgesi için sıcaklık döğüleri ve süreleri	30
<b>Çizelge 2.10</b> QuantiTect Probe RT – PCR Kit ile P gen bölgesi için sıcaklık döğüleri ve süreleri	30
<b>Çizelge 2.11</b> QuantiTect Probe RT – PCR Kit ile N gen bölgesi için sıcaklık döğüleri ve süreleri	30
<b>Çizelge 3.1</b> Rotorgene 6000 Corbett ‘ real time’ PZR sisteminde hesaplanan deney içi varyasyon değeri (Ct: Döngü eşik değeri, SD: standart sapma, CV: Varyasyon katsayısı).	37
<b>Çizelge 3.2</b> Rotorgene 6000 Corbett ‘ real time ‘ PZR sisteminde hesaplanan deneyler arası varyasyon değeri (Ct: Döngü eşik değeri; SD standart sapma; CV: Varyasyon katsayısı).	38
<b>Çizelge 3.3</b> PPRV’e ait olan sulandırmaların CT ( eşik değeri ) dağılımı ve kopya sayıları	39
<b>Çizelge 3.4</b> L gen düzeyinde rtRT-PZR ile PPRV yönünden sorgulanan saha örneklerin Ct ( eşik değeri ) ve kopya sayılarının dağılımı	41
<b>Çizelge 3.5</b> P gen düzeyinde rtRT-PZR ile PPRV yönünden sorgulanan saha örneklerinin Ct değeri ve kopya sayılarının dağılımı	44
<b>Çizelge 3.6</b> M gen düzeyinde rtRT-PZR ile PPRV yönünden sorgulanan saha örneklerinin Ct ( eşik değeri ) ve kopya sayılarının dağılımı	47
<b>Çizelge 4.7</b> N gen düzeyinde rtRT-PZR ile PPRV yönünden sorgulanan saha örneklerinin Ct ( eşik değeri ) ve kopya sayılarının dağılımı	50



## SİMGELER DİZİNİ

AGID	Agar Jel İmmunodifüzyon
Bç	Baz Çifti
BHK -21	Baby Hamster Kidney -21
°C	Santigrat Derece
cDNA	Komplementer DNA
CT	Cycle threshold (Döngü eşik değeri )
dNTP	DeoksiNükleotidTriPhosphate
EDTA	Etilen Daimin Tetra – Asetik Asit
ELİSA	İmmuncapture Enzyme Linked İmmunosorbent Assay
H	Hemaglütinasyon
HI	Hemaglütinasyon İnhibisyon
IFAT	İndirekt Florasan Antikor Tekniği
IP	İmmun Peroksidaz
Kb	Kilo Baz
Kda	Kilo Dalton
MDBK	Madine - Darby Bovine Kidney
µl	Mikrolitre
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
RDRP	RNA Bağımlı RNA Polimeraz
PPR	Peste Des Petits Ruminants (Küçük Ruminant vebası)
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
r	Korelasyon Katsayısı
RNP	Ribonükleoprotein
RT – PZR	Ters Transkripsiyon – Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Vero	African Green Monkey Kidney

## 1.GİRİŞ

Koyun vebası olarak da bilinen Peste des Petits Ruminants (PPR), hayvansal gıda üretiminin önemli bir bileşeni olan küçük ruminantların Asya ve Afrika’ da artan öneme sahip, yüksek enfeksiyöz ve bulaşıcı karakterde hızlı yayılım gösteren viral bir hastalıdır. Ani atak halinde gözlenen depresyon, ateş, göz ve burun akıntısı, ağızda duyarlılık, güç solunum, öksürük, pis kokulu ishal ve ölüm ile karakterizedir. PPR enfeksiyonu, pseudorinderpest, keçilerin enteritis ve erozyonlu stomatitis, pnömoenteritis kompleks gibi sinonim adlarla da tanımlanır (Braide, 1981; Scott, 1990).

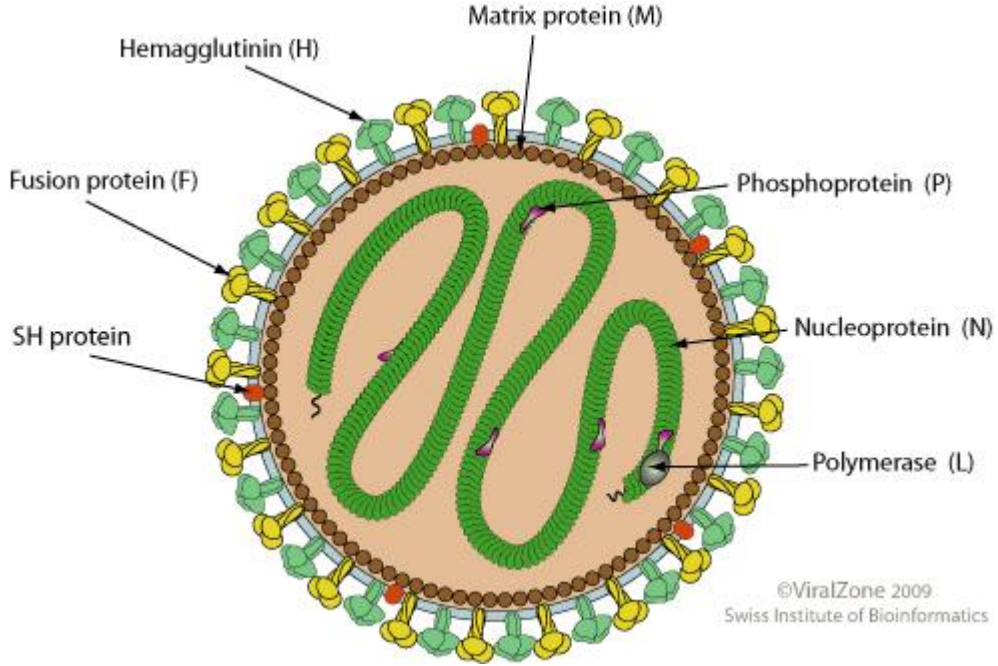
PPR enfeksiyonu ilk defa 1942 yılında Batı Afrika ‘da Cote d’Ivoire ‘de (Fildişi sahilleri) tanımlanmıştır (Gargadennec ve Lalanne, 1942). Scott (1990) ve Taylor (1984) küçük ruminant vebasının 1959 yılında Mornet ve ark. tarafından tekrar tanımlandığını, serolojik olarak sığır vebası virusü ile yakınlığı olduğu, hastalığın klinik bulgular ve patolojik değişiklikler yönünden de sığır vebasına benzediği, bu virusun aslında keçilerde, arasırada koyunlara uyum sağlamış sığır vebası virusu olduğunu bildirmiştir. Hastalık ekvatorun kuzeyinde Batı Afrika’da yıllarca varlığını sürdürmüştür. 1972 yılında Sudan’da keçilerde görülen ve sığır vebası tanısı konulan enfeksiyonun PPR olduğunun ortaya konulmasıyla, enfeksiyonun batıdan Afrika’nın doğusuna yayıldığı belirlenmiştir (Taylor ve Abegunde, 1977; Diallo, 1988). Daha sonra enfeksiyon Doğu Afrika’dan Orta Doğu ülkeri ve Güney Asya’da Bangladeş ‘e kadar uzanan geniş bir coğrafyaya yayılmıştır (Taylor, 1984; Diallo 1988; Shaila ve ark., 1996).

Türkiye’ de PPR enfeksiyonunun varlığı resmi olarak 1999’ da açıklansa da (OIE, 1999) ülkede virus varlığı daha önceki raporlarda bildirilmiştir (Alçıgır ve ark., 1996; Tatar, 1999). Kullanılan moleküler epidemiyolojik teknikler ile komşu ülkelerde aktif olarak sirküle olan PPRV enfeksiyonunun çapraz – sınır geçişini gösteren çok ciddi bilgiler saptanmıştır. İzole edilen PPR virusları 4. genetik soya ait olup, bu grup Güney Asya, Arabistan yarımadası ve Ortadoğu’dan orjin alan virusları kapsamaktadır (Murphy ve ark., 1999) .

## 1.1 PPRV Etiyolojisi

PPR virusu, çok uzun bir süre sığır vebası virusunun küçük ruminantlara adapte olmuş bir suşu olarak kabul edilmiştir. Ancak yapılan çapraz nötralizasyon ve elektron mikroskopik çalışmalarda PPRV' nin fizikokimyasal özellikler yönünden sığır vebası virusundan farklı bir virus olduğu, biyolojik ve antijenik özellikleri yönünden ise sığır vebası virusu ve morbillivirus genusuna dahil 5 virus ile (canine distemper virus, measles virus, dolphin distemper virusu, phocine (seal) distemper virusu ve porpoise distemper virus) yakınlığı olduğu belirlenmiştir (Gibbs ve ark., 1979; Barrett ve ark., 1995; Murphy ve ark., 1995; Barrett, 1999).

Paramyxoviridae familyasının morbillivirus genusu içinde yer alan PPRV' ü linear, negatif polariteli, tek iplikçikli, segmentsiz RNA içerir ve replikasyonları stoplazmada gerçekleşir. Viral genom 15948 nt büyüklüğündedir (Bailey ve ark., 2005). Nükleokapsid helikal simetrik yapıdadır. Lipid yapıda olan virus zarfı konakçı hücre membranından köken alır. Pleomorfik yapıda olan virusun büyüklüğü 150 – 350 nm arasında değişmektedir. Bazen filamentöz formlarıda görülebilir. Virüs zarfı içine gömülü şekilde 8-12 nm uzunluğunda glikoprotein yapıda peplomerlere sahiptir (Gibbs ve ark., 1979; Scott ark.,1990; Pastoret ve ark., 1991; Barrett ve ark., 1993; Chandran ve ark ., 1995b; Murphy ve ark., 1995; Barrett 1999; Lamb ve Kalakofsky, 2001). Virus altı yapısal ve iki yapısal olmayan, toplam sekiz protein içermektedir. Proteinler biyolojik fonksiyonları ve özelliklerine göre 2 gruba ayrılır. Birinci grupta viral yapı proteinlerini oluşturan (N, P ve L) internal polypeptid kompleks yer alır. Viral genom ile birlikte nükleokapsidi oluşturur. İkinci grupta virus zarf proteinleri (M, F ve H) yer alır. N, M, F ve L virusun en iyi korunmuş proteinleridir (Rima,1983; Abraham, 2005). Şekil 1.1 'de enfektif bir morbillivirus partikülü sunulmuştur.



**Şekil 1.1.** Morbillivirus partikülü ([http:// www.expasy.org./ viral zone/all\\_ by\\_ species/556.html](http://www.expasy.org/viralzone/all_by_species/556.html)).

### 1.1.1 Yapısal proteinler

**Nükleoprotein (N) :** Viral nükleik asidi saran N proteini viral genomun şekillenmesinde direkt olarak etkilidir ve onu dış etkenlerden korur. Hücre içi enzimlere karşı oldukça duyarlıdır. 60 – 62 Kda ağırlığındadır. N proteini hem virion hem de enfekte hücrede en çok bulunan viral proteindir (Bailey ve ark., 2005; Rima 1983; Diallo ve ark., 1987, Diallo, 1990). N proteini transkripsiyon ve translasyonda görev alır.

**Matrix (membran proteini) protein (M) :** Zar ve kor arasında yer alan viral M proteini virion yapılanmasında çok önemlidir (Coen ve ark., 2000). Virion Ribonükleoproteini (RNP) ve lipid membran içi yüzey glikoproteinleri arasında ilişki kuran membran ilişkili proteinlerdir. M proteini F ve H glikoproteinlerin stoplazmik kuyrukları ile ilişkilidir. Paramyxovirus ailesinde yüksek oranda korunmuş bir proteindir ve diğer morbilliviruslarda da yüksek oranda korunmuştur. Bu korunumun

nedeni viral morfogenezde M proteininin oynadığı önemli rolden kaynaklanmaktadır. Sahip olduğu önemden dolayı bu proteinde meydana gelecek değişimlerin tolere edilmesi pek mümkün değildir (Abraham ve ark., 2005; Dalan ve ark., 2005). Altı yapısal protein içinde büyüklük olarak en küçük olan M proteini, aynı zamanda en çok bulunan proteinlerdendir. 39 Kd ağırlığındadır (Diallo,1990).

**Hemaglütinin protein (H) :** İki yüzey glikoproteininden biri olan H proteini, virusun hücre yüzeyine tutunmasından sorumludur (Abraham ve ark., 2005). Paramyxovirus genus üyeleri H proteininin hem hemaglütinasyon hem de nöroaminidaz aktivitesine sahiptir (Abraham ve ark., 2005; Bernard ve ark., 2007). H proteini çok değişkendir ve P proteini ile birlikte virusa ait proteinler içinde en az korunmuş olan proteindir. 78 Kda ağırlığındadır (Diallo ve ark., 1987; Kinsbury, 1990; Lamb ve Kolakofsky, 2001; Abraham, 2005).

**Füzyon protein (F) :** F protein enfeksiyon sırasında, hem viral membran ile hücre membranı hemde hücre – hücre membranı kaynaşmasından sorumludur. Morbilliviruslarda F proteini yaklaşık 550 aa uzunluğundadır (Bagai ve Lamb , 1995; Ito ve ark., 1997; Ito ve ark, 2000; Karron ve ark,1997; Paterson ve ark., 1985; Russell ve ark., 2001; Sergel ve ark.,2000; Techaarporn ve ark., 2001). Morbilliviruslar ve çoğu diğer paramyxoviruslar H proteininin sinerjistik desteğine ihtiyaç duyar. H proteini virus tutunmasına aracılık eder ve aynı zamanda füzyonun aktivitesinde rol oynar (Das ve ark.,2000a ; Lamb ,1993b ; Morrison, 2003).

**Fosfoprotein (P) :** P geni, (yüksek orandaki fosforilize doğasından dolayı bu şekilde adlandırılır) replikasyon esnasında viral polimeraz tarafından transkribe edilen ikinci gendir (Lamb, 1977). P proteini, N ve L proteinleri ile karşılıklı etkileşerek viral çoğalmada görev alır (Kalokofsky ve ark.,1998; Mahapatara ve ark., 2003). P protein RNP kompleksinin bir integral parçası olarak viral replikasyon siklusunda anahtar bir fonksiyona sahiptir (Horikami ve ark.1992). P proteini 82 – 86 Kda ağırlığındadır (Diallo,1990).

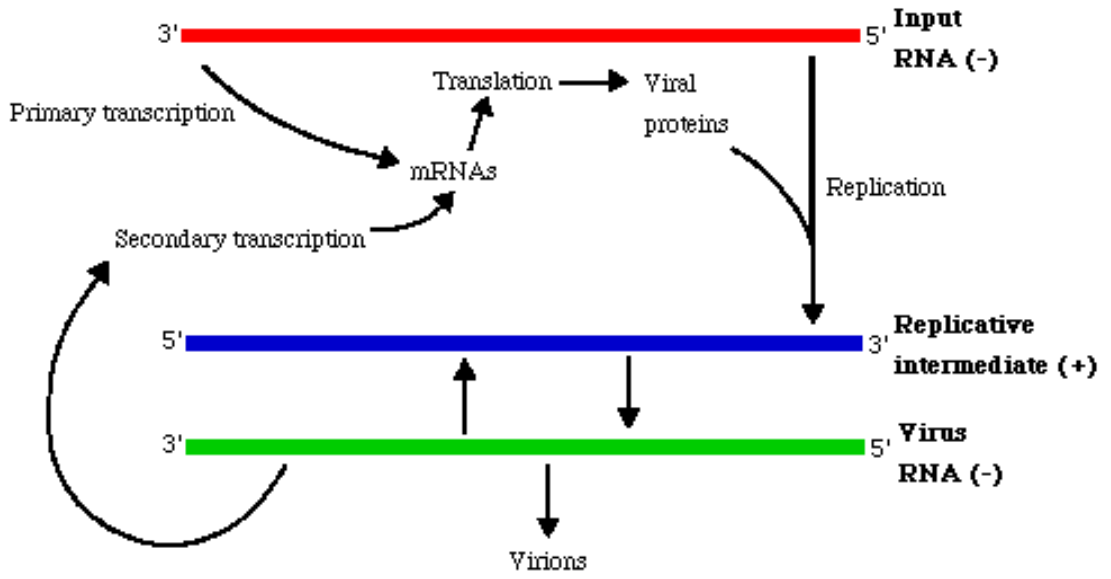
**Large/Polymerase (L) protein:** Viral replikasyonun ve transkripsiyonun enzimatik komponentidir. L proteininin, RNA polimeraz aktivitesi, metilasyon ve poliadenilasyon aktivitesi gibi pek çok görevi bulunmaktadır (Mc Ilhatton ve ark., 1997). L gen, transkripsiyonun polarize sıralı doğasından ve daha sonra azalan mRNA düzeylerinden dolayı en son transkribe olan genidir. Genin translasyon ürünü aynı zamanda viral proteinlerin tümü içinde en az bulunandır. L gen tüm genomun kabaca % 40 'ını kapsar ve enfeksiyon esnasında oluşan viral proteinlerin en büyüğüdür (yaklaşık 250 Kda) (Tarbouriech ve ark., 2000a; Tarbouriech ve ark., 2000b).

**1.1.2. Yapısal olmayan proteinler:** P gen bölgesinde, P proteinine ek olarak yapısal olmayan V ve C proteinleri sentezlenir (Abraham, 2005; Kawaoka, 2004). Bu proteinler yapısal olmasalar da enfeksiyon oluşumunda ve replikasyonda kritik rol oynadıkları bilinmektedir (Baron ve Barrett, 2000).

C proteini 19,5 Kda ağırlığındadır ve interferon cevabını inhibe eder (Diallo ve ark., 1987; Barrett ve ark.; 1993 Gotoh ve ark., 2001 Horvath, 2004). P proteini viral RNA sentezi için gerekli olan tek P geni ürünüdür. P proteini viral RNA polimeraz için esansiyel proteindir (Coen ve ark., 2000).

### **1.1.3. Viral Replikasyon**

Bütün negatif polariteli RNA viruslarında genomik RNA iki fonksiyona sahiptir; mRNA sentezi için transkripsiyonda ve pozitif polariteli antijenom sentezi için replikasyonda kalıp görevi görür. Negatif polariteli RNA virusları kendi RNA polimerazlarını kodlar. Viral replikasyon mRNA sentezinden sonra başlar ve viral proteinlerin sentezlenmesinin devam etmesine ihtiyaç duyar. Sentezlenen yeni (+) antijenomlar daha fazla (-) genomun sentezlenmesi için kalıp görevi görür.



**Şekil 1.2.** Morbillivirusların replikasyonu (Kawaoka, 2004).

Replikasyonun tamamı hücre stoplazmasında gerçekleşir. Virion hemaglütinin proteini ile hücre sialik asit reseptörlerine tutunurken, füzyon proteini ile fizyolojik pH 'da hücre zarı ve virion zarfı arasındaki füzyonu gerçekleştirir. Hücre içine alınan nükleokapsit kompleksi (RNP) bir bütün halindedir (Murphy ve ark., 1995).

Nükleokapsidin konak hücre içine alınmasından sonra viral gen ekspresyonu için ilk basamak, gerekli viral proteinlerin sentezi için transkripsiyondur (Fields ve ark., 2007). RNA transkripsiyon ve replikasyonunda enzimatik sürecinde en önemli yardımcı proteinler L ve P proteinleridir (Coen ve ark., 2000). Yardımcı proteinler, her bir viral mRNA'nın 3' ucuna poliA eklenmesi için ve 5' ucunun post transkripsiyonel modifikasyonu için gerekli enzimatik aktiviteye sahiptir (Fields ve ark., 2007). Viral polimeraz daha önce de belirtildiği gibi genomun 3' sonunda yer alan promotordan senteze başlar. Promotor mRNA ve antijenom sentezi için iki görev yapar. Transkripsiyon linear ve dizinseldir, gen başlangıç ve gen sonlanma sinyalleriyle kontrol edilen başlama - sonlanma mekanizması içerir. Polimeraz molekülleri genom boyunca işlev gördüğü için her bir gen bağlantı noktasında biraz ayrılma olur ve mRNA miktarında genomun 3' sonuna uzaklıktan dolayı azalan bir

derecelenmeye sebep olur. Viral nükleokapsidle bağlantılı proteinlerin hücre içi birikimi RNA replikasyonu ile sonuçlanır. RNA replikasyonu esnasında gen başlangıç ve bitiş sinyalleri hariç genomun birebir kopyası (antigenom) sentezlenir.

Genom tek bir promotordan 6 farklı mRNA şeklinde transkribe olur (Murphy ve ark., 1995). Transkripsiyon ilk gen bölgesinden direkt olarak başlar. Transkripsiyon 3' ucundan başlar ve genler 3' ucundan 5' ucuna doğru sırayla kopya edilir. Gen birleşim bölgelerindeki intergenik bölgelerin varlığı farklı bir transkripsiyon modelinin oluşmasına yol açmıştır. Her genin başlangıcında 10 nt ' lik başlama dizinleri mevcuttur. Bir önceki genin transkripsiyonu tamamlanmadan arkasından gelen genin transkripsiyonu başlamaz. Gen bitimini belirten dur sinyali (4 nt ' lik bitiş dizini ve çoklu U bölgesi) ve başlangıç sinyalleri, RNA bağımlı RNA polimeraz (RDRP) poliU kuyruğunun sentezlenmesi, sonlandırma ve sonraki genin transkripsiyonu için gerekli sinyalleri verir (Y,Kawaoka (Ed) ). İntergenik dizinler transkripsiyon sırasında RDRP aktivitesini düzenleyen, korunmuş dizinlerdir. Birbirinden bağımsız olarak sentezlenen mRNA'lara, mRNA' nın fonksiyon görebilmesi için başlıklama, metilasyon ve poliadenilasyon işlemleri uygulanır. mRNA' ların translasyonu konak hücre ribozamlarında olur (Coen ve ark., 2000). Translasyon ürünlerinin birikmesiyle belli bir düzeye ulaşılır ve replikasyon başlar. Transkripsiyon ve replikasyon arasındaki bağlantı N proteinin konsantrasyonu ile bağlantılıdır. Pozitif polariteli RNA'nın replikasyonunun başlatılması için polimeraz, öncü RNA' ya bağlanır (Gopilo ve ark., 2005). Oluşan antigenomlar yavru genomlar için kalıp görevi görür. Bu genomlar mRNA sentezlenmesi için transkripsiyonda, antigenomik RNA sentezi için replikasyonda ve projeni viruslar için genetik meteryal olmak üzere 3 şekilde kullanılır (Kawaoka, 2004). Replikasyondan sonra paketleme işlemi gerçekleşir. Nükleokapsid şekillenmesi ilk olarak N proteinin viral genomik RNA ile birleşmesi ve ardından yardımcı nükleokapsid proteinlerinin katılmasıyla sonuçlanır (Coen ve ark., 2000). Projeni virusların oluşumu plazma membranında gerçekleşir ve bu bölgeden tomurcuklanma ile viral partiküllerin saçılımı gerçekleşir. Viruslar hücreden çıkışta, konak hücre membranından gerekli zar komponentlerini, nonglikolize proteinleri alarak serbest kalırlar. Böylece olgun virionların oluşumu tamamlanmış olur (Murphy ve ark., 1995).



## **1.2. Epidemiyoloji**

PPRV konak dışında çok süratle inaktif hale geldiğinden, en önemli bulaşma yolu, sürü içinde bulunan viremi dönemindeki hayvanların duyarlı hayvanlarla temasıdır (Briade, 1981). Hasta hayvanların tüm sekret ve ekstreklerinde bol miktarda virus bulunur. Öksürme ve aksırma sonucunda havada bulunan virus solunum esnasında alınabilir (Abegunde ve Adu, 1977). Aynı zamanda enfekte olmuş hayvan yatakları gibi çeşitli malzemeler de etkenin geçişinde indirekt olarak rol oynayabilir. Uzun mesafelerden aerosol yolla gelen etkenlerin bulaşmadaki rolü azdır. Çevre şartlarına oldukça duyarlı olan virus ısı, ultraviole ışını, eter vb. kimyasallarla kolaylıkla inaktif olduğundan, hayvanların yakın temasta olmaları yayılımı kolaylaştırır. Mevsimin yağışlı olduğu dönemlerde morbitide %80 – 90'a ve mortalite ise % 50 – 80'e ulaşmaktadır (Opasina ve Putt, 1985). Hayvan hareketlerinin yoğun olduğu dönemlerde enfeksiyonun görülme sıklığında artış olmaktadır. Özellikle kontrolsüz yapılan hayvan ticaretlerinde, duyarlı sürülere katılan enfekte hayvanlar hastalığın yayılımında önemli role sahiptirler (Opasina ve Putt, 1985; Kitching, 1988; Lefevre ve Diallo, 1990 ).

## **1.3. Klinik Bulgular**

Hastalığın akut formunda, vucüt ısısında 5 derece ve daha yukarı artışalar görülebilir. Bu süreci dehidrasyonla bağlantılı olarak belirgin düşüş takip eder. Şiddetli vakalarda normal vucüt ısısının altına düşüşler, enfeksiyonun ölümcül olacağının belirtisidir. PPR' dan etkilenen hayvanlar depresif ve azalmış iştahla birlikte kuru ağız ve donuk bir posta sahiptir (Taylor 1984; Taylor ve Gibbs, 1979). Bunlara ek olarak, dilin üst kısmında, yanakların iç tarafında, dudak, damak ve diş etlerinde gri renkte peteşiyal tarzda epitelyal nekroz alanları görülür. Zamanla bu lezyonların sayısı ve alanı artarak birleşirler. Ağız mukozasının görünümü tamamen değişir.

Hücreler solgun görünümlü, adeta koyu peynirimsi bir tabaka gibi görünürler. Bu hücrelerin altında çok derine inmeyen erozyonlar vardır (Braide, 1981).

Şiddetli etkilenmiş hayvanlar arasında diğer genel klinik bulgu anormal zayıflama ve dehidrasyona sebep olan kötü kokulu ve sulu ishalin gelişimidir. Bu ishal ölüme yol açabilir. Enfeksiyon esnasında görülebilen diğer klinik bulgular düşük, anoreksi ve bronkopnömonidir. Sekonder enfeksiyonlar (virusler tarafından hızlandırılan konak bağışıklık sisteminin önemli bileşenlerinin parçalanmasıyla) aynı zamanda sahada önemli bir sorundur. Heartwater hastalığı, (etken *Cowdria ruminantium*) PPR ile beraber seyreden ve hızlı bir şekilde ölüme yol açan koyunların bakteriyel bir hastalığıdır (Haymann ve ark., 2005). Sahadaki diğer önemli sekonder enfeksiyon capripox'dur. PPR birlikte seyrettiğinde mortalite oranı % 100'e ulaşabilir (Diallo, 2003).

#### **1.4. Patogenez**

Enfeksiyonun başlangıç alanından PPRV, lenf sistemi ve kan akımı aracılığı ile yayılır ve dalak, akciğerler, mukozal yüzeyler ve bağırsak gibi belirli bölgeleri enfekte eder. Abomazumda enfeksiyon genel olarak görülmesine rağmen, rumen retikulum ve omazum nadiren büyük lezyonlar gösterir. İnce bağırsak ılımlı çizgi tarzında kanama alanlarına sahip olabilir ve erozyonlar ileumun son, duodenumun ilk bölümlerinde görülür. Bağırsağın payer plaklarındaki enfeksiyon çok daha şiddetli nekrozlara sebep olabilir (Bundza ve ark.1988; Rowland ve ark., 1971).

#### **1.5. Enfeksiyonun Tanısı**

##### **1.5.1. Virus İzolasyonu**

Virus izolasyonu, canlı hayvanlardan viremi döneminde alınan defibrile kan ve swap örneklerinden, ölen hayvanlarda ise lenf yumrusu, dalak, akciğer ve kolondan alınan örneklerle yapılmaktadır (Lefevre, 1987). Devamlı hücre kültürlerinden Vero,

MDBK (Madine Darby Bovine Kidney), 293T (Transformed human embryo kidney) ve BHK-21 (Baby Hamster Kidney-21) hücreleri izolasyonda kullanılmaktadır (Lefevre, 1987; Brindha ve ark., 2001; Özkul ve ark., 2002; OIE, 2004; Gülyaz ve Özkul, 2005; Abraham , 2005 ).

### **1.5.2. Virus antijenlerinin Tespiti**

Hızlı bir tanı için ELISA ve agar jel immunodifüzyon (AGID) testleri yapılır. AGID hem sahada hem de laboratuvar da uygulama kolaylığı, basit ve ucuz olmasıyla en sık kullanılan metottur. PPR hiperimmün serumu ile 4 - 6 saat içinde RP hiperimmün serumu ile 2 - 4 saat içinde sonuç verebilir (Gopilo ve ark., 2005). Ayrıca hemaglutinasyon (H) ve hemaglutinasyon inhibisyon testi (HI) (Ezeibe ve ark. 2004; Manohran ve ark., 2005), floresan antikor test (IFAT) (Durojaiye, 1984; Libeu ve Lefevke, 1990; Raj ve ark. 2001) ve immunperoksidaz (IP) testleride kullanılmaktadır (Saliki ve ark. 1994).

### **1.5.3. Viral RNA Tespiti**

Polimerize zincir reaksiyonu, virolojiyide kapsayan geniş bir bilimsel çalışma alanında çok farklı kalıpların (template = RNA veya DNA) tespitinde altın standart olarak kullanılmaktadır. Polimerize zincir reaksiyonu (PCR) virus miktarı az ve bozulmaya başlayan izolasyon metaryallerinde teşhis olanağı sunmasıyla virus izolasyon tekniklerine üstünlük sağlamaktadır. PZR'nin etkinliğinin artması, siklus sayısı, başlangıç materyalinin kalitesi, hedef DNA uzunluğu, bağlanma ve uzama ısılarının değişkenliği gibi pek çok faktöre bağlıdır. PPRV'ü RNA içeren bir virus olduğundan bu yapının DNA' ya çevrilmesi için ters transkripsiyon (RT) işlemine ihtiyaç vardır.

PPR virusuna ait olan farklı gen bölgeleri teşhis amacıyla RT -PCR 'de kullanılmaktadır. RT – PCR 'de fosfoprotein (P) (Özkul ve ark. 2002; Muthuchelvan ve ark. 2006.) ve füzyon (F) (Dhar ve ark. 2002) protein gen bölgelerine ait primerler ile teşhis, epidemiyolojik çalışmalar ve dizin analizi ile genetik bağlantılar

ortaya konmaktadır. Yine PPRV isolatları, F proteinin kısmi dizin analizi yapılarak buna göre dört farklı soyda gruplandırılmıştır (Shaile ve ark. 1996).

### **1.6. Koruma ve Kontrol**

Küçük ruminant vebası genellikle direkt temas yoluyla yayılır ve enfekte olmuş hayvanlar tarafından hayvan barınaklarında salgınlar oluşturur. Klinik bulgular göstermeyen enfekte hayvanlar, virusu saçabilir. Karantina ve düzenli yapılan testler enfeksiyon riskini azaltabilir. PPRV enfeksiyonundan arı ülkeler enfeksiyonun kontrolünde, enfekte alanlardan hayvan hareketlerinin sınırlandırılması, karantina, zorunlu kesim, karkasların uygun bir biçimde imha edilmesi enfekte alanların dezenfeksiyonu gibi klasik kontrol metodları kullanılarak başarıya ulaşılmıştır. PPR salgınlarının kontrolünde, özellikle yüksek risk taşıyan bölgelerde karantina tedbirlerinin yanı sıra aşılama koruyucu immunizasyon (hiperimmun serum uygulaması) birlikte yürütülmektedir (Braide, 1981; Taylor ve ark., 2002). Virus konak dışında dört gün kadar canlılığını sürdürebilmektedir. Virusün çevre şartlarında hızlı inaktivasyonu yayılımın kontrolünde yardımcı olmaktadır. Çeşitli dezenfektanlar kullanılarak virusun inaktivasyonu gerçekleştirilir. Bu dezenfektanlar alkaliler (sodyum karbonat, sodyum hidroksit), halojenler (sodyum hipoklorit), fenolik bileşikler, sitrik asit, alkoller ve iyodoforlar olarak sayılabilir.

Hastalığın endemik olduğu bölgelerde aşılama yapılır. İyileşen hayvanlarda, en az dört yıl ya da yaşam boyu süren bir bağışıklık gelişir. Enfeksiyonu önlemek için doğal yaşamda mevcut olan taşıyıcı hayvanların koyun ve keçilerle temasının önlenmesi gerekmektedir. Dolayısıyla aşılama doğal yaşamda bulunan türler içinde tercih edilebilir (OIE, 2008).

## 1.7. AMAÇ

Bu çalışmada, ilk aşamada seri hücre kültürü (Vero) pasajları ile meydana gelen viral attenüasyondan sorumlu olabilecek mutasyonların P gen düzeyinde sorgulanması amaçlanmıştır. Böylelikle, daha önce Sığır Vebası virusu için bildirilen ve attenüasyonda rol oynadığı belirtilen bir seri anlamlı mutasyonun, PPR virus için de en azından P gen düzeyinde geçerli olup olmadığının sorgulanması hedeflenmiştir. Bu amaca yönelik olarak PPR virusun Vero hücrelerinde 92 pasajı yapılarak her 5 pasaj uygulamasını takiben, PPRV' nin P gen bölgesi kısmi olarak çoğaltılmış ve takiben bu bölgenin dizin analizi gerçekleştirilerek, analiz edilmiştir. Bu noktadan hareketle, tespit edilecek potansiyel mutasyonların, genetik manipülasyonlarla oluşturulduktan sonra virusun ters genetik teknikleri kullanılarak üretilmesi ile uzun süreli klasik hücre kültürü pasajları kullanılmaksızın, virus attenüasyonunu gerçekleştirme fırsatı verebilecektir.

Ayrıca araştırma kapsamında, bu virusa karşı ticari olarak kullanılacak bir moleküler tanı sisteminin olmamasından yola çıkarak, sahada virusun klinik veya postmortem örneklerden süratli ve yüksek güvenilirlikte tespiti amacıyla, değişik gen bölgelerini hedefleyen gerçek zamanlı (real time) ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (rtRT-PCR) tekniğinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Böylece, ülkemizin de içinde bulunduğu coğrafyada oldukça yaygın olan bu enfeksiyonun tanısına hizmet edecek duyarlı ve güvenilir bir sistem geliştirilmesi planlanmıştır.

## **2. MATERYAL ve YÖNTEM**

### **2.1. Materyal**

#### **2.1.1. Hücre Kültürü**

Araştırmada PPR virusun gerek attenüasyonu ve gerekse rtRT-PCR tekniği için pozitif referans olarak kullanılacak PPR virusun üretilmesi ve titrasyonu için Viroloji anabilim dalı koleksiyonunda bulunan Vero (Afrika Yeşil Maymun Börek) hücre hattı kullanıldı.

#### **2.1.2. Virus**

Çalışmada kullanılan PPR virus (PPRV/TU00), 2000 yılında Sakarya ili sınırları içinde bulunan bir koyunculuk işletmesinde PPR hastalık tablosu gösteren bir koyundan izole edildi. Bu virusun, daha önce yapılan çalışmalarla tüm genom uzunluğunca dizin analiz verilerine sahip olunması (GenBank Accession # AJ849636) sebebiyle çalışma kapsamına alındı. Araştırmada tasarlanan tüm primer ve proplar için bu virus genom dizini referans olarak kullanıldı. PPRV-TUR00 çalışma kapsamında ayrıca Vero hücre hattına adapte edildikten sonra attenüasyon için 92 kez bu hücrede pasajlanmak üzere seçildi.

#### **2.1.3. Tanısal Örnekler**

Çalışmamızda belirli dönemlerde sahadan Ankara Üniveristesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalına gelen PPR hastalığı şüpheli olan hayvanlara ait 45 adet çeşitli organ parçaları ve kan örnekleri kullanılmıştır (Çizelge 2.1). Bu örnekler pozitiflik yönünden incelendikten sonra uygun tekniklerle RNA eldesi gerçekleştirilmiş ve bu RNA'lar - 80° C'de saklandı. Diğer taraftan yerel mezbahalarda kesime tabi tutulan sağlıklı hayvanlardan toplanan 15 adet farklı doku ve kan örneği de negatif kontroller olarak kullanıldı. Bu örneklerden de RNA izolasyonu gerçekleştirildi ve kullanılabilecek - 80° C'de saklandı.

**Çizelge 2.1** Tezde kullanılan PPR virus yönünden pozitif örneklerin orjini ve hayvan türü bazında dağılımları.

SIRA NO	GELDİĞİ YER	NUMUNE TİPİ	HAYVAN TÜRÜ
1	BİLECİK (Osmaneli)	KARACIĞER	KEÇİ
2	KOCAELİ	KARACIĞER	KOYUN
3	KIRKLARELİ	KAN (1065)	KOYUN
4	KIRKLARELİ	KAN(442)	KOYUN
5	KOCAELİ	DİL	KOYUN
6	ÇANAKKALE	DİL	KOYUN
7	KIRKLARELİ	KARACIĞER	KOYUN
8	İSTANBUL	KAN(1284)	KOYUN
9	AYDIN 6.	KAN	KOYUN
10	AYDIN 4.	KAN	KOYUN
11	AYDIN 7.	KAN	KOYUN
12	AYDIN 15.	KAN	KOYUN
13	ANKARA	DALAK	KOYUN
14	İSTANBUL	DALAK (4)	KOYUN
15	İSTANBUL	KARACIĞER(7)	KOYUN
16	İSTANBUL	AKCIĞER (323)	KOYUN
17	YOZGAT(Bafra)	KAN	KOYUN
18	YOZGAT (Bafra)	KAN	KOYUN
19	YOZGAT (Bafra)	KAN	KOYUN
20	YOZGAT (Bafra)	KAN	KOYUN
21	YOZGAT (Bafra)	KAN	KOYUN
22	YOZGAT (Bafra)	KAN	KOYUN
23	YOZGAT (Bafra)	KAN	KOYUN
24	YOZGAT (Bafra)	KAN	KOYUN
25	BALIKESİR	DİL	KOYUN
26	KOCAELİ	DİL	OĞLAK
27	KIRKLARELİ(Lüleburgaz)	DİL	KUZU
28	ÇANAKKALE (Yenice)	KARACIĞER	KEÇİ
29	KIRKLARELİ	KARACIĞER	KOYUN
30	İSTANBUL	AKCIĞER(1684)	KOYUN
31	BİLECİK (Osmaneli)	KARACIĞER	KEÇİ
32	BALIKESİR	AKCIĞER	KOYUN
33	ÇANAKKALE (Lapseki)	DUDAK	KOYUN
34	BALIKESİR	KARACIĞER	KUZU
35	KOCAELİ	DALAK	KOYUN
36	ANKARA	LENF	KOYUN
37	ANKARA	KARACIĞER	KOYUN
38	İSTANBUL	DALAK	KOYUN
39	SAKARYA (Geyve)	KAN	KOYUN
40	YALOVA (Çiftlik)	KAN	KOYUN
41	İSTANBUL	DİL	KUZU
42	ÇANAKKALE	KAN (323)	KOYUN
43	HATAY	KAN	KOYUN
44	HATAY	KAN	KOYUN
45	HATAY	KAN	KOYUN

#### 2.1.4. Kimyasal ve Biyolojik Maddeler

DMEM	Sigma, ABD
Fötal Dana Serumu	Biological Industries, İsrail
Agaroz	Prona, EU
EDTA	Merck, Almanya
Etidyum bromür	Sigma, ABD
Gliserol	Sigma, ABD
LB broth	LAB - M, Birleşik Krallık
LB agar	LAB - M, Birleşik Krallık
Mutlak etanol	Merck, Almanya
Tris HCL	Merck, Almanya
Tris base	Merck, Almanya
DNA maker	Fermentas, Litvanya

#### 2.1.5. Kullanılan Kitler

High Pure Viral RNA Kit	Roch, Almanya
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, Litvanya
QuantiTect Probe RT- PCR Kit	Qiagen, Almanya
DNA Clean / Extraction Kit	Genemark, Tayvan
Pfu Taq DNA Polymerase	Fermentas, Litvanya
GenomeLab DTCS – Quick Start Kit	Beckman Coulter, ABD
pGEM – T and pGEM – T Easy Vector Systems	Promega, ABD
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Fermentas, Litvanya
Riboprobe Combination System – SP6/T7	Promega, ABD

#### 2.1.6. Kullanılan Cihazlar

Soğutmalı santrifuj	Sigma, ABD
Termal Cycler TC – 3000	Techne, Birleşik Krallık
Termal Cycler TC – 312	Techne, Birleşik Krallık
Rotorgene 6000 CORBETT	Qiagen, Almanya



CeQ 8000 Genetic Analysis System	Beckman Coulter, Amerika
Picodrop Spektrofotometre	Picodrop, Birleşik Krallık
Hassas terazi	Presica, İsviçre
pH metre	Metler Toledo MP pHmeter, İsviçre
Jel Görüntüleme Sistemi 100	Kodak, Japonya

## **2.2. Yöntem**

### **2.2.1. Konvansiyonel Viroloji**

#### **2.2.1.1. PPR Virusun Üretilmesi**

Dizin analizi için kullanılacak olan PPRV-TUR00 Vero hücre kültürlerine adapte edilmiştir. İlk olarak Vero hücresi 25 cm<sup>2</sup> hücre kültürü flaskında üretildi. Tek tabakalı olarak kaplanmış olan yüzey Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma, ABD) ile yıkandı. Daha sonra flaskın hacminin % 1'i oranında adsorbsiyonlu yöntem ile inokulasyon yapıldı. Bir saat süreyle yapılan inkübasyon işlemi takiben flaska hacminin %10' u oranında serumsuz DMEM 'den eklendi. Kültür sistemi 4 – 5 gün süreyle % 5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C ' lik etüvde inkübe edildi. Paralel olarak kontrol flaskıda virus üremesini gözlemlemek amacıyla izlendi. Süre sonunda CPE gözlenen flask dondurma – çözme ve yüksek devirde santrifüj işlemlerini takiben virus, 0.5 ml hacimde porsiyonlanarak - 80°C ' ye kaldırıldı. Bu işlemler ile virusun uygun şekilde Vero hücrelerinde üremesi sağlandı ve gerekli virus stoğu elde edildi.

#### **2.2.1.2. Plak Titrasyon ile Enfeksiyozite Tayini**

Hücre kültüründe üremesini tamamlamış ve porsiyonlanarak –80 °C'de saklanan viruslar, serumsuz DMEM içinde 10 katlı olacak şekilde 8 basamak sulandırıldı. Her sulandırmadan 200 µl hacimde daha önceden Vero hücresi üretilen 24 gözlü hücre kültür tabletinin ikişer gözüne inokulasyon yapıldı. Bir saat süreyle yapılan 37° C 'de % 5 ' lik CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübasyon işlemi takiben her bir tablet gözüne en az

1ml hacimde DMEM içinde % 1.6 olacak şekilde hazırlanan Carboxymethylcellulose (CMC; Sigma– Aldrich, ABD)' dan ilave edildi. Kültür sistemi 4 - 5 gün süreyle aynı koşullarda inkübe edildi. Süre sonunda hücre yüzeyindeki CMC uzaklaştırılmaksızın kullanılan tüm gözlerdeki hücreler % 10 formaldehit solüsyonu ile en az 30 dakika (tercihen gece boyunca) oda sıcaklığında fikse edildi. Fikzasyonu tamamlanan hücreler % 0.35 kristal viyole boyası ile boyandı ve her sulandırma için oluşan plaklar sayıldı. Sonuçlar aşağıdaki formüle yerleştirilerek, virusların enfeksiyöziteleri plak oluşum ünitesi (POÜ / ml) şeklinde hesaplandı.

$$\text{POÜ/ml} = \text{Plak gözlenen son sulandırma} \times \text{ortalama plak sayısı} \times 5$$

### **2.1.1.3. Dizin Analizi İçin Hücre Kültürü Pasajları**

Dizin analizi için hücre kültürlerine adapte edilmiş olan PPRV'ü 25 cm<sup>2</sup> 'lik flasklarda üretilerek istenen 92 pasaj sayısına ulaşılmıştır. T- 25 cm<sup>2</sup> flaskta tek tabakalı olarak üretilmiş Vero hücresine flask hacminin %1 'i olacak şekilde virus inokulasyonu gerçekleştirildi. İlk olarak hücre vasatı uzaklaştırıldı ve yüzey DMEM ile yıkandı ve adsorbsiyonlu yöntemle 1 saat 37 °C 'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda flask hacminin % 10 ' u olacak şekilde DMEM eklenerek sitopatolojik etki (CPE) oluşumu için beklenildi. Oluşan CPE değerlendirilerek hücreler dondurma - çözündürme ve yüksek devirde santrifüj işlemine tabi tutularak elde edilen virus süspansiyonu – 80°C' de saklandı. Yukarıda bahsedilen işlemler istenilen pasaj sayısına ulaşıncaya kadar tekrar edildi.

## **2.2.2. Moleküler Viroloji ve Tanı**

### **2.2.2.1. Viral RNA İzolasyonu**

PPR RNA'sı, sahadan elde edilen kan, serum ve doku örneklerinden High Pure Viral RNA Kit' i (Roche, Almanya) kullanılarak üretici firma önerilerine göre izole edildi. Buna göre 200 µl alınan örnekten 1,5ml'lik ependorf tüpüne konuldu. Bu örneğin üstüne (50µl polyA 5 ml Binding buffer'a eklendi) poliA eklenmiş binding buffer'dan 400µl eklendi ve vortex yardımıyla çok iyi bir şekilde karıştırıldı. Bu

karışım daha sonra filtre tüplere aktarılıp 8000 g 'de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonunda alttaki sıvı boşaltıldı. Yerine konulan filtreye inhibitor removal buffer 'dan 500µl eklendi ve 8000 g 1 dakika santrifüj yapıldı ve alttaki sıvı tekrar döküldü. Yıkama işlemi için wash buffer 'dan 450 µl eklendi, 8000 g 'de 1 dakika santrifüjün ardından alttaki sıvı kısım atıldı ve tekrar 450 µl wash buffer eklenerek 8000 g 'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Alltaki kısım atıldıktan sonra 14000 g 'de 10 saniye boş olarak santrifüjü takiben, kolonun altına 1,5ml 'lik epondorf tüpten konuldu ve üzerine 50 µl elüsyon buffer eklendi ve ardından 8000 g 'de 1 dakika santrifüj yapıldı ve elde edilen RNA – 80 °C 'de saklandı.

P genindeki değişimlerin ortaya konması için yapılan hücre kültürü pasajlarından elde edilen süpernatantlardan RNA eldesi için yine yukarıda anlatılan High Pure Viral RNA Kit 'i (Roch, Almanya ) prosedürüne göre RNA ' lar elde edilip -80°C'de saklandı. Saklanan viral RNA' lar bir yıl süre sonunda test için kullanıldı.

### **2.2.3. Kullanılan Primer ve Problar**

#### **2.2.3.1. Real Time RT- PCR için Tasarlanan Oligonükleotidler**

'Real time' RT- PCR uygulaması 4 gen düzeyinde tasarlanan primer ve taqman probları ile gerçekleştirilmiştir. Primer ve prob tasarımları tamamen 2000 yılında Türkiye'de izole edilen ve gen bankasına girilen izolat genomu üzerinden, CLCbio Combined Workbench (CLCbio, Danimarka) kullanarak yapılmıştır. Test protokolleri oturtulduktan sonra 45 adet PPR hastalığı şüpheli hayvandan alınan klinik ve/veya postmortem örnekler, PPR virus genomu varlığı tespiti için halen anabilim dalımızda kullanılmakta olan in-house RT-PCR ile karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Gerek primer-prob kombinasyonlarının kendi aralarında ve gerekse rtRT-PCR ve in-house RT-PCR tekniklerinin duyarlılıkları birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Tasarlanan primer ve problar, Alpha DNA (Montreal, Quebec, Kanada) tarafından sentezlenmiştir. ' Real time ' RT- PCR çalışması için tasarlanan primer ve prob dizinleri ve üzerindeki modifikasyonlar Çizelge 2.2 'de verildi.

**Çizelge 2.2** Çalışmada kullanılan primer ve prob dizinleri.

Primer/Prob Adı*	Dizinler (5'→3')	Modifikasyon
PPRV/M/F/4186	TGGGAGGAATAGGTGGAA	
PPRV/M/R/4362	GGACGGCTTGGATTTTGA	
PPRV/M/Prb	AGAAGCACCCGGGAAAATGAG	5' FAM, 3' TAMRA
PPRV/N/F/350	AGAGTCACCCGGGCAATTGATACA	
PPRV/N/R/646	TTGGCCAGAAGGATCCAGACTTGT	
PPRV/N/Prb	TTGACCTTTGCATCACGTGGTGCTGA	5' FAM, 3' TAMRA
PRV/P/F/3067	ATTGGAACCAAAGCCAACCTCCAGC	
PPRV/P/R/3329	TGCTTGGCGAGAATTGCTGTTAGC	
PPRV/P/Prb	AAGCTCTGCAATCGGGTTTGTCCCAT	5' FAM, 3' TAMRA
PPRV/L/F/10054	GCCGAGTCAGATACTTGTGGGAT	
PPRV/L/R/10134	GCAGGGCAACAACCTTGGTA	
PPRV/L/Prb	TGGGTTCTTCCCAACACTAGGCA	5' FAM, 3' TAMRA

\* Virus adı/Gen/Yön/Lokalizasyon(GenBank Accession # AJ849636 düzeyinde)

Tabloya göre lokalizasyonları verilen primer çiftleri ile çoğaltılan her dört gen bölgesine ilişkin dizinler aşağıda sunuldu.

N genine yönelik **Forward** ve **Revers** primerleri ile **Prob** yerleşimi;

**AGAGTCACCCGGGCAATTGATACA**GC GAATCACAGATGATCCAGATGTTAGTATCCG  
CCTTGTTGAGGTAGTTCAAAGTACTAGGTCTCAGTCCGGG**TTGACCTTTGCATCAGC**  
**TGGTGCTGA**TTTAGACAACGAGGCAGACATGTATTTTTCAACTGAGGGGCCCTCGAG  
TGGAGGTAAGAAAAGGATCAACTGGTTTGAGAACAGAGAAATAATAGACATAGAAGT  
GCAGGATCCAGAAGAGTTCAATATGTTGTTAGCCTCATACTAGC**ACAAGTCTGGAT**  
**CCTTCTGGCCAA**

P genine yönelik **Forward** ve **Revers** primerleri ile **Prob** yerleşimi;

**ATTGGAACCAAAGCCAACCTCCAGC**TCAAAGGGTCAGCTTCTTAAGGATCTCCAGCTA  
AAACCTGTTCGACAAGCAGGC**AAGCTCTGCAATCGGGTTTGTCCCAT**CCGACCATGAA  
TCATCCAGAAATGTCATCCGCTCCATAATCAAGTCGAGCAAGCTAAACACTGATCAC  
AAGGACTATCTTCTAGATTTACTAAATGATGTGAAAGGCTCCAAGGATCTTAAGGAA  
TTCCACAAGAT**GCTAACAGCAATTCTCGCCAAGCA**

M genine yönelik **Forward** ve **Revers** primerleri ile **Prob** yerleşimi;

**TGGGAGGAATAGGTGGAA**CAAGTCTCCATATT**AGAAGCACCGGGAAAATGAG**CAAAA  
CCCTCCATGCACAGCTGGGGTTCAAGAAAATCTTATGTTACCCCTAATGGATGTTA  
ATGAGGATCTTAACCGATATCTCTGGCGGGCAGAGTGCCGAATAG**TCAAATCCAAG**  
**CCGTCC**

L genine yönelik **Forward** ve **Revers** primerleri ile **Prob** yerleşimi;

**GCCGAGTCAGATACTTGTGGGAT**CTTATTGAT**TGGGTCTTCCCAACTAGGCAACA**  
CCACAT**TACCAAGTTGTTGCCCTGC**

### 2.2.3.2. P Gen Bölgesi Sekansı için Tasarlanan Oligonükleotidler

Elde edilen cDNA'lar, PCR reaksiyonunda virus P gen bölgesine spesifik olarak tasarlanan primerler kullanarak çoğaltıldı. Kullanılan primer dizinleri Çizelge 2.3'de verildi.

**Çizelge 2.3** Dizin analizinde kullanılan primerler ve genom lokalizasyonları

Primer Adı	Primer Dizini (5' → 3')	Lokalizasyonu	Ürün Büyüklüğü (bp)
PPRV-P-F	CGTCTTCAATGGAGGAGAGGATGGG	2223	1137
PPRV-P-R	TGAGATGGTGACTGGAGGGTGTGT	3359	

### 2.2.4. P Gen Bölgesi Dizin Analizi

#### 2.2.4.1. Ters Transkripsiyon Reaksiyonu

Dizin analizi amacıyla kullanılacak olan viral RNA'ların komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilmesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Revertaid First Strand cDNA kiti (Fermentas, Litvanya) kullanılmıştır. Uygulamaya başlamadan önce tüm reaksiyon bileşenleri çözüldü ve vorteks ile karıştırılarak buz aküsü içine yerleştirildi. PCR tüpü içerisine 3 µl steril deiyonize su, 0,5 µl random hegzamer primer (0,2 µg/ml) ve

3 µl RNA konuldu. Karışım vorteks ile karıştırıldı ve çok kısa bir süre santrifüj edildi. Tüpler thermal cyclere yerleştirildi ve 70° C 'de 5 dakika inkubasyona bırakıldı.

İnkubasyon sonunda, tüpler buz aküsüne yerleştirilerek soğuması sağlandı. Her bir tüp üzerine 2,0 µl 5×Reaksiyon buffer, 1 µl 10mM dNTP mix ve 0,5 µl M - MuLV (Moloney Murine leukemia virus ) reverse transkriptase'den (200 U/ µl ) oluşan karışımdan 3,5 µl konuldu. Tüpler tekrar termal cyclere yerleştirilerek 25 °C 'de 10 dakika, 37° C 1 saat ve 70 ° C 'de 5 dakikadan oluşan program süresinde inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda cDNA elde edildi. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda belirtilen reaksiyon karışımı ve ısı döngüleri Çizelge 2.4'de PCR 'da kullanıldı.

**Çizelge 2.4** Çalışmada kullanılan PCR miks bileşenleri ve programı.

Bileşen	Konsantrasyon	Kullanılan Program
Pfu DNA polymerase (5u/ µl)	0,25 µl	96° C 'de 6 dk 94° C 'de 45 sn 45° C 'de 1 dk 72° C 'de 1 dk 45° C 'de 1 dk 72° C 'de 10 dk 35 siklus
10 × Pfu buffer	3 µl	
25 mM MgCl <sup>2</sup>	2.4 µl	
10 mM dNTP mix	0,5 µl	
Primer – forward (10 pmol/ µl )	0,5 µl	
Primer – reverse (10 pmol/ µl )	0,5 µl	
Deiyonize su	19,85 µl	
cDNA	3 µl	
Toplam	30 µl	

#### 2.2.4.2. PCR Ürünlerinin Agaoroz Jel Elektrofrez

PCR ürünlerinin jelde görüntülenmesi amacıyla , %1 'lik agaroz (Prona, EU) 0,5 × TAE solusyon içerisinde çözüldü ve ısı yardımıyla eritildi. Uygun sıcaklık değerine gelmesinden sonra üzerine 0,5 µg/ml konsantrasyonundaki ethidium bromide (Sigma, ABD) ilave edilerek jel taşıyıcısına döküldü. 15 - 20 içinde katılaştıran jel taşıyıcısındaki taraklar çıkarılıp, jel taşıyıcısı elektrofrez tankına yerleştirildi. PCR

ürünlerinin jele yüklenmesi işlemi 6X yükleme boyası (Fermentas, Litvanya) ile 1 kısım boyaya 5 kısım PCR ürünü katılıp karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Spesifik ürünün belirlenmesi için 1 µl 100 bp'lik DNA merdiveni (Fermentas, Litvanya) 'de bir kuyucuğa yüklendi. 0,5× TAE solusyonu içerisindeki jele 30 mAp 20 dakika uygulanarak DNA göçü sağlandı ve jel görüntüleme sistemi (Kodak, Gel Logic 100, ABD) kullanılarak PCR sonucu oluşan bantlar görüntüldü.

#### **2.2.4.3. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması**

Elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüleri değerlendirilerek saflaştırma amacıyla preparatif jele (%1) yüklendi. Her bir örnek için 50 µl PCR ürününe 10 µl 6 × yükleme boyası karıştırılıp jelde kuyucuklara 100bp 'lik DNA merdiveni rehberliğinde yüklendi. DNA göçü sonrasında görüntülenen 750 bp 'lik DNA bantları görüntülenerek, steril bir bistüri yardımıyla jelden kesilerek ayrıldı ve 1,5 ml' lik ependorf tüplerine konuldu. Elde edilen jel parçaları ticari bir pürifikasyon kiti (DNA Clean/Extraction Kit, Kat No: DP034-300, Gene Mark, Tayvan) kullanılarak firma tarafından önerilen yöntem kullanılarak saflaştırma işlemi yapıldı. Elde edilen saflaştırılmış DNA'lar, dizi analizinde kullanılmak üzere - 20°C' de saklandı.

#### **2.2.4.4. Dizi Analizi**

Saflaştırılmış DNA'lar Dye Terminator Cycle Sequencing (Genomelab DTCS – Quick Start Kit, Kat No: S810148. Beckman Coulter, ABD) kiti kullanılarak dizin analizi işlemi gerçekleştirildi. Boyalı nükleotidlerle işaretleme işlemi Çizelge 2,5'de gösterilen reaksiyon karışımı ve ısı döngülerinde gerçekleştirildi. Thermal cycle programı sonucunda elde edilen DNA'lar absolut ve %70 konsantrasyonda hazırlanmış etanol solusyonlarıyla yıkama işlemine tabi tutuldu. Bu işlemin ardından DNA'lar etanolün uzaklaştırılması ve kuruması için karanlık bir ortamda bir gece bırakıldı. Ertesi gün işaretli ürünler kapillar elektroforetik separasyon için Beckman Coulter CEQ 8000 Genetik Analiz cihazına (Beckman, ABD) yerleştirildi. Elde

edilen veriler Beckman Coulter tarafından sağlanan program yardımıyla değerlendirildi.

**Çizelge 2.5** Dizi analizi için uygulanan reaksiyon bileşenleri ve program

DNA Dizi Analizi Reaksiyon Karışımı		Program ve Döngü Sayısı
Bileşen	Miktar ( $\mu\text{L}$ )	
DNA	4	96 ° C 'de 6 dk 96 ° C 'de 20 sn 50 ° C 'de 20 sn 60° C 'de 4 dk 4° C 10dk X30
Primer (Forward veya Reverse)	1	
DTCS	4	
Sulandırıcı	1	
Toplam	10	

## 2.2.5. PPR Virus Kantitasyonu Amacıyla İn Vitro Transkripsiyon Standartı Oluşturulması

### 2.2.5.1. Hedef Genlerin Amplifikasyonu

Gerçek zamanlı reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ile sahadan gelen PPRV şüpheli hayvan örneklerinin incelemesinde standart oluşturulması amacıyla ilk basamakta in vitro transkripsiyona olanak sağlayan pGEM – T Easy (Promega, ABD) vektörüne klonlama gerçekleştirildi. Bunun için PPRV/TU00 yerel izolatından RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra 2.2.4.1.'de anlatıldığı şekilde cDNA sentezlendi. Bunu takiben 4 genom bölgesine ait (L, M, N, P) primerler (Çizelge 2.4.) kullanılarak konvansiyonel PZR ile ampikonlar elde edildi. Bu PZR ile 94 °C 6 dakika denatürasyon işleminin ardından, 94°C 45 saniye, 65°C 1 dakika, 72°C 1 dakika 35 döngü ve son basamakta 65°C 1 dakika ve 72°C 10 dakika olacak şekilde



gerçekleştirildi. Böylelikle hedeflenen 4 genom bölgesine ait beklenen büyüklüklerde ampikonlar elde edildi. Bu DNA ürünleri pGEM-T Easy vektörlerine klonlandı.

#### **2.2.5.2. PCR ile Çoğaltılan Bölgelerin pGEM – T Vektörlerine Klonlanması**

PCR sonucu elde edilen ürünler pGEM-T Easy vektörüne kit kullanım klavuzu takip edilerek yerleştirildi. Bu amaçla ilk olarak elde edilen PCR ürünleri %1 'lik agaroz jele yüklendi. Yükleme hazır olan jele 60 µl PCR amplilasyon ürünü 6 µl 6 × yükleme boyası ile karıştırıldı ve jeldeki kuyucuklara yüklendi. PCR ürünü daha sonra 90 V- 30 mA 25 dakika yürütülerek görüntülendi.

Daha sonra UV altında jelde bulunan DNA bantları bistüri aracılığıyla jelden çıkartıldı. Bu parçalar darası alınmış olan 1,5 ml 'lik ependorflara alındı ve DNA Clean / Extraction Kiti (Gene Mark, Tayvan) kullanılarak temizleme işlemi yapıldı. Buna göre kesilen jel parçasının ağırlığına eşit oranda binding buffer 'dan (100 mg'a 100 µl olacak şekilde) eklendi ve 60 °C 'de 5- 15 dakika ya da tamamen eriyinceye kadar su banyosunda bekletildi. Arada tüpler çıkartılarak vorteks işlemi yapıldı. Tamamen erimiş olan jel karışımı hazırlanmış olan filtre sistemine aktarıldı ve 12000 - 14000 g'de 1 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Süre sonunda toplama tüpündeki sıvı döküldü ve yıkama işlemi için 700 µl yıkama tamponundan eklenerek tekrar 12000 - 14000 g'de santrifuj yapıldı. Bir kez daha tekrarlanan bu yıkama basamağından sonra, kalıntı etanolün uzaklaştırılması için 3 -5 dakika 12000 – 14000 g 'de santrifuj yapılarak filtreler yeni bir 1,5 ml 'lik ependorfa yerleştirildi. DNA eldesi için 30 -100 µl miktarındaki elüsyon tamponundan ya da saf sudan (pH 7,0 – 8,0) filtreye eklendi ve oda derecesinde 1- 2 dakika beklenildi. Süre sonunda 12000 – 14000 g 'de santrifuj yapılarak elde edilen DNA'lar jelde yürütüldü ve klonlama aşamasına kadar – 20 °C saklandı.

Klonlama işlemi için daha sonra “pGEM – T Easy vector” klonlama protokolü kullanıldı. Buna göre saflaştırılmış olan PZR ürününden 3µl, 2× ligation buffer 'dan 5 µl, pGEM – T Easy vectörden (50 ng) 1 µl, T4 DNA ligase (3 Weiss

units/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l olacak şekilde total 10  $\mu$ l hacimde hazırlanıp, oda derecesinde 1 saat inkübasyona bırakıldı.

### **2.2.5.3. Transformasyon**

Transformasyon işlemi için hazırlanan ligasyon karışımından 2 $\mu$ l alınarak 50  $\mu$ l 'JM 109 Competent 'E.coli hücreleri üzerine eklendi ve karıştırıldı. Buz üzerinde 20 dakika bekletilen karışım daha sonra ısı şoku için 42 °C 50 – 55 saniye bekletildi ve tekrar buz üzerine alınarak 2 dakikada burada bekletildi. Süre sonunda oda ısısına getirilmiş SOC karışımından 950  $\mu$ l eklenerek 37 °C 'de 1,5 saat 150 rpm 'de inkübasyona bırakıldı. Daha yüksek koloni oranını elde etmek için kitin önerdiği 1000 g 'de 10 dakika santrifüj işlemi yapılarak 200  $\mu$ l SOC ile pelet pipete edilerek ampisilin içeren agarlara yayıldı ve 37 °C bir gece inkübasyona bırakıldı.

### **2.2.5.4. Plasmid İzolasyonu ve Klonların Analizi**

Bir gece sonunda pleytlerde tespit edilen koloniler ampisilin içeren 2 ml sıvı LB besiyerine aktarıldı ve 37°C'de bir gece 150 rpm 'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi günü üreyen bakterilerden "Plasmid DNA purification" (Fermentas, Litvanya) kiti yardımıyla ekstraksiyon yapıldı.

İlk olarak çoğalan kolonilerden 1,5 ml alınarak 14 000 rpm'de 30 saniye santrifüj yapılarak LB 'de üreyen bakterilerin çökmesi sağlandı. Tüp dibindeki pellet kitin önerdiği şekilde 250  $\mu$ l resüspanسیون solusyonu eklenip, iyice pelletin dağılması için vortekslendi. Bu karışımın üstüne 250  $\mu$ l Lizis buffer'dan eklenip 4- 6 kez yukarı – aşağı olacak tarzda karıştırıldı ve hemen üzerine 350 $\mu$ l nötralizasyon buffer'dan eklenerek tekrar yukarı – aşağı tarzda karıştırıldı ve 14 000 rpm 'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süre sonunda elde edilen süpernatant hazırlanmış olan GeneJET (Fermentas, Litvanya) spin koluma aktarıldı ve 14 000 rpm'de 1 dakika santrifüjü takiben iki kez 500  $\mu$ l wash buffer'la yıkamanın ardından kalıntı etanolün uzaklaştırılması için 14 000 rpm'de santrifüj işleminin ardından yeni 1,5 ml ependorfa yerleştirilen filtreye 50  $\mu$ l elüsyon tamponu eklenip 2 dakika oda

derecesinde bekletildi. Yine 2 dakika 14 000 rpm’de santrifüj yapılarak plazmid DNA’sı elde edildi.

#### **2.2.5.5. Plazmidlerin Jelde Görüntülenmesi**

Agaroz jel 0,5× TAE içinde ve % 1 konsantrasyonda hazırlandı ve Jel donduğunda taraklar uzaklaştırılıp, yürütme tankına yerleştirildi. Her plazmid DNA’sı 5 µl hacimde alındı 1 µl 6X yükleme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel 90V’da 25 dakika yürütüldükten sonra UV ışık altında DNA’lar görüntülendi ve bu DNA’lardan pozitif olanlar (PCR ürününe sahip olanlar) tespit edildi.

#### **2.2.5.6. PCR Ürünü İçeren Kolonilerin Dondurulması**

Bu amaç için pozitif olarak tespit edilmiş olan plazmid DNA’larını içeren koloniler tekrar ampisilinli LB besi yerine ekilerek bir gece 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün üreyen bakterilerden % 10 gliserol içerecek şekilde 1 ml hacimli tüpler hazırlanarak – 80°C’de donduruldu.

#### **2.2.5.7. Plazmid DNA Dizin Analizi**

Elde edilen plazmid yapıların konstrüksiyonlarının doğrulanması amacıyla yapıldı. Saflaştırılmış plazmid DNA ‘ları Dye Terminator Cycle Sequencing kiti kullanılarak dizin analizi işlemi gerçekleştirildi. Boyalı nükleotidlerle işaretleme işlemi Çizelge 2.6’da gösterilen ısı döngülerinde gerçekleştirildi. Thermal cycler programı sonucunda elde edilen DNA’lar absolute ve % 70 konsantrasyonlarda hazırlanmış etanol solusyonlarıyla yıkama işlemine tabi tutuldu. Bu işlemin ardından DNA’lar etanolün uzaklaştırılması ve kuruması için karanlık bir ortamda bir gece bırakıldı.

Ertesi gün işaretli ürünler kapillar elektroforetik separasyon için Beckman Coulter CEQ 8000 Genetik Analiz cihazına yerleştirildi. Elde edilen veriler Beckman Coulter tarafından sağlanan analiz programı yardımıyla değerlendirildi.

**Çizelge 2.6** Plasmidler için uygulanan dizi analizi reaksiyon bileşenleri ve programı

DNA Dizi Analizi Reaksiyon Karışımı		Program ve Döngü Sayısı
Bileşen	Miktar (µL )	
DNA	4	96 ° C 'de 6 dk 96 ° C 'de 20 sn 50 ° C 'de 20 sn 60° C 'de 4 dk 4° C 10dk X30
Primer (Forwad veya Reverse )	1	
DTCS	4	
Sulandırıcı	1	
Toplam	10	

#### 2.2.5.8. Plasmid DNA Miktarının Hesaplanması

Elde edilen plazmid DNA'ları, Picodrop Spektrofotometre (Picodrop, BK) kullanılarak ölçüldü ve kopya sayısı hesaplandı (Salvi, 2008). Bu amaçla aşağıdaki formül kullanıldı;

$$\text{Plazmid kopya/}\mu\text{l} = \text{C} \times \text{NA} / \text{MW} \times 10^9$$

Bu formülde; C, spektrofotometre ile ölçülen konsantrasyon (ng/µl), NA Avogadro sayısı ( $6,023 \times 10^{23}$ ); MW, standart plazmidin moleküler ağırlığı;  $10^9$ , nanomolden mole çevrim faktörü olarak tanımlanmıştır.

### **2.2.5.9. İn Vitro Transkripsiyon**

Kantitasyon amacıyla kullanılacak olan N, P, L ve M gen bölgelerini içeren plasmidler in vitro transkripsiyon için kullanıldı. Bu amaç için ‘Riboprobe in vitro Transcriptions Systems Kit’i (Promega, ABD) tercih edildi. Kit prosedürü takip edilerek ilk olarak plasmidler uygun kesim enzimleri ile linear hale getirildi. Kullanılacak kit bileşenleri oda derecesine getirildikten sonra, DTT, 100mM’den 10 µl, Transcription Optimized 5× buffer’dan 20 µl, Recombinant RNasin Ribonuclease İnhibitor 100 U, linearize kalıp DNA ‘den (1,0 – 2,5 mg / Deiyonize su ya da TE buffer içinde) 2 µl, SP6 – T3 ya da T7 RNA polymerase’dan 40 U ve son olarak total hacim nükleaz içermeyen suyla 100 µl ‘ye tamamlandı. Bu karışım 37 - 40°C’ de 1 – 2 saat bekletildi ve süre sonunda temizleme işlemine geçildi. Bu aşamada 1 U/µg template DNA konsantrasyonuna RQ1 RNase – free DNase eklendi ve 37°C ‘de 15 dakika inkübe edildi. Süre sonunda eşit miktarda olacak şekilde sitratla doyurulmuş (pH: 4,7) fenol: kloroform: isoamil alkol ‘den (125:24: 1) eklendi ve 1 dakika vorteksdikten sonra 2 dakika 12,000 × g ‘de santrifüj yapıldı. Elde edilen üst faz temiz bir tübe alındı ve hacminin yarısı oranında 7,5M ‘lık amonyum asetat ve 2,5 oranında %100 ‘lük etanolden eklenip karıştırıldı. Karışım – 70°C ‘de 30 dakika bekletildikten sonra 20 dakika santrifüj yapıldı. Süre sonunda elde edilen süpernatant dikkatlice uzaklaştırılıp pellet % 70 ‘lik etanol ile yıkanıp kuruması için 37°C de bırakıldı. Kuruyan RNA pelletleri daha sonra TE buffer ya da su ile resüspanse edilerek - 70°C’de muhafaza edildi.

### **2.2.6. PPR Virus RNA’sının ‘Real time ‘ RT-PCR ile Gösterilmesi**

PPRV RNA’yı ‘real time ‘ RT- PCR yöntemi ile ortaya koyabilmek amacıyla virus genomunun 4 farklı genini hedefleyen primer - prob setleri kullanıldı. Ortak sentezlenen cDNA’lardan daha sonra “gradient thermal cycler” kullanılarak farklı ısı derecelerinde bağlanma gerçekleşen PCR’ları ile her gen düzeyinde ideal reaksiyon şartları tespit edildi.

### 2.2.6.1. QuantiTect (Qiagen, Almanya) Probe RT – PCR Kit

PPRV RNA ‘sı yönünden pozitif olduğu bilinen bir hayvana ait olan kan örneğinden RNA izolasyonu yapıldı ve primer – prob tasarımlarının optimizasyonunda bu örnek kullanıldı. Reaksiyonda primerler 10’ar pmol, probolar ise 5’er pmol konsantrasyonda kullanıldı. QuantiTect Kiti ile hazırlanan reaksiyon bileşimi Çizelge 2.7 ‘de verilmiştir. Yine CORBETT Rotorgene 6000 PCR (Qiagen, Almanya) sisteminde verilen sıcaklık ve döngü sayıları her bir gen bölgesi için ayrı ayrı optimize edilmiştir. Çizelge 2.8 ‘de L gen bölgesi için, Çizelge 2.9’da M gen bölgesi için, Çizelge 2.10’ da P gen bölgesi için ve Çizelge 2.11’ de N gen bölgesi için verilmiştir.

**Çizelge 2.7** QuantiTect Probe RT – PCR Kit ile hazırlanan karışım

<b>Bileşen</b>	<b>Konsantrasyon</b>
2×Reaksiyon buffer	12,5 µl
RT – karışımı	0,25 µl
Primer – forward (10pmol / µl )	1 µl
Primer- reverse ( 10pmol / µl )	1 µl
Prob ( 5pmol / µl )	0,5 µl
Deiyonize su	4.75 µl
RNA	5 µl
Total	25 µl

**Çizelge2.8** QuantiTect Probe RT – PCR Kit ile L gen bölgesi için sıcaklık döngüleri ve süreleri

<b>Basamaklar</b>	<b>Zaman</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Siklus Sayısı</b>
Ters transkripsiyon	30 dk	50 ° C	1
PZR başlangıç aktivasyon basamağı	15 dk	95° C	1
Denatürasyon	5 sn	94 ° C	40 - 45
Bir arada birleşme / uzatma	60 sn	53 ° C	

**Çizelge 2.9** QuantiTect Probe RT – PCR Kit ile M gen bölgesi için sıcaklık döngüleri ve süreleri

<b>Basamaklar</b>	<b>Zaman</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Siklus Sayısı</b>
Ters transkripsiyon	30 dk	50 ° C	1
PZR başlangıç aktivasyon basamağı	15 dk	95° C	1
Öndenatürasyon	15 sn	94 ° C	40 - 45
Denatürasyon	20 sn	49 ° C	
Uzatma	60 sn	60° C	

**Çizelge 2.10** QuantiTect Probe RT – PCR Kit ile P gen bölgesi için sıcaklık döngüleri ve süreleri

<b>Basamaklar</b>	<b>Zaman</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Siklus Sayısı</b>
Ters transkripsiyon	30 dk	50 ° C	1
PZR başlangıç aktivasyon basamağı	15 dk	95° C	1
Denatürasyon	15 sn	94 ° C	40 - 45
Bir arada birleşme/uzatma	60 sn	60 ° C	

**Çizelge 2.11** QuantiTect Probe RT – PCR Kit ile N gen bölgesi için sıcaklık döngüleri ve süreleri

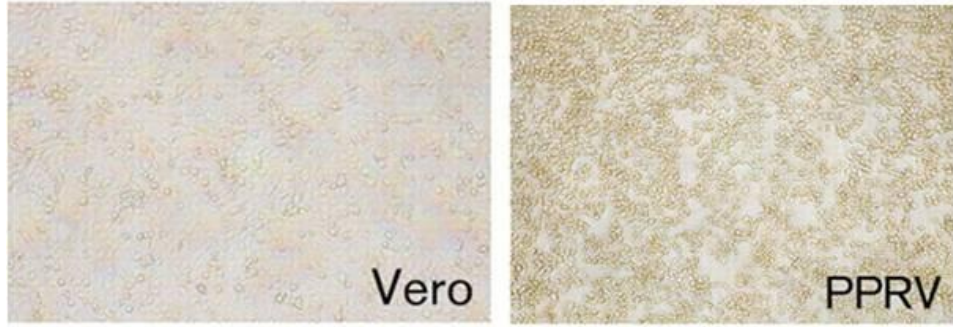
<b>Basamaklar</b>	<b>Zaman</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Siklus Sayısı</b>
Ters transkripsiyon	30 dk	50 ° C	1
PZR başlangıç aktivasyon basamağı	15 dk	95° C	1
Denatürasyon	15 sn	94 ° C	40 - 45
Bir arada birleşme /uzatma	60 sn	60 ° C	

### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1. Konvansiyonel Viroloji

##### 3.1.1. PPR Virus Seri Pasajları

Attenüasyon amacıyla Vero hücrelerinde 92 pasaja kadar yapılan PPR virus inokulasyonları sonrasında, virus enfektivitesinde her hangi bir değişim olmaksızın virusun hücreye mükemmel adaptasyonu izlendi. Bu adaptasyon sırasında erken pasajlarda hücresel patoloji daha çok hücre yuvarlaklaşması, acaip görünümlü hücre (bizarre shaped cells) oluşumu ve sonunda hücre dökülmesi ile karakterize iken, pasajlar ilerledikçe, 60 pasajdan itibaren, multinükleer sintsityal hücre oluşumları ve hücre dökülmesi ağırlıklı bir patoloji tespit edildi.

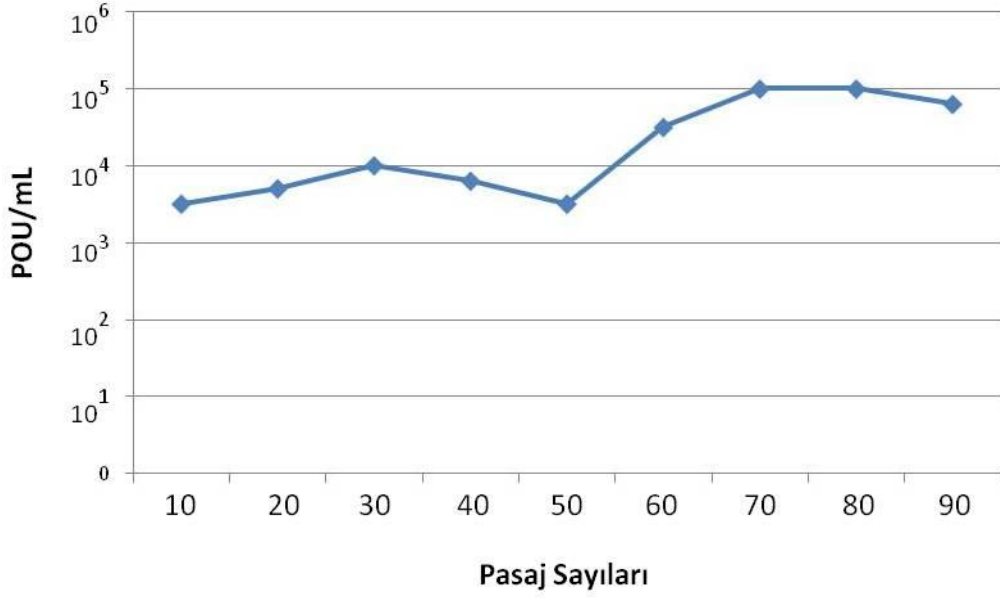


**Şekil 3.1** PPRV ‘ nün Vero hücresinde oluşturduğu CPE (sitopatolojik etki)

##### 3.1.2. Enfektivite Tespiti

PPRV/TU00 virusun Vero hücrelerinde yapılan seri pasajlarını takiben natif plak test ile viral enfektivite tayini sonrasında titrenin  $1 \times 10^4$  POÜ/mL'nin altına düşmediği tespit edildi.





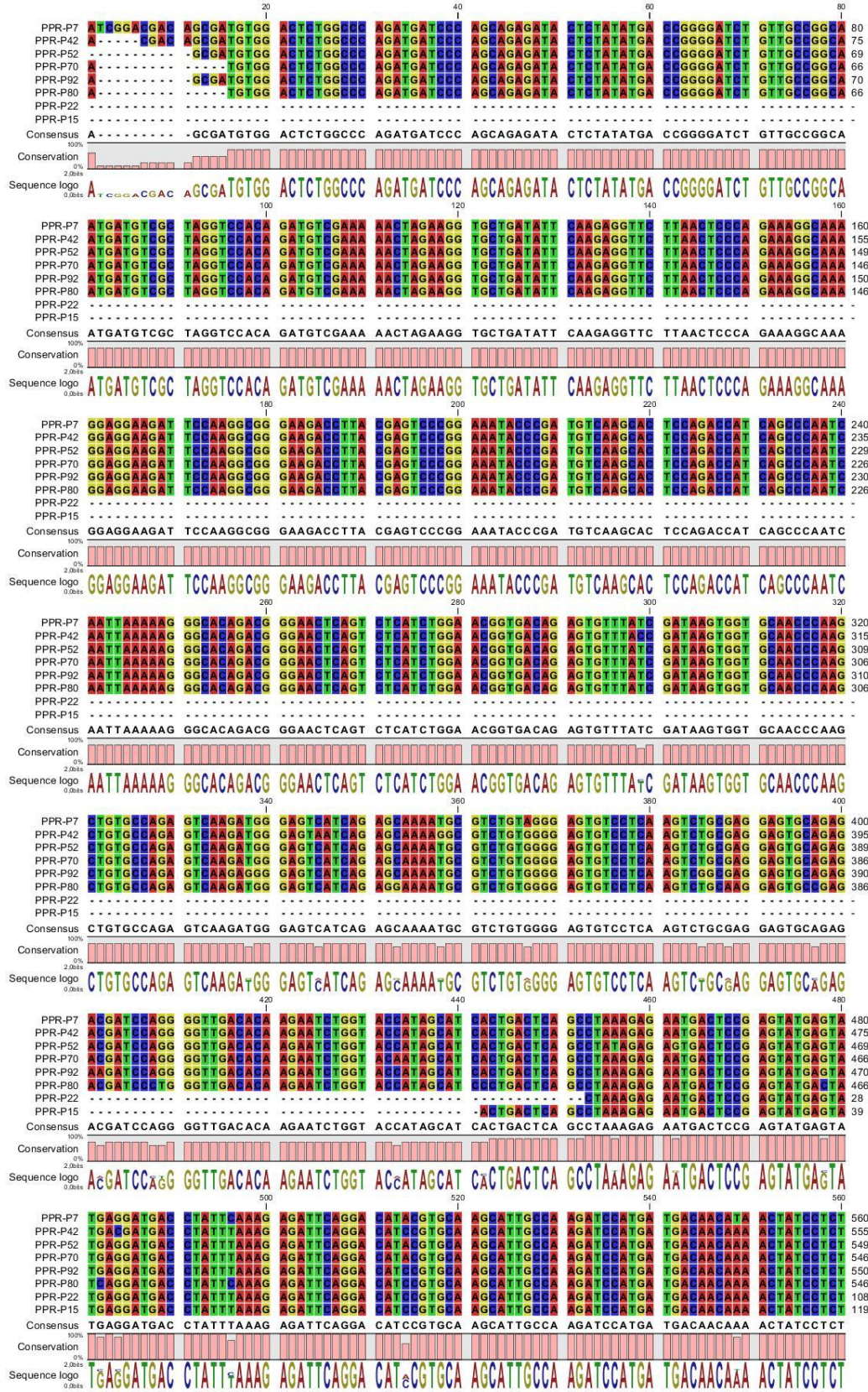
**Şekil 3.2** Pasaj sayılarına göre virus enfektivitesindeki değişim

## 3.2. Moleküler Viroloji ve Tanı

### 3.2.1. Pasaj Viruslarına P Gen Dizin Analizi

Araştırmada kullanılan PPRV/ANK00 suşunun seri pasajlarına, P gen bölgesi forward ve reverse primerleri ile ayrı ayrı yapılan dizin analizleri sonrasında elde edilen veriler, CLCBio Combined Workbench (Danimarka) programı kullanılarak analiz edildi. Bu çalışmadan sadece P7, P15, P22, P42, P52, P70, P80 ve P92 numaralı pasajlara ait dizinler karşılaştırıldı. Yapılan değerlendirmelerde her ne kadar nükleotid dizilerinde mutasyonlar tespit edilse de bunların protein yapıya olan etkileri önemli olarak bulunmadı (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).

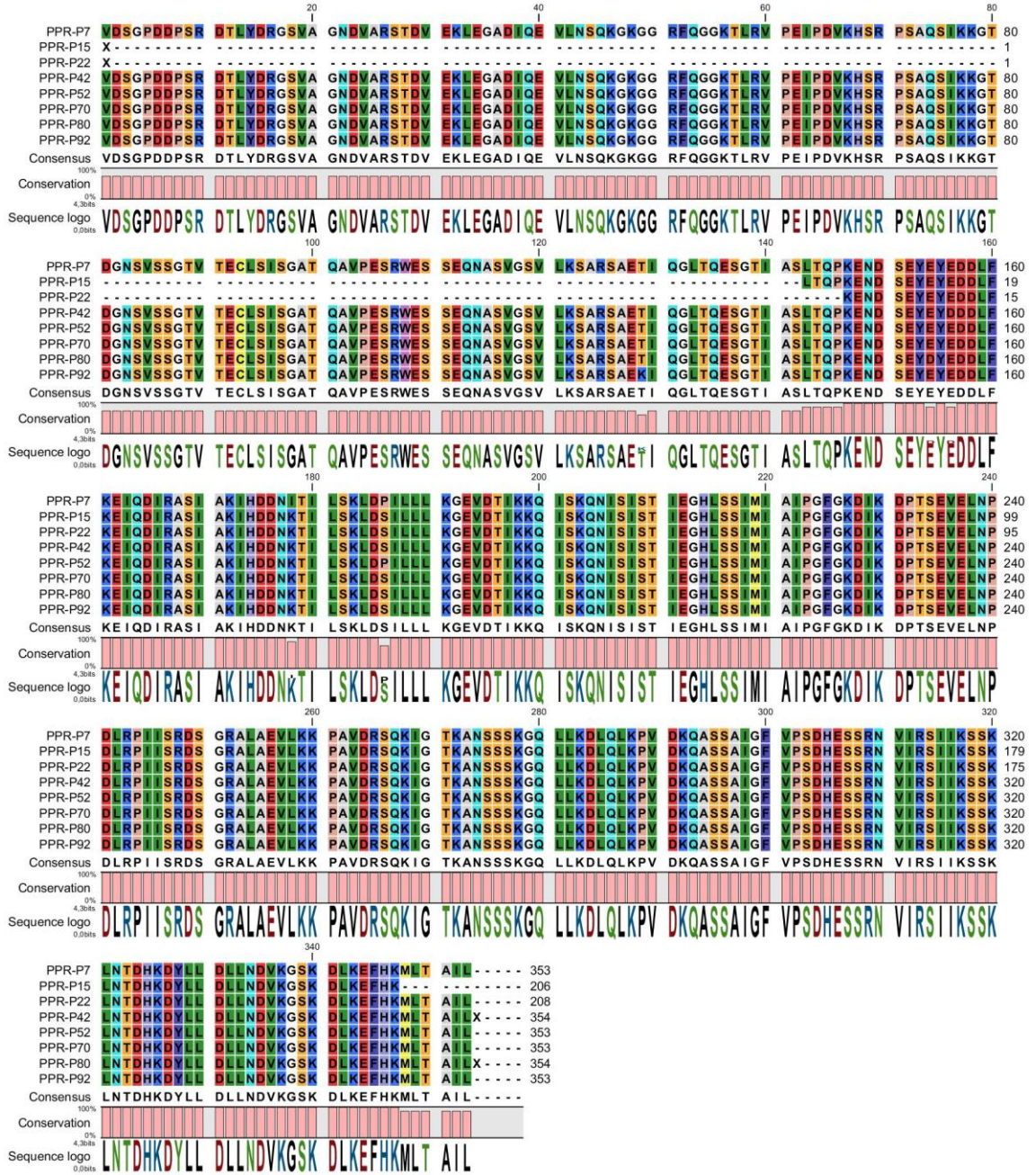
Şekil 3.3 PPRV/TU00'in Vero hücre kültüründe yapılan pasajlarına ait P gen dizinlerinin çoklu karşılaştırması (multiple alignment)



Şekil 3.3'ün devam



**Şekil 3.4** PPRV/TU00'ın Vero hücre kültüründe yapılan pasajlarına ait P gen amino asit dizilerinin çoklu karşılaştırması (multiple alignment)



### 3.2.2. QuantiTect Probe RT – PCR Kit

QuantiTect Probe RT – PCR (QP – RT- PCR ) Kiti ile CORBETT ‘real time’ PCR cihazında 4 hedef gen bölgesinin optimizasyonu tamamlandıktan sonra sahadan toplanan 45 adet örnek bu 4 gen bölgesi bazında PPRV RNA’sı yönünden incelendi. Bu kit ile ters transkripsiyon ve DNA’nın çoğaltılması aşamaları tek tüp içinde yapılabilmektedir.

#### 3.2.2.1. L Gen Bölgesinin ‘ Real time ’ RT-PCR ile Tespiti

QP - RT – PCR Kiti kullanılarak, L gen bölesi için tasarlanan PPR/L/F ile PPR/L/R primerleri ve PPR/L-P probu kullanılarak 55°C’de 30 dakika ters transkripsiyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından da aynı tüp içerisinde 45 döngü olacak şekilde 94°C ‘de 15 saniye, 53° C ‘de 1 dakika olan PCR koşullarında PPRV RNA’sının çoğaltılması gerçekleştirildi. Daha sonra sahadan izole edilen numuneler negatif ve pozitif kontrollerin eşliğinde yukarıda belirtilen reaksiyon koşullarında çalışıldı ve Çizelge 3.7 ‘deki sonuçlar elde edildi. Standart eğri için yapılan klonlamalar sonucu elde edilen plasmidlerden in vitro transkripsiyonda istenen verimlilik sağlanamadığından, standart eğri için yine PPRV RNA ‘sı yönünden pozitif olduğu bilinen virusun 85’ i pasajının 1/10, 1/100, 1/1000 ve 1/10000, 1/100000 ve 1/1000000 seri seyreltmeleri oranlarında CORBETT ‘real time’ PZR cihazında yukarıda belirtilen reaksiyon koşullarında çoklu denemeler yapılarak bu örneklerin döngü eşik değerlerine karşılık (CT: cycle threshold) başlangıçtaki genom kopyaları oluşturuldu (Şekil 3.5). Bu sulandırmalardan 1/10, 1/100, 1/1000 ve 1/10000 seri seyretmeleri her bir gen bölgesi için saha örneklerinin ‘real time‘ PCR aşamasında standart olarak kullanıldı. Bu standart örneklerin viral yükleri  $2,23 \times 10^5$  ile  $2,37$  kopya/ml arasında idi (Çizelge 3.3). Virus RNA’sına ait seri sulandırmalardan oluşan standart doğru şekil 3.6 ’ da verilmiştir. L gen bölgesiyle saha örneklerinin ‘real time’ PCR ‘ı sonucu Ct değerleri 19, 38 ile 34, 46 arasında idi. Elde edilen kopya sayısı ise  $1,65 \times 10^5$  ile  $4,38 \times 10^5$  kopya/ml arasında yer almıştır (Çizelge 3.4). ‘Real time ‘ PCR sonucunda kırmızı renkte gösterilen saha örnekleri, mavi renkte

gösterilen konsantrasyonu belli olan virus sulandırılmalarının oluşturduğu doğrusal düzlemde yer almıştır (Çizelge 3.8). Ayrıca örnekler ‘real time ‘ PCR ‘den sonra kontrol amaçlı olarak agaroz jel elektroforezinde görüntülendi ve her biri 80 bç olan bantlar jelde gözlemlendi (Şekil 3.9).

Deneylerin tekrarlanabilirliğini ölçmek amacıyla deneylerde kullanılan örneklerden her seferinde üç kez olmak üzere viral RNA izolasyonu yapıldı ve ‘real time ‘ PCR sisteminde analiz edilerek deney içi varyasyonlar (intra-assay variability) hesaplandı. Bunun yanında deneyler üç ayrı günde tekrarlanarak deneyler arası varyasyonlar da (inter – assay variability) hesaplandı.

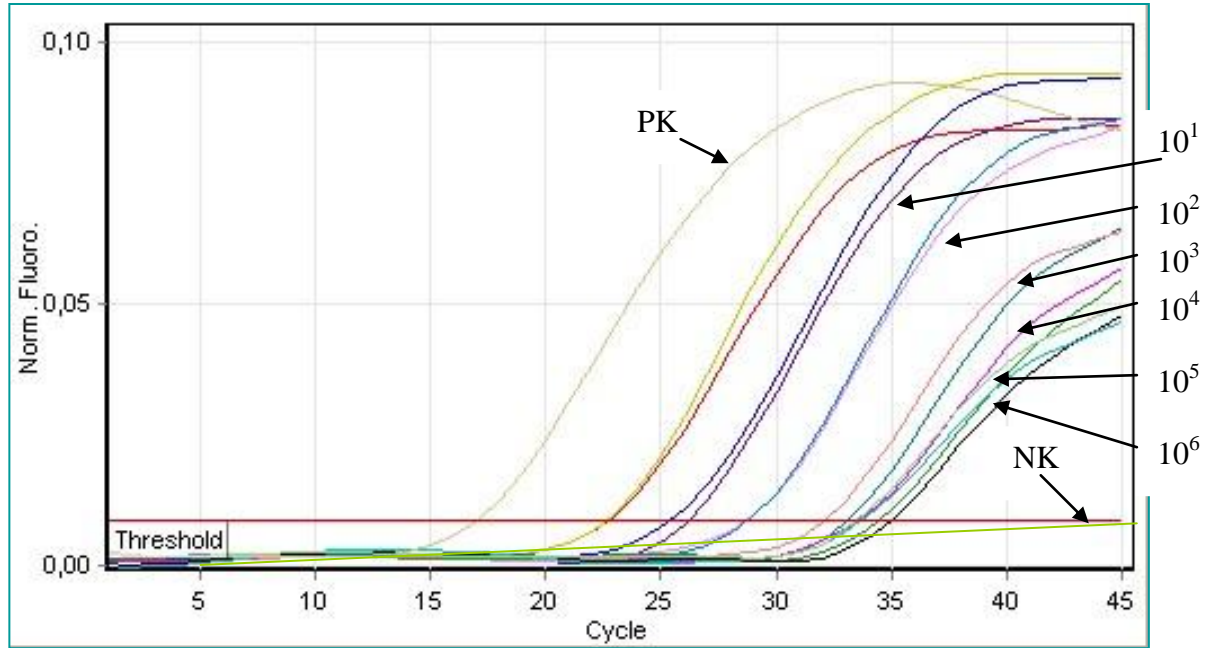
Buna göre QP - RT – PCR Kiti kullanılarak CORBETT ‘real time ‘ PCR ‘de analiz edilen örneklerin 5 adet örneğin viral yükleri  $10^6$  ile  $10^2$  kopya arasında bulunmaktaydı. Bu örneklerin döngü eşik değerlerine (Ct) göre hesaplanan deney içi varyasyon katsayıları (CV), % 0,52 ile 3,21 arasında değişmekteydi. Yine aynı sistemde farklı günlerde yapılan deneyler arasındaki varyasyon ise % 0,51 ile 3,05 arasında değişmekteydi (Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2 ).

**Çizelge 3.1.** Rotorgene 6000 CORBETT ‘real time’ PCR sisteminde hesaplanan deney içi varyasyon değerleri (Ct: Döngü eşik değeri, SD: standart sapma, CV: Varyasyon katsayısı)

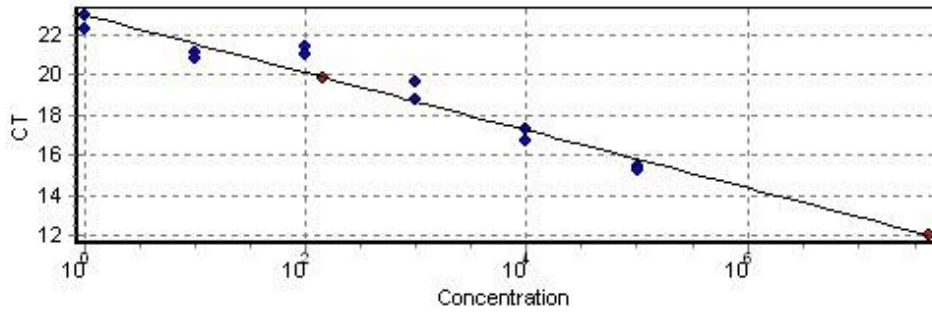
Örnek	Ct değeri -1	Ct değeri -2	Ortalama Ct	S. D.	CV (%)
1	15,46	15,25	15,34	0,08	0,52
2	16,67	17,27	16,80	0,29	1,72
3	19,63	18,71	19,08	0,51	2,67
4	21,43	21,03	21,25	0,16	0,75
5	21,08	20,08	20,76	0,68	3,21

**Çizelge 3.2.** Rotorgene 6000 CORBETT ‘real time‘ PCR sisteminde hesaplanan deneyler arası varyasyon değerleri (Ct: Döngü eşik değeri; SD standart sapma; CV: Varyasyon katsayısı).

Örnek	Ct değeri -1	Ct değeri -2	Ortalama Ct	S. D.	CV (%)
1	15,60	15,32	15,46	0,08	0,51
2	16,30	17,03	16,66	0,27	1,62
3	19,50	18,75	19,12	0,47	2,47
4	21,40	21,09	21,24	0,13	0,61
5	21,15	20,13	20,64	0,63	3,05



**Şekil 3.5.** PPRV RNA’sının Rotor gene 6000 CORBETT ‘real time‘ PCR sisteminde QP - RT-PCR kit ile standart oluşturulması (Her sulandırma iki kez çalışıldı. PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol.  $10^1$ - $10^6$ : sulandırmalar).

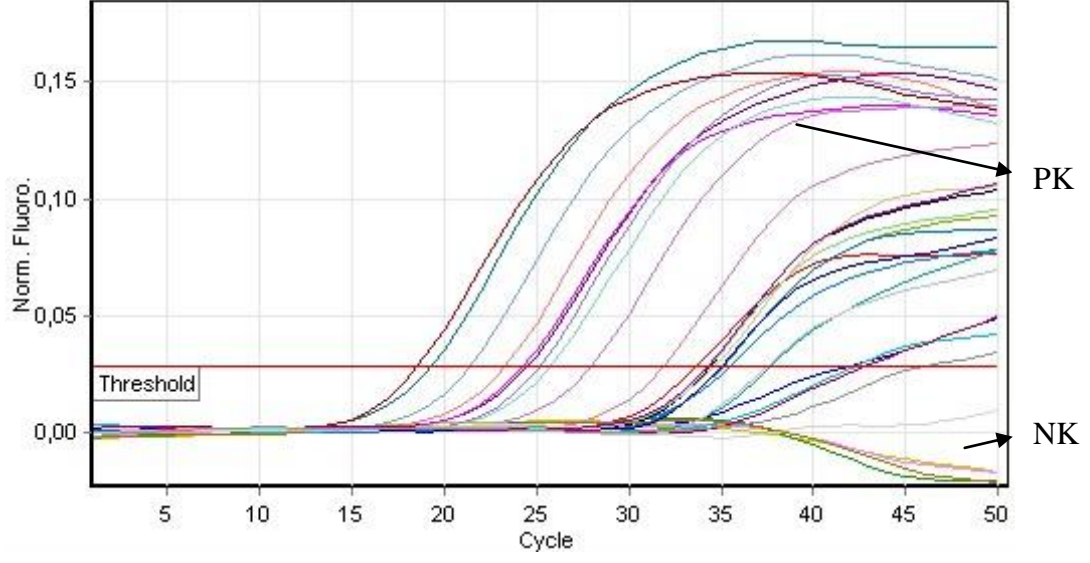


Şekil 3.6 PPR RNA'sı yönünden pozitif olan P85 için standart eğri

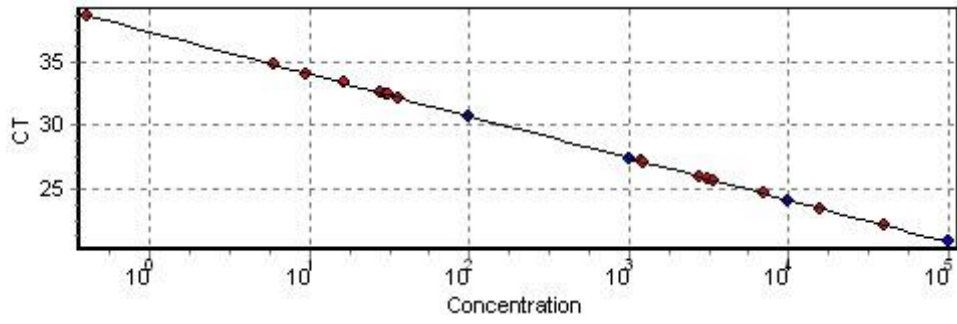
Çizelge 3.3 PPRV'e ait olan sulandırmaların Ct ( eşik değeri ) dağılımı ve kopya sayıları

No	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (copies/ml)	Calc Conc (copies/ml)	% Var
1	Red	ppr-1	Standard	22,80	1,00E+05	2,04E+05	104,0%
2	Yellow	pPR-2	Standard	22,71	1,00E+05	2,23E+05	123,1%
3	Blue	pPR-3	Standard	25,52	1,00E+04	1,65E+04	64,7%
4	Purple	pPR-4	Standard	26,25	1,00E+04	8,35E+03	16,5%
5	Pink	pPR-5	Standard	28,80	1,00E+03	7,91E+02	20,9%
6	Light Blue	pPR-6	Standard	28,87	1,00E+03	7,36E+02	26,4%
7	Teal	pPR-7	Standard	33,17	1,00E+02	1,37E+01	86,3%
8	Light Red	pPR-8	Standard	32,20	1,00E+02	3,38E+01	66,2%
9	Green	pPR-9	Standard	34,52	1,00E+01	3,94E+00	60,6%
10	Magenta	pRR-10	Standard	33,68	1,00E+01	8,57E+00	14,3%
11	Black	pPR-11	Standard	35,06	1,00E+00	2,37E+00	137,3%
12	Cyan	pPR-12	Standard	33,84	1,00E+00	7,38E+00	638,3%
13	Gold	pPR-P85	Unknown	17,08		4,12E+07	
14	Light Green	NEGATIF	Negative Control				















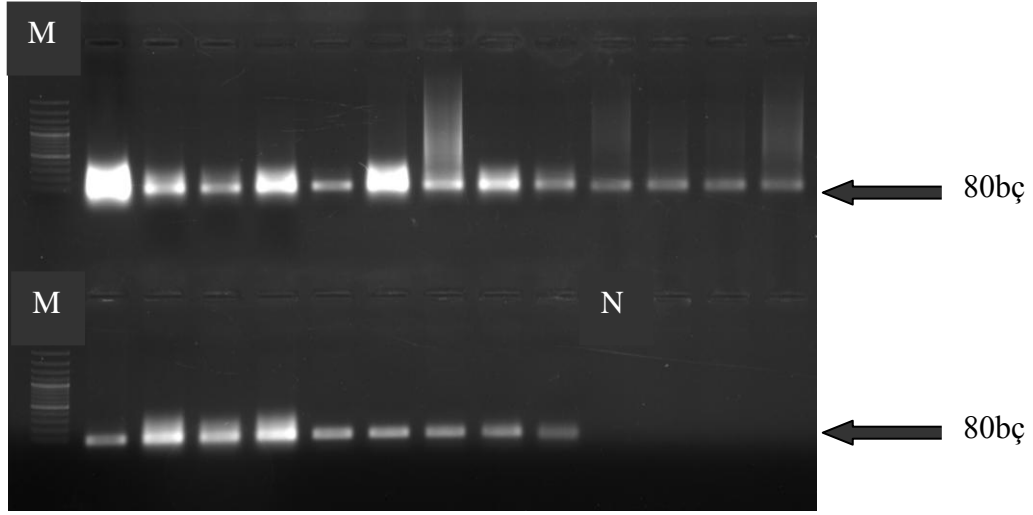
**Şekil 3.7** Saha örneklerinin Rotor gene 6000 CORBETT ‘ real time ‘ PCR sisteminde L gen bölgesi için QP - RT – PCR kit ile çoğaltılması.(PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol).



**Şekil 3.8** L gen bölgesine ait standart eğri ve saha örneklerini doğrusal düzlemde yerleşimi.

**Çizelge3.4** L gen düzeyinde rtRT-PCR ile PPRV yönünden sorgulanan saha örneklerin Ct (eşik değeri) ve kopya sayılarının dağılımı

No.	Colour	Name	Type	Ct	GivenConc (copies/ml)	Calc Conc (copies/ml)	% Var
1		1	Unknown	33,73		2,70E+01	
2		2	Unknown				
3		3	Unknown	42,15		9,14E-02	
4		4	Unknown	24,57		1,31E+04	
5		5	Unknown				
6		6	Unknown	35,53		7,99E+00	
7		7	Unknown	19,38		4,38E+05	
8		8	Unknown	23,39		2,91E+04	
9		9	Unknown				
10		10	Unknown	24,31		1,57E+04	
11		11	Unknown	34,46		1,65E+01	
12		12	Unknown	42,33		8,08E-02	
13		13	Unknown	34,66		1,44E+01	
14		14	Unknown	34,35		1,78E+01	
15		15	Unknown	25,80		5,73E+03	
16		1-10	Standard	21,50	1,00E+05	1,05E+05	4,7%
17		1-100	Standard	25,23	1,00E+04	8,39E+03	16,1%
18		1-1000	Standard	28,07	1,00E+03	1,24E+03	23,5%
19		1-10000	Standard	31,91	1,00E+02	9,21E+01	7,9%
20		pozitif	Positive Control	18,64		7,22E+05	
21		negatif	Negative Control				

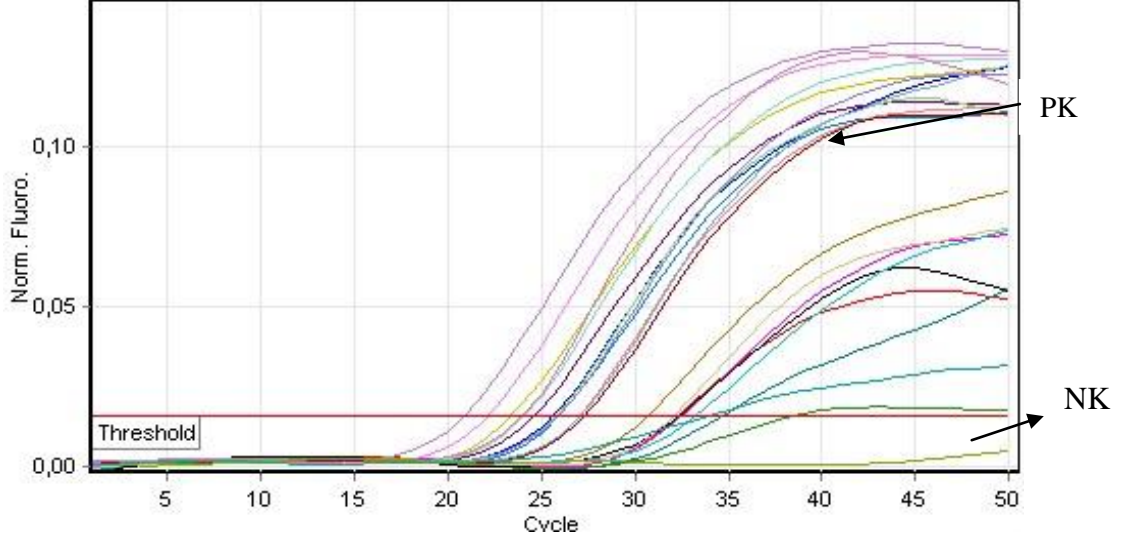


**Şekil 3.9** Saha örneklerine ait PPRV RNA'larının L gen bölgesi için yapılan 'real time ' PCR ürünlerinin % 1.5 'luk agaroz jelde görüntülenmesi (M: DNA Merdiveni, N:Negatif kontrol)

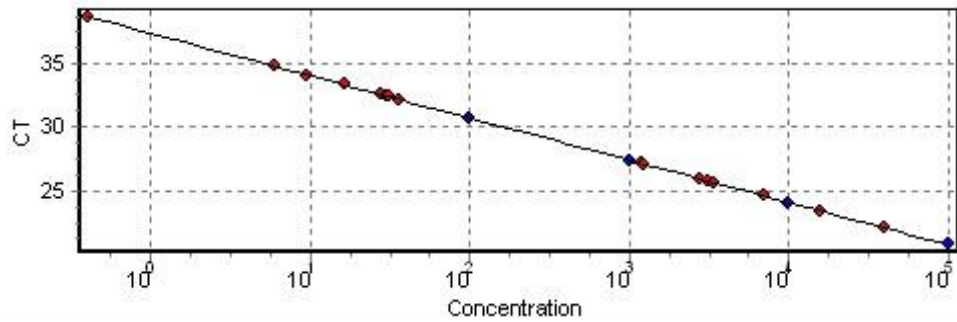
### 3.2.2.2. P Gen Bölgesinin ' Real Time 'RT - PCR ile Tespiti

P gen bölesi için tasarlanan PPR/P/F ile PPR/P/R primerleri ve PPRP-P probu kullanılarak 55° C'de 30 dakika ters transkripsiyon işlemi ardından aynı tüp içerisinde 45 döngü olacak şekilde 94°C 'de 15 saniye, 60°C'de 1 dakika olan PCR koşullarında PPRV RNA'sının çoğaltılması gerçekleştirildi. Daha sonra sahadan izole edilen numuneler negatif ve pozitif kontrollerin eşliğinde yukarıda belirtilen reaksiyon koşullarında çalışıldı ve şekil 2.10 'daki sonuçlar elde edildi. Standart eğri için yine PPR RNA 'sı yönünden pozitif olduğu bilinen virusa 85 pasajın 1/10, 1/100, 1/1000 ve 1/10000 seri seyreltmeleri oranlarında CORBETT ' real time ' PCR cihazında yukarıda belirtilen reaksiyon koşullarında çoklu tekrarlar şeklinde çalışıldı. Saha örneklerinin döngü eşik değerleri 22,18 ile 34,73 arasında idi. edilen kopya sayısı 5,88 ile  $3,92 \times 10^4$  kopya /ml olarak belirlendi (Çizelge 3.5.). Gerçek zamanlı PCR sonucunda kırmızı renkte gösterilen saha örnekleri, mavi renkte gösterilen konsantrasyonu belli olan virus sulandırılmalarının oluşturduğu doğrusal düzlemde yer almıştır (Şekil 3.11). Ayrıca örnekler real time PCR'den sonra kontrol amaçlı olarak

agaroz jel elektroforezinde görüntülendi ve her biri 272 bç olan bantlar gözlemlendi (Şekil 3.12).

























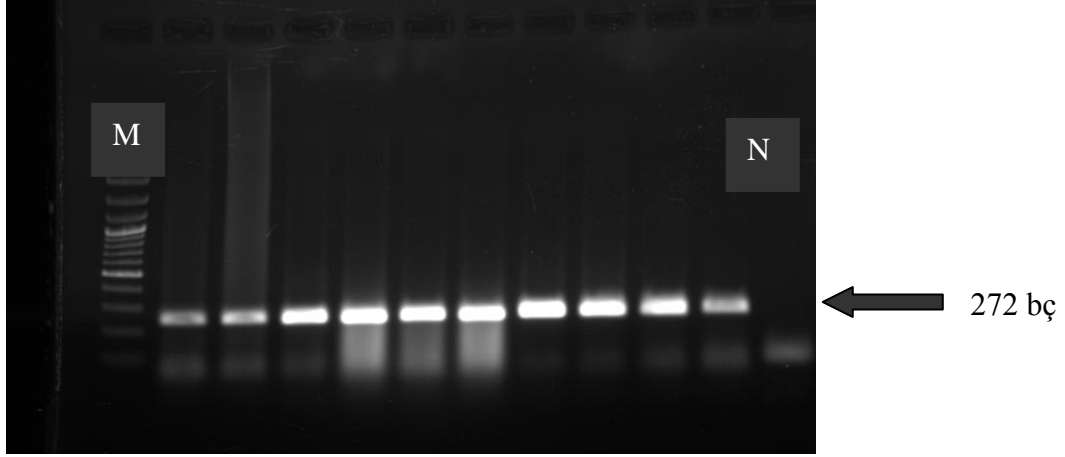
**Şekil 3.10** PPR RNA 'nın Rotor gene 6000 CORBETT 'real time ' PCR sisteminde P gen bölgesi için QP - RT - PCR kit ile çoğaltılması (PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol)



**Şekil 3.11** P gen bölgesine ait standart eğri ve saha örneklerini doğrusal düzlemde yerleşimi

**Çizelge 3.5** P gen düzeyinde rRT-PCR ile PPRV yönünden sorgulanan saha örneklerinin Ct değeri ve kopya sayılarının dağılımı.

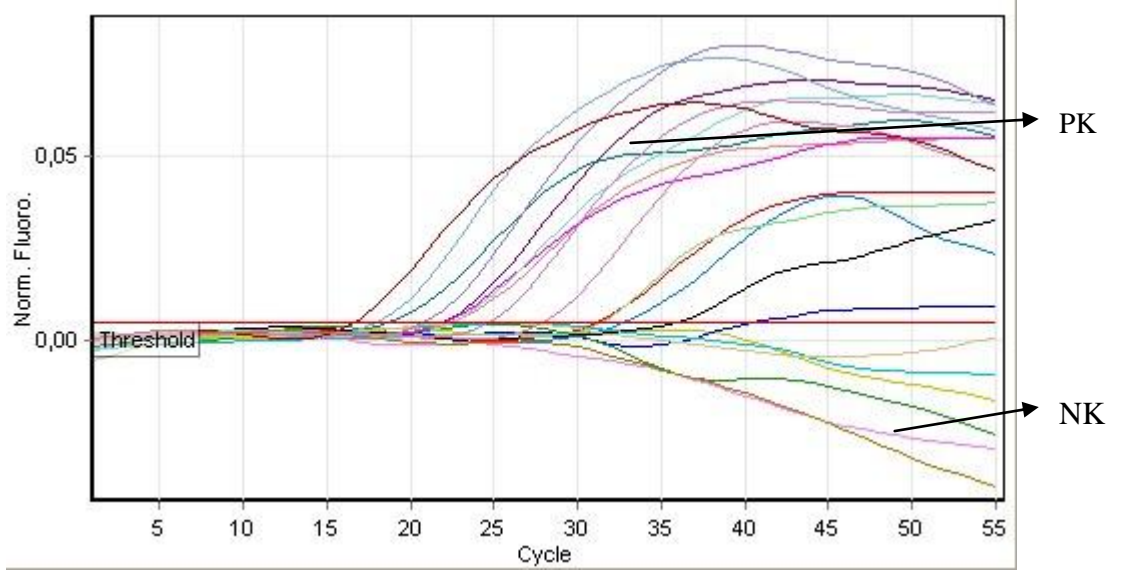
No.	Colour	Name	Type	Ct	GiveConc (copies/ml)	Calc Conc (copies/ml)	% Var
1		1	Unknown	32,35		3,12E+01	
2		2	Unknown	23,47		1,59E+04	
13		3	Unknown	25,68		3,37E+03	
4		4	Unknown	24,66		6,87E+03	
5		5	Unknown	22,18		3,92E+04	
6		6	Unknown	25,97		2,74E+03	
7		7	Unknown	34,73		5,88E+00	
8		8	Unknown	27,10		1,24E+03	
9		9	Unknown	38,55		4,03E-01	
10		10	Unknown	32,53		2,75E+01	
11		11	Unknown	32,38		3,05E+01	
12		12	Unknown	33,28		1,62E+01	
13		13	Unknown	32,14		3,61E+01	
14		14	Unknown	25,80		3,10E+03	
15		15	Unknown	24,13		9,96E+03	
16		16	Unknown	27,14		1,20E+03	
17		17	Unknown	25,95		2,79E+03	
18		1-10	Standard	20,92	1,00E+05	9,51E+04	4,9%
19		1-100	Standard	24,05	1,00E+04	1,06E+04	5,9%
20		1-1000	Standard	27,36	1,00E+03	1,04E+03	3,6%
21		1-10000	Standard	30,75	1,00E+02	9,58E+01	4,2%
22		negatif	Negative Control				
23		pozitif	Positive Control	34,05		9,49E+00	



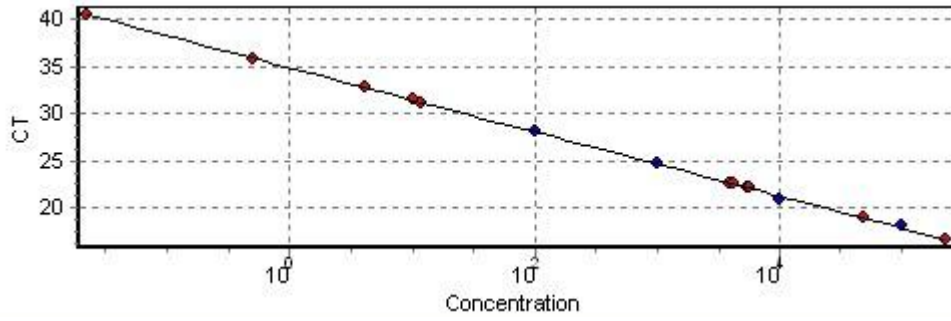
**Şekil 3.12.** Saha örneklerine ait PPRV RNA'larının P gen bölgesi için yapılan 'real time' PCR ürünlerinin % 1.5 agaroz jelde görüntülenmesi ( M: DNA Merdiveni; N: Negatif kontrol).

### 3.2.2.3. M Gen Bölgesinin ' Real Time ' RT - PZR ile Tespiti

M gen bölgesi için tasarlanan PPR/M/F ile PPR/M/R primerleri ve PPR/M-P probu kullanılarak 55°C 'de 30 dakika ters transkripsiyon işlemi yapıldıktan sonra aynı tüp içerisinde 45 döngü olacak şekilde 94°C 'de 15 saniye, 49°C 20 saniye ve 60°C 'de 1 dakika olan PZR koşullarında PPRV RNA 'sının çoğaltılması gerçekleştirildi. Daha sonra sahadan izole edilen numuneler negatif ve pozitif kontrollerin eşliğinde yukarıda belirtilen reaksiyon koşullarında çalışıldı ve Çizelge 3.13'deki sonuçlar elde edildi. Standart eğri için yine PPR RNA'sı yönünden pozitif olduğu bilinen virusa 85 pasajın 1/10, 1/100, 1/1000 ve 1/10000 seri seyreltmeleri oranlarında CORBETT 'real time' PCR cihazında yukarıda belirtilen reaksiyon koşullarında çoklu tekrarlar şeklinde çalışıldı. Saha örneklerinin döngü eşik değerleri 18,84 ile 31,41 arasında idi. Edilen kopya sayısı  $1,01 \times 10^1$  ile  $4,93 \times 10^4$  copy /ml olarak belirlendi (Çizelge 3.6). Real – time sonucunda kırmızı renkte gösterilen saha örnekleri, mavi renkte gösterilen konsantrasyonu belli olan virus sulandırılmalarının oluşturduğu doğrusal düzlemde yer almıştır (Şekil 3.14). Ayrıca örnekler 'real time' PCR'den sonra kontrol amaçlı olarak agaroz jel elektroforezinde görüntülendi ve her biri 176 bç olan bantlar gözlemlendi (Şekil 3.15).
























**Şekil 3.13** PPR RNA 'nın Rotor gene 6000 CORBETT ' real time ' PCR sisteminde M gen bölgesi için QP - RT – PCR kit ile çoğaltılması (PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol)

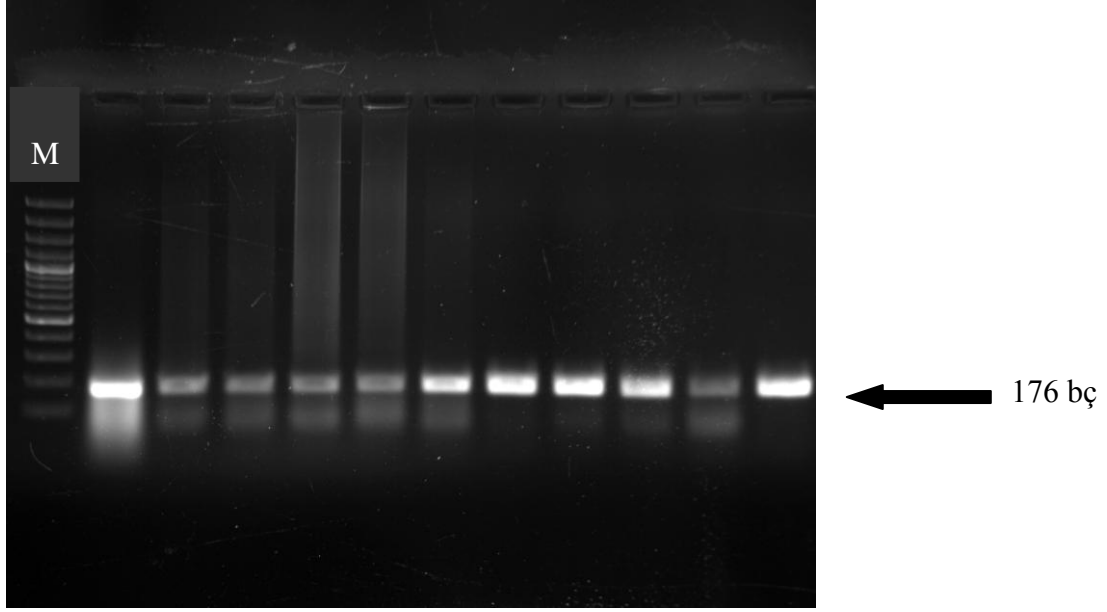


**Şekil 3.14** M gen bölgesine ait standart eğri ve saha örneklerini doğrusal düzlemde yerleşimi

**Çizelge 3.6** M gen düzeyinde rtRT-PCR ile PPRV yönünden sorgulanan saha örneklerinin Ct ( eşik değeri ) ve kopya sayılarının dağılımı

No.	Colour	Name	Type	Ct	GivenConc (copies/ml)	Calc Conc (copies/ml)	% Var
1		1	Unknown	31,18		1,19E+01	
2		2	Unknown				
3		3	Unknown	40,48		2,22E-02	
4		4	Unknown	22,09		5,51E+03	
5		5	Unknown				
6		6	Unknown	32,76		4,08E+00	
7		7	Unknown	18,84		4,93E+04	
8		8	Unknown	22,48		4,24E+03	
9		9	Unknown				
10		10	Unknown	22,01		5,79E+03	
11		11	Unknown	35,88		4,96E-01	
12		12	Unknown				
13		13	Unknown				
14		14	Unknown	31,41		1,01E+01	
15		15	Unknown	22,60		3,89E+03	
16		1-10	Standard	17,98	1,00E+05	8,83E+04	11,7%
17		1-100	Standard	20,87	1,00E+04	1,25E+04	25,0%
18		1-1000	Standard	24,72	1,00E+03	9,28E+02	7,2%
19		1-10000	Standard	28,06	1,00E+02	9,75E+01	2,5%
20		pozitif	Positive Control	16,57		2,29E+05	
21		negatif	Negative Control				



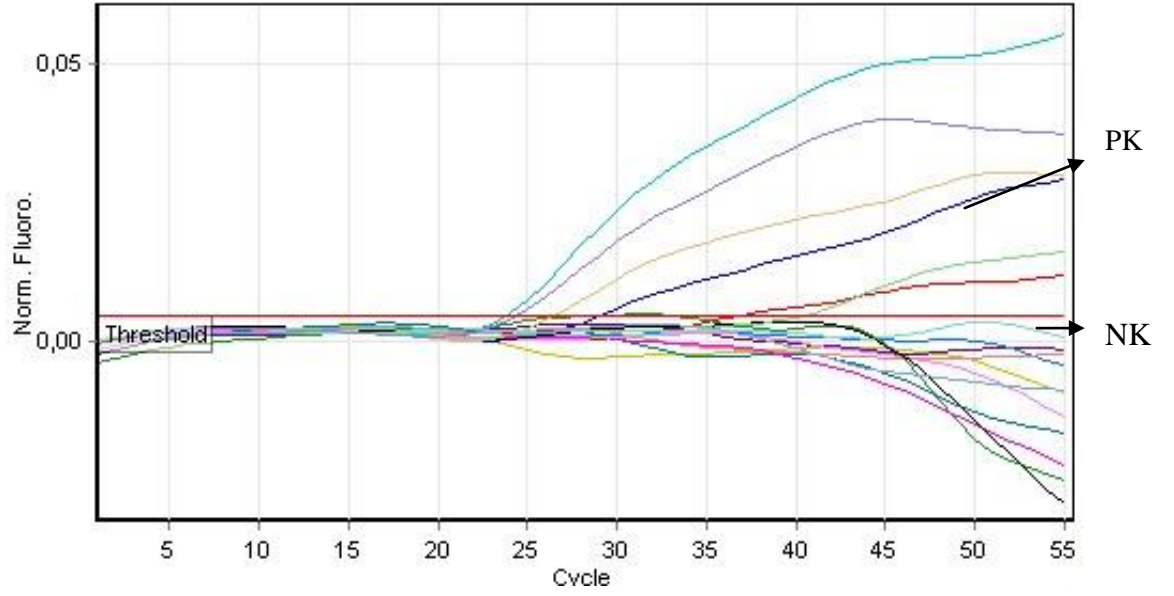


**Şekil 3.15** Saha örneklerine ait PPRV RNA ‘larının M gen bölgesi için yapılan ‘real time ‘ PCR ürünlerinin % 1.5 ‘luk agaroz jelde görüntülenmesi.(M: Merdiven ).

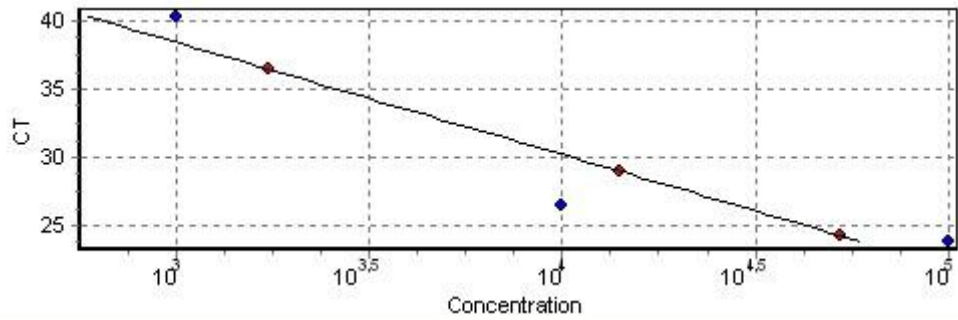
#### **3.2.2.4. N Gen Bölgesinin ‘ Real Time ‘ RT - PZR ile Tespiti**

QP- RT – PCR Kiti kullanılarak, N gen bölesi için tasarlanan PPR/N/F ile PPR/N/R primerleri ve PPRN-P probu kullanılarak 55°C ‘de 30 dakika ters transkripsiyon işlemi yapıldı. Bunu takiben aynı tüp içerisinde 45 döngü olacak şekilde 94°C ‘de 15 saniye ve 60°C ‘de 1 dakika olan PCR koşullarında PPRV RNA’sının çoğaltılması gerçekleştirildi. Daha sonra sahadan izole edilen numuneler negatif ve pozitif kontrollerin eşliğinde yukarıda belirtilen reaksiyon koşullarında çalışıldı ve Şekil 3.16 ‘daki sonuçlar elde edildi. Standart eğri için yine PPR RNA ‘sı yönünden pozitif olduğu bilinen virusa 85 pasajın 1/10, 1/100, 1/1000 ve 1/10000 seri seyreltmeleri oranlarında CORBETT ‘ real time ‘ PCR cihazında yukarıda belirtilen reaksiyon koşullarında çoklu tekrarlar şeklinde çalışıldı. Saha örneklerinin döngü eşik değerleri 28,98 ile 36,45 arasında idi. Tespit edilen kopya sayısı  $1,73 \times 10^3$  ile  $1,40 \times 10^4$  copy /ml olarak belirlendi (Çizelge 4.7). Real – time sonucunda kırmızı renkte gösterilen saha örnekleri; mavi renkte gösterilen konsantrasyonu belli olan virus sulandırılmalarının oluşturduğu doğrusal düzlemde yer almıştır (Şekil 3.17). Ayrıca

örnekler ‘ real time‘ PCR ‘den sonra kontrol amaçlı olarak agaroz jel elektroforezinde görüntülendi ve her biri 296 bç olan bantlar gözlemlendi (Şekil 3.18).




















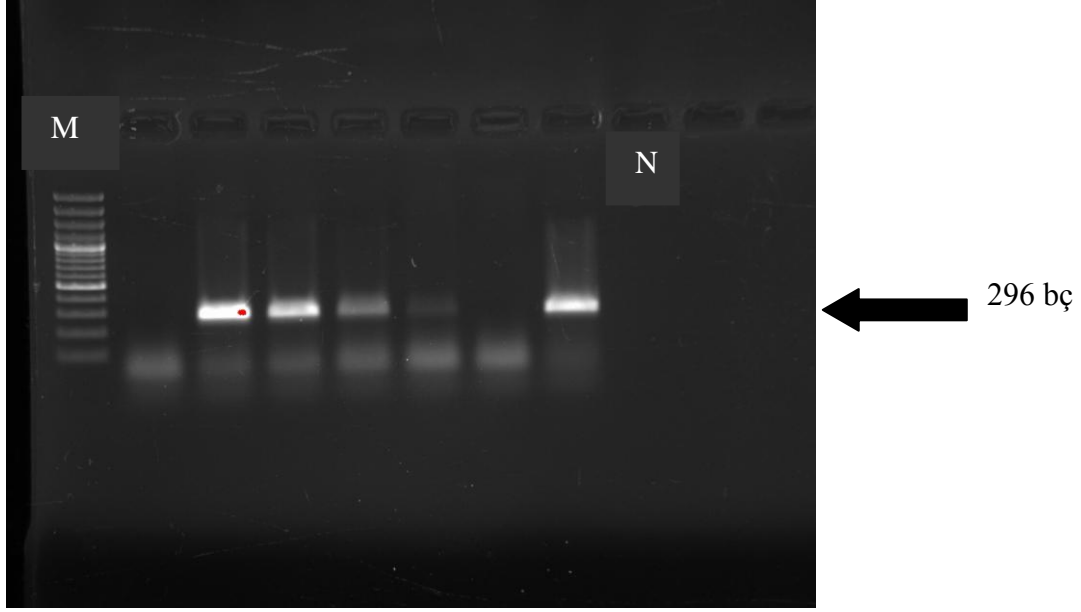
**Şekil 3.16** PPR RNA ‘nın Rotor gene 6000 CORBETT ‘ real time ‘PCR sisteminde N gen bölgesi için QP - RT – PCR kit ile çoğaltılması (PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol)



**Şekil 3.17** N gen bölgesine ait standart eğri ve saha örneklerini doğrusal düzlemde yerleşimi

**Çizelge 4.7** N gen düzeyinde rtRT-PCR ile PPRV yönünden sorgulanan saha örneklerinin Ct (eşik değeri) ve kopya sayılarının dağılımı

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given.Conc (copies/ml)	Calc.Conc (copies/ml)	% Var
1		1	Unknown	36,45		1,73E+03	
2		2	Unknown				
3		3	Unknown	28,98		1,40E+04	
4		4	Unknown				
5		5	Unknown				
6		6	Unknown				
7		7	Unknown				
8		8	Unknown				
9		9	Unknown				
10		10	Unknown				
11		11	Unknown				
12		1-10	Standard	23,83	1,00E+05	5,94E+04	40,6%
13		1-100	Standard	26,47	1,00E+04	2,83E+04	183,4%
14		1-1000	Standard	40,27	1,00E+03	5,94E+02	40,6%
15		1-10000	Standard		1,00E+02		
16		negatif	Negative Control				
17		pozitif	Positive Control	24,28		5,23E+04	



**Şekil 3.18** Saha örneklerine ait PPRV RNA‘larının N gen bölgesi için yapılan ‘real time ‘ PCR ürünlerinin % 1.5 ‘luk agaroz jelde görüntülenmesi (M: DNA Merdiveni, N: Negatif kontrol)

### 3.2.3. ‘ Real Time ’ RT-PZR ‘nin Tanısal Niteliği

Yapılan değerlendirmeler sonunda, daha önce pozitifliği konvansiyonel RT-PCR ile tespit edilen 45 adet kan ve doku örneğinin 10 adedi N genine hedefli, 35 adedi P geni hedefli, 40 adedi M ve 45 adedi L genine hedefli ‘ real time’ RT-PCR reaksiyonları ile pozitif olarak tespit edildi. Diğer taraftan PPRV yönüğünden negatif olarak teste tabi tutulan örneklerin tamamı dört tasarım ile negatif olarak doğrulandı. Elde edilen bulgular Şekil 3.18.’de sunuldu.

Örnek	Sayı	‘Real Time ’ RT-PZR Pozitifliği (%)			
		N Gen	P Gen	M Gen	L Gen
PPRV (+)	45	10 (22)	35 (77)	40 (89)	45 (100)
PPRV (-)	15	15 (100)	15 (100)	15 (100)	15 (100)

**Şekil 3.18** Dört gen düzeyinde yapılan ‘ real time’ RT-PCR ile PPRV RNA’sının tespit oranları

#### 4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Peste des petits ruminants (PPR) (koyun vebası), ülkemizin de içinde bulunduğu olduça geniş bir coğrafyada, özellikle küçük ruminantlarda uzun yıllardır çok büyük kayıplar oluşturan ve ciddi ekonomik sıkıntılar doğuran bir hastalık olarak tanımlanır. Sınırları aşan bir hastalık tablosu oluşturması nedeniyle ülkeler arası ticareti sınırladığından dolayı yüksek ekonomik etkileri ortaya çıkmaktadır. Hastalık özellikle tropikal bölge olarak adlandırılan Afrika, Orta Doğu ve Asya' da yer alan küçük ruminantları etkiler. Ancak yapılan son çalışmalarda virusun Trakya bölgesinde görülmesi, yakın gelecekte Avrupa'nın da bu enfeksiyon tarafından tehdit altında olduğunu göstermektedir (Özkul ve ark., 2002; Yeşilbağ ve ark., 2005).

Sahada PPR virusunun hızlı bir şekilde tespit edilmesi, PPR' ın kontrolünde oldukça önemlidir. Böylece salgınların sebep olduğu muhtemel ciddi ekonomik kayıplar azaltılabilir. Sonuç olarak PPR virusunun teşhisi için hızlı, duyarlı ve hassas metotlara ihtiyaç duyulur (Diallo, 1995).

Virusun hücre kültürlerinden izolasyonu teknik olarak zor ve zaman kaybına yol açan bir metot olarak rutin tanı aracı olmaya uygun değildir. Bunun yanında spesifik antikörlerin kullanıldığı farklı ELISA teknikleride kullanılmaktadır. Aynı zamanda virusun hızlı ve spesifik olarak ortaya konması için bir kaç RT – PCR yöntemi geliştirilmiştir(Kwiatek ve ark. ,2010).

Taqman ' real time ' RT-PCR sistemi, PCR ürünlerinin miktarının belirlenmesinde oldukça duyarlı ve hızlı bir sistemdir. Bu nedenle PPRV RNA'sının kantitatif analizinde yeni bir alternatif yöntem olarak kullanılmıştır. Labaratuvar çalışmamızda kullandığımız Taqman oligoproları, 5' ve 3' ucunda floresan özellikli madde içeren dizi spesifik oligoprolarıdır. Burada DNA polimeraz enziminin 5'→3' nükleaz aktivitesinden yararlanılmaktadır. DNA polimeraz enzimi hedef DNA üzerinde ilerlerken bağlı olan oligoprola geldiğinde onu nükleaz aktivitesiyle yıkımlar. Böylece belli bir uzaklıkta söndürücü (quencher) tarafından florasan ışınması engellenen (reporter) floroforun serbest kalması sağlanmış olur. Serbest kalan

florofor her döngüde artan düzeyde cihaz tarafından tersbit edilen belli bir dalga boyunda ışınma gerçekleştirir.

‘ Real time ’ PZR sisteminde amplifikasyonun ve analizin kapalı bir sistemde gerçekleştirilmesi konvansiyonel tekniğe göre daha avantajlı ve güvenlidir. ’ Real time’ PZR ile RNA’nın kalitatif olarak ölçümü yapılabilir ve yüksek duyarlılıkta daha hızlı bir şekilde virus nükleik asidi ortaya konulabilir (Kwiatek ve ark., 2010). Çalışmamızda uygun enzimlerin kullanımı ile ters transkripsiyon ve polimerizasyon aşamalarının aynı tüp içerisinde yapılması ile zaman tasarrufu sağlanmış, kontaminasyon riski de en az seviyeye indirilmiştir.’ Real time ’ PCR aşaması tek tüp içerisinde yapılabildiği için PCR sonrası jel elektroforezi gibi işlemlere de gerek kalmamıştır.

PPR virusuna ait olan RNA’nın saha örneklerinden tespiti amacıyla farklı gen bölgeleri RT – PZR için hedef olarak kullanılmıştır. Bunlar arasında fusion (F), nükleokapsid (N) ve matriks (M) proteinlerine ait gen bölgeleri en başta gelenlerdir (Balamurugan ve ark. 2006; Couancy – Heymann ve ark., 2002; Forsyth ve Barrett , 1995). Marine morbilliviruslar için de yüksek derecede korunmuş olan fosfoprotein hedef gen olarak tercih edilmiştir (Barrett ve ark., 1993 ; Saliki ve ark., 2002).

‘ Real time ’ RT-PCR sistemi ise son zamanlarda paramyxoviridae ailesindeki virusların tespiti amacıyla yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Dolphin morbillivirus (DMV) ve porpoise morbillivirus (PMV)’un saha örneklerinden tespiti amacıyla, taqman ’ real time ‘ PCR sistemi geliştirilmiştir. Bu çalışmalarda N gen bölgesi tercih edilmiştir (Grant ve ark. 2009). N gen bölgesi genomun 3’ ucunda yer alır ve viral proteinler içinde en fazla salınan proteindir. Aynı zamanda yüksek oranda korunmuş bir bölgedir. Yüksek duyarlılığa sahip ‘ real time ’ RT – PCR için en önemli hedef gen bölgelerinden biridir (Kwiatek ve ark., 2007; Bao ve ark., 2008). Morbillivirusların N proteininin amino – terminal kısmı (1-400 aa) oldukça iyi korunmuş olmasına rağmen, karboksi - terminal parçası (404–530) oldukça değişkenlik gösterir. Bu değişken bölge PPRV ‘nin sınıflandırılmasında kullanılmıştır. Yine bu bölge taqman problemlerinin kullanıldığı ’ real time ’ RT – PCR

için hedef olarak seçilmiş ve PPR ve Rinderpest viruslarının ayırımı gerçekleştirilmiştir. Ancak bu bölgeyi temel alarak tasarlanan primer ve problarda yanlış eşleşmeye bağlı olarak sorunlar meydana gelmektedir. Bu da virus pozitifliğinin ortaya konmasında bir takım problemler oluşturmaktadır (Olivier ve ark., 2010). Yapılan benzeri çalışmalar, Kuzdüz (Hughes ve ark., 2004) ve mavi dil (Jimenez - Clavero ve ark., 2006) viruslarının taqman tabanlı PCR reaksiyonlarıyla tespitinde, nokta mutasyonlar başarısızlıkların en önemli nedenlerinden biri olarak ortaya konmaktadır.

Diğer önemli nokta tasarlanan primer ve problemlerin oluşturduğu amplicon büyüklüğüdür. Reaksiyonun istenen düzeyde gerçekleşmesini etkileyen önemli faktörlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Genellikle küçük amplicon büyüklüğü ile elde edilen sonuçlar daha verimli olmaktadır. N gen bölgesinin teşhis amacıyla kullanıldığı çalışmalarda 50 bp'lik amplicon büyüklüğünün hassas ve güvenilir sonuçlar verdiği görülmüştür (Olivier ve ark. 2010 ). Kızamık (Measles) virüsü için tasarlanan ' real time ' PCR primerlerinin oluşturduğu 67 bp 'lik büyüklük etken teşhisinde oldukça başarılı olmuştur (Thomas ve ark., 2007). Dolphin morbillivirus (DMV) ve porpoise morbillivirus (PMV) gibi deniz memelilerinde hastalık tablosu oluşturan virusların klinik örneklerden tespitinde N gen bölgesini hedef alan primer problemler kullanılmış ve amplicon büyüklüğü 173 bp olarak ortaya konmuştur (Grant ve ark. 2009).

Çalışmamızda kullandığımız primer ve prob tasarımlarından N gen bölgesi için kullanılan oligonükleotidlerin pozitifliğin ortaya konmasında sıkıntılı olduğu görüldü. N gen için tasarlanan primer ve problemlerin değişik bölgelerde yer alması, sonuçlarda gözlenen sıkıntılı durumların nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bölgedeki mutasyonların yanlış eşleşmelere neden olması söz konusudur. Dolayısıyla N gen bölgesini hedef alan tasarımlarda bu noktanın dikkate alınması, pozitifliğin ortaya konmasında son derece önemlidir. Yine N tasarımının ortaya koyduğu 296 bp'lik amplicon büyüklüğü de bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır. L, M ve P tasarımlarının pozitifliği ortaya koymadaki oranlarında, amplicon büyüklüğünün oldukça önemli olduğunu göstermiştir. Toplam 45 adet saha

örneğinin L, M, P ve N gen bölgeleriyle yapılan ‘ real time ’ RT – PCR’leri sonucunda sırasıyla 45, 40, 35 ve 10 adet pozitiflik tespit edilmiştir. Bu sonuç amplikon büyüklüğünün küçük olduğu primer – prob tasarımlarının daha verimli olduğu düşüncesiyle uygunluk göstermektedir. Zira L, M, P ve N gen bölgeleri 80,176, 272 ve 296 bp’lik amplikon büyüklükleri meydana getirmektedir.

Çalışılan virusa, gen bölgesine ve gen bölgesinin uzunluğuna göre klinik örneklerde virusun ortaya konması değişkenlik göstermektedir. Klinik örneklerde DMV RNA’sı Ct (Eşik değeri) değeri 20.01 ve 31.52 arasında tespit edilmiştir (Grant ve ark. 2009). PPRV RNA’sının tespitinde ise 37. 26 Ct değeri ile 8,1 RNA kopya/ml belirlenmiştir. Bu çalışmalarda N gen bölgesi hedef olarak alınmıştır (Bao ve ark., 2008). Sunduğumuz bu çalışmada ise L, M, P ve N gen bölgelerine hedeflenen tasarımlar ile aynı örneklerde tespit edilen RNA miktarları sırasıyla  $1,65 \times 10^1$ ,  $1,01 \times 10^1$ , 5,88 ve  $1,73 \times 10^3$  kopya /ml olarak tespit edilmiştir. Diğer taraftan Ct değerleri de aynı sıra dâhilinde 34,46, 31,41, 34,73 ve 36,45 olarak saptanmıştır.

‘ Real time ‘ PCR hassas ve etkili bir yöntem olmasına karşın, konvansiyonel PZR ‘ye göre sıkıntılar meydana gelmektedir. Aynı saha örnekleri üzerinde karşılaştırılmalı yapılan testlerde; konvansiyonel PCR ile elde edilen pozitiflik, gerçek zamanlı PCR’ ye göre daha fazldır. Özellikle prob ve primer tasarımlarında; tercih edilen gen ya da genin içindeki seçilen bölgenin değişken olması testin verimliliğini düşürmektedir. Başlıca sıkıntı genel olarak probun hedef bölgeye bağlanmasında meydana gelmekte ve sinyalizasyonda sorun çıkmaktadır (Olivier ve ark., 2010). Çalışmamızda 45 adet örneğin konvansiyonel PCR ile pozitif bulunmasına rağmen, ‘ real time ‘ PCR’de pozitif olarak ortaya konulamamasında prob tasarımlarından kaynaklanan tasarımsal olumsuzluklar akla gelmektedir.

Kullandığımız dört gen bölgesinden özellikle L, M ve P bölgelerinin daha verimli çalıştığı ve düşük düzeydeki RNA’yı tespit ettiği ortaya konulmuştur. M bölgesinde üç segmentli olarak çalışıldığında verimli sonuçlar gözlenmiştir. RNA yapı olarak dondurma, çözme, ısı ve mekanik etkiler vb. faktörlere karşı dayanıksız



olmasına karşın, çalışmamızda kullandığımız RNA örneklerinin bir yılı aşan bir süreç sonunda testlerde verimli bir şekilde kullanılması da RNA' nın uzun süre – 80 °C 'de saklanabileceğini göstermiştir.

PPRV'nin laboratuarda hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilmesi, hastalığın özellikle ekonomik açıdan önemli olan hayvanlarda meydana getirdiği yıkım ve kayıp düşünülürse oldukça önemlidir. Çalışmamızda şimdiye kadar çalışılmamış olan farklı gen bölgelerini bir arada çalışarak, etkin bir şekilde PPR virusu ortaya koyabileceğimiz bir sistemi geliştirmiş olduk.

Viral hastalıklardan korunmada tercih edilen aşılarda zayıflatılmış olan virusların kullanıldığı preparatlar gelmektedir. Virulensin azaltılmasında uygulanan en yaygın yöntem; hücre kültürlerinde virusun artan pasajlarının elde edilmesidir. Paramyxoviridea ailesinde bunun en güzel örneği Rinderpest (Sığır vebası) olarak bilinen hastalıkta görülmektedir. Virusun saha suşunun Vero hücre kültüründe 90'a varan pasaj sayılarında virulensinde azalma olduğu görülmüş ve geniş çaplı olarak Afrika, Orta Doğu ve Avrupalıların bir bölümüyle Hindistan' da sığırların aşılama ve eradikasyonunda kullanılmıştır. Özellikle 60. pasajdan sonra incelenen viruslarda yapılan incelemeler ve deneme hayvanı değerlendirmelerinin virulens azalmasına yol açtığı gözlenmiştir (Baron ve ark., 2005). Daha sonra saha ve aşı suşunun (hücre kültürü pasajları sonucunda elde edilen virus) genom analizleri yapılarak karşılaştırıldığında N, P, F, H ve L gen bölgelerinde değişimlerin olduğu ve bu bölgelerdeki nükleotid bazındaki farklılıkların birikimi sonucu virusun etkinliğinde azalmalar gözlenmiştir (Baron ve ark., 1996).

Hücre kültüründe yapılan pasajlarla viruslarda meydana gelen attenüasyonun bir diğer örneği Gallid herpesvirus type – 2 'de (GaHV – 2 ) gösterilmiştir. Virusun virulent olan 648A suşunun hücre kültürlerinde yapılan 101 pasajı sonucunda; 70 'inci pasajdan sonra incelenen virusa ait gen bölgelerinde mutasyonların olduğu ve deneme hayvanı uygulamalarında virusun klinik bulgu oluşturmadığı tespit edilmiştir. Virus a ait olan 40 ve 50 'inci pasajlarda virulent olan viruse göre az olmakla birlikte ılımlı bir onkogenik etki gözlenmiştir. ( Spatz S., J. 2010 ).

Çalışmamızda, P genini mümkün olduğunca kapsayacak bir primer çifti ile artan pasaj sayılarındaki nükleotid değişimleri ve bunların antijenik yapıya olan etkileri incelendi. Ancak elde edilen dizin analizi karşılaştırılmalarında bazı nükleotid değişiklikleri tespit edilse de bunların P geni ile ilintili antijenik yapılar üzerine her hangi bir etkisi saptanamadı. Sonuç olarak hem Rinderpest virusu hem de GaHV -2 ile yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar tek gen etrafında değil birçok gendeki değişimleri içermekte ve bu bölgelerde oluşan mutasyonların birikimi sonucunda virulensde azalma gözlenmektedir. Yine oluşan mutasyonların fenotipte karşılığının olmadığı durumlarda söz konusu olmuştur. Dolayısıyla PPRV 'deki virulens azalmasının gerçekten olup olmadığının anlaşılabilmesi için daha geniş ölçekte genomun taranması gereği ortaya çıkmıştır. PPRV 'de meydana gelen değişimler başka genlerde meydana geliyor olabilir ya da P geninin çalışmadığımız bölgelerinde oluşuyor olma olasılığı vardır. Bu tablonun ortaya konması ve olası virulens azalmasına yol açan bölgelerin tespiti aşı suşlarının ortaya çıkışını sağlayabilir ve Sığır Vebası (Rinderpest) eradikasyonu gibi bu önemli hastalığında ortadan kaldırılmasını sağlayabilir.

Sonuç olarak;

- 1- Araştırma kapsamında yapılan tasarımlardan en yüksek tanısal değeri olan sistemin L genini hedefleyen olduğu ortaya konmuştur. Amplikon büyüklüğü arttıkça PPR virus RNA'sının " real time " RT – PCR ile tespit edilme oranında ciddi bir düşüş edilmektedir.
- 2- Prob lokalizasyonu, bir diğer önemli unsur olduğu ve forwad ve reverse primerlerin herhangi birisi ile aynı yönde ve aralarında en fazla 15 – 20 nükleotid mesafe bulunmasının termodinamik olarak reaksiyon pozitifliğine olumlu etkilerinin olduğu;
- 3- Tek bir reaksiyon bileşiminde cDNA sentezi ve takip eden PCR uygulamasının, bu reaksiyonların ayrı ayrı yer aldığı uygulamalara göre daha az duyarlı olduğu,

- 4- Diğer taraftan, reaksiyonların iki basamaklı olarak gerçekleştirildiği sistemlere göre, tek adımda uygulanan sistemlerin kontaminasyon riskini azaltmada daha verimli olması gerektiği,
- 5- Verimli sonuçların elde edilmesi için ampikon büyüklüğünün  $100\pm 20$  civarında olması,
- 6- Kullanılan RNA rneklerinin bir yıl süre zarfında  $- 80\text{ }^{\circ}\text{C}$  'de tutulmuş olması ve daha sonra teste kullanılmasının ardından RNA kalitesinde bu virus için bir problem olmadığı,
- 7- PPR/TU00 izolatu ile yapılan 92 seri pasajı sonrasında virusun atenasyonundan sorumlu olabilecek mutasyonların analiz edilebilen P gen düzeyinde meydana gelmediği,
- 8- Hücre kültürü tabanlı yapılan atenüasyon çalışmalarında oluşan değişimlerin farklı gen blgerinde ve farklı düzeylerde olması nedeniyle mümkün olduğunca genomun incelenmesinin önemi sonuçlarına varıldı.

## KAYNAKLAR

- ABEGUNDE ,A. A., ADU, F. D. (1977). Excretion of the virus of peste des petits ruminants by goats. *Bull. Anim. Hlt. Prod. Afr.* **25**: 307 – 311.
- ALÇIĞIR ,G., VURAL ,S.A., TOPLU ,N. (1996 ). Türkiye’de kuzularda Petse des petits ruminants virus enfeksiyonunun patomorfolojik ve immunohistolojik tanımı. Ankara Üniv. Vet. Fak. Der. **4**:181 -189.
- ABRAHAM, G. (2005 ) Epidemiology of Petse des Petits Ruminants Virus in Ethiopia and Molecular Studies on Virulence. Le Titre de Docteur de L’Institut National Polytechnique de Toulouse, Phd Thesis
- BALAMURUGAN, V., SEN, A., SARAVANAN, P., SINGH, R., P., SINGH R., K., RASOOL, T., J., BANDYOPADHYAY, S., K.. (2006). One – step multiplex RT – PCR assay for the detection of peste des petits ruminants virus in clinical samples. *Vet. Res. Commun.* **30**, 655 – 666.
- BAILEY, D., BANYARD, A., DASH, P., OZKUL, A ., BARRETT, T. (2005). Full genome sequence of peste des petits ruminants virus, a member of the Morbillivirus genus *Virus Research.* **110**: 119- 124.
- BAO, J., LI, L., WANG, Z., BARRETT, T., SUO, W., Z., LIU Y., LIU, CHUNJU, L., LI, J. (2008). Development of one – step real –time RT –PCR assay for detection and quantitation of peste des petits ruminants virus. *Jour. of Virol. Meth.* **148**: 232 – 236.
- BARON, M., D., KAMATA , Y., BARRAS, V., GOATLEY, L., BARRETT, T. (1996). The genome sequence of the virulent Kabete ‘O ‘ strain of the rinderpest virus: Comparison with the derived vaccine. *Jour. of Gen. Virol.* **77**: 3041 – 3046.
- BARON, M., D., BANYARD, A., C., PARIDA S., AND BARRETT., T. (2005). The Plowright vaccine strain of Rinderpest virus has attenuating mutations in most genes. *Jour. of Gen. Virol.* **86**: 1093 – 1101.

- BARRETT, T., VISSER, I. K., MAMAIEV, L., GOATLEY, L., VAN, BRESSEM, M., F., OSTERHAUS, A., D. (1993). Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. *Virology* **193**, 1010 – 1012.
- BRAIDE, V.B. (1981). Peste des petits ruminants. *World anim. Review.* **39**: 25 -28.
- BRAIDE, K., RAJ, G. D., GANESAN, P. I., THIAGARAJAN ,V., NAINAR, A. M., NACHIMUTHU , K., (2001). Comparison of virus isolation and polymerase chain reaction for diagnosis of peste des petits ruminants. *Acta Virologica* **45**: 169 – 172.
- BARRETT, T., BLIXENKRONE – MOLLER , M., DI GUARDO, G., DOMINGO ,M., DUIGNAN, P., HALL, A., MAMAIEV, L., OSTERHAUS , A.D. M. E. (1995). Morbillivirus in aquatic mammals: report on round table discussion. *Vet. Microbiol.* **44**: 261 – 265.
- BARRETT, T., ROMERO, C. H., BARON, M.D., YAMONOUCI, K., DIALLO, A., BOSTOCK ., C.S., BLACK, D. (1993 ). The molecular biology of rinderpest and peste des petits ruminants, *Ann, Med. Vet.* **137**: 77 – 85.
- FIELDS, B., N., KNIPE, D., M., HOWLEY, P., M. ( 2007). *Fields Virology*.
- BUNDZA, A., AFSHAR, DUKES, T., W., MYERS, D. J., DULAC SUSI, G., BECKER, A. W. E. (1988 ). Experimental PPR (goat plague) in Goats and sheep. *Canadian J. Vet. Res.* **52**: 46 -52.
- COEN, M. D. , RAMIG F. R. (2000). *Fundamental Virology*, Chapter 23 Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication. 689 – 717.
- COUACY – HYMANN, E., ROGER , F., HURARD , C., GUILLOU , J., P., LIBEAU, G., DIALLO, A. (2002). Rapid and sensitive detection of the peste des petits ruminants virus by a polymerase chain reaction assay. *J.Virol. Methods.* **100**: 17 - 25.
- DHAR, P., SREENIVASA, B. P. , BARRETT, T., CORTEYN, M. , SINGH, R.P., BANYOPADHYAY, S.K. (2002). Recent epidemiology of peste des petits ruminants virus (PPRV). *Vet. Micr.* **88**: 153 – 159.

- DUROJAIYE, O. A. (1984).Detection of the antigen of peste des petits ruminants virus in tissue by indirect immunofluorescence technique. *Niger. Vet. J.*, **13** : 77 – 80
- EZEIBE, M.C.O., WOSU, L.O., ERUMAKA, I.G. (2004). Standardization of the hemagglutination test for peste des petits ruminants (PPR). *Small Rum. Res.* **51**: 269 - 272
- GARGADENNEC , L., LALANLE , A., (1942 ). La peste des petits ruminants. Bulletin des Services Zoo Technique et des Epizootie l'Afrique Occidentale Française 5: 16 -21.
- GÜLYAZ , V., ÖZKUL, A., (2005) .Pathogenicity of a local Peste des Petits Ruminants Virus Isolate in Sheep in Turkey. *Trop. Anim Hlth. Prod.***37**: 541 – 547.
- GRANT, R., J., BAYAND, A., C., BARRETT, T., SALIKI, J., T., ROMEO, C., H.(2009).Real – time RT – PCR assays for the rapid and differential detection of dolphin and porpoise morbillivirus. *J. of Virol. Meth.***156**: 117 – 123.
- HUGHES, G., J., SMITH, J., S., HANLON , C., A., RUPPRCHT , (2004 ). Evaluation of a TaqMan PCR assay to detect rabies virus RNA: Influence of sequence variation and application to quantitation of viral loads. *J. Clin. Microbiol.* **42** (1) 299 – 306.
- JIMENEZ – CLAVERO, M., A., AGÜERO, M., SAN MIGUEL , E., MAYAROL, T., LOPEZ, M., C., RUANO, M., J., ROMERO, E., MONACO, F., POLCÌ, A., SAVINI, G., GOMEZ – TEJEDOR , C. ( 2006 ).High throughput detection of bluetongue virus by a new real – time fluorogenic reverse transcription – polymerase chain reaction : application on clinical samples from current Mediterranean outbreaks.*J. Vet. Diagn. Invest.* **18** (1) ,7 – 17.
- KITCHING, R. P. (1988).The economic significance and control of small ruminant virus in North Africa and West Asia. In: Thompson, F.S. (Ed).Increasing for hexamer genome length: rule of six revisited. *J.Virol.* **72**: 891 – 899.

- KWIATEK, O., MINET, C., GRILLET, C., HURARD, C., CARLSSON, E., KARIMOV, B., ALBANIA, E., DIALLO, A., LIBEAU G., (2007). Peste des petits ruminants (PPR) outbreak in Tajikistan. *J.Comp. Pathol.* **136** ( 2- 3 ), 111 – 119.
- KWIATEK, O., KEITA, D., GIL P., FERNANDEZ – PINERO, J., CLAVERO, M., A., J., ALBINA, E., LIBEAU, G. (2010). Quantitative one – step real – time RT –PCR for the fast detection of the four genotypes of PPRV. *J. Virol. Meth.* **165**: 168 – 177.
- LEFEVRE, P. C.(1987) Peste des petits ruminants et infection bovine, caprine et ovine ( Synthèse bibliographique), Institut de Elevage et de Médecine vétérinaire des pays tropicaux, 94704 Maison – Alfort, France, p.: 99
- LEVEFRE, P. J., DIALLO, A., (1990). Peste des petits ruminants. *Rev. Sci.Tech.Off.int.Epiz.* **9(4)** : 951 – 965
- LIBEAU, G., LEFEVRE, P. C. (1990). Comparison of rinderpest and peste des petits ruminants viruses using anti – nucleoprotein monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* **25**: 1-16.
- MANOHARAN, S., JAYAKUMAR, R., GOVINDARAJAN, R., KOTEEESWARAN, A. (2005). Hemagglutination as a confirmatory test for peste des petits ruminants diagnosis. *Small. Rum. Res.* **59**: 75 -78.
- MURPHY, F., A., PAUL, E., GIBBS, J., HORZINEK, MARIAN, C., STUDDERT, MICHAEL, J., *Veterinary Virology*, 3rd Edition, Academic Press, 1999.
- MUTHUCHELVAN, D., SANYAL, A., SARKAR, J., SREENIVASA, B.P., BANDYOPADHYAY, S.K. (2006). Comparative nucleotide sequence analysis of the phosphoprotein gene of peste des petits ruminants vaccine virus of Indian origin. *Res. in Vet. Sci.* **81**: 158 - 164
- OIE (2004) Peste des petits ruminants. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Part 2, Section 2.1, Chapter 2.1.5
- OIE (2008). Peste des petits ruminants.

- KWIATEK, O., KEITA, D., GIL, P., FERNANDEZ – PINERO, J., ANGEL JIMENEZ CLAVERO, M., ALBINA, E., LIBEAU, G. ( 2010 ) .Quantitative one – step real – time RT – PCR for the fast detection of the four genotypes of PPRV. *Jour. of Virol. Meth.* **165** : 168 - 177
- OPESINA , B.A., PUTT , S.N.H.(1985).Outbreaks of peste des petits ruminants in village goat flocks in Nigeria .*Trop. Anim. Hlth. Prod.***17**: **219** – 224.
- ÖZKUL ,A. , AKÇA Y., ALKAN F., BARRETT, T., KARAOĞLU , T., DAĞALP , S., B., ANDERSON , J., YEŞİLBAĞ , K., ÇOKÇALIŞKAN, C., GENÇAY , A., BURGU, İ., (2002) . Prevalence, Distribution and Host Range of Peste des petits ruminants virus, Turkey .*Emerge. Infect Dis.* **8 (7)** : 708 – 712 .
- RAJ , G. D., THIAGARAJAN , V., CHANDRASEKHAR, M., NAGARAJAN, T., NACHIMUTHU, K.(2001). Production and characterization of monoclonal antibodies to a indian isolate of peste des petits ruminants virus. *Small Rum.Res.* **40**: 223 – 231.
- SALIKI, J.T., BROWN, C.C., HOUSE , J.A., DUBOVI, E. J. (1994). Diffrential immunohistochemical staining of peste des petits and rinderpest antigen in formalin – fixed, parafin ambeded tissue using monoclonal and polyclonal antibodies. *J.Vet. Diagn. Invest.* **6**: 96 – 98.
- SALIKI, J., T., COOPER, E., J., GUSTAVSON, J., P.( 2002).Emerging morbillivirus infections of marine mammals : development of two diagnostic approches. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **969**, 51 – 59.
- SCOTT, G.R. (1990 ).Peste des petits ruminants (Goat plague ) virus.In : Virus Infections of Ruminants Edd: Z.Dinter , B .Morein Elsevier Science Publisher , Amsterdam ,Oxford ,New York ,Tokyo, Chapter , 33 p: 355 – 361.
- SHAILA, M.S., SHAMKI , D., FORSYTH, M.A., DIALLO A., GOATLEY , L., KITCHING , R.P., BARRETT T., (1996). Geographical distribution and epidemiology of peste des petits ruminants viruses. *Virus Res.* **43**, 149- 153



- SPATZ, S., J., (2010 ). Accumulation of attenuating mutations in varying proportions within a high passage very virulent plus strain of Gallid herpesvirus type – 2. *Virus Research*. P: 135 – 142
- TAYLOR , W. P., (1984 ). The distribution and Epidemiology of peste des petits ruminants. *Prev. Vet. Med.* 2: 157 – 166.
- TAYLOR, W. P., ROEDER, P.L., RWEYEMAMU, M.M., J.N. (2002).The control of rinderpest and peste des petits ruminants in Tanzania between 1997 and 1998 . *Tropical. Anim. Hlth. Prod.*, **34 (6)** : 471- 487.
- TATAR , N., ALKAN , F., (1999). Koyun ve keçilerde küçük ruminants vebası (petse des petits ruminants ) ve sığır vebası enfeksiyonlarının serolojik ve virolojik olarak araştırılması. *Etlik Vet. Mikrob. Derg.* **10 (2)** : 35 -60.
- THOMAS, B., BEARD, S., JİN, L., BROWN, K., B., and BROWN, D., W., G. (2007). Development and Evaluation of a Real - Time PCR Assay for Rapid Identification and Semi – Quantitation of Measles. *Virus . J. of Med. Virol.* **79**: 1587 – 1592
- YEŞİLBAĞ ,K., YILMAZ , Z., GÖLCÜ , E., ÖZKUL , A., (2005) .Peste des petits ruminants outbreak in western Turkey. *Vet . Rec.* **157 (9)**, 260 – 261.
- KAWAOKA, Y., (ed). ( 2004 ). Biology of negative strand RNA virusus: The power of reverse genetics. p: 71- 72

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Ad-Soyad:** ENDER DİNÇER

**Adres:** Hürriyet cad.Yılmazoğlu Ap.2/ 3 Sincan - ANKARA

**Telefon:** 0312 269 12 12

**GSM:** 0535 202 95 26

**E-posta:** enderdin@gmail.com

**Doğum Tarihi/ Yeri:** 03.04.1978 ANKARA / Güdül

### EĞİTİM

Lisansüstü : Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Doktora Programı

Lisans : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2003

Lise : Çok programlı Güdül Lisesi Elektrik Bölümü

Ortaokul : Güdül ilköğretim Okulu

İlkokul : Güdül İlköğretim Okulu

**Yabancı Diller:** İngilizce, Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı (ÜDS)

Sonucu: 80

### YAPILAN STAJLAR

(2001 Yaz Dönemi) Güdül Tarım İlçe Müdürlüğü

### BİLİMSEL AKTİVİTELER

**TOGAV 1050241-Türkiyede Mavidil virus modelleme Epidemiyolojisi ve profilaktik yaklaşımlar: Farklı inaktivasyon yöntemlerinin kapsid proteinleri üzerine etkisi**

**Erasmus Staj Hareketliliği Programı Çerçevesinde İngiltere Warwick Üniversitesi Biyoloji Fakültesi Viroloji bölümünde 3 ay ( 05.03.2009 – 07.06.2009 ) süreyle Laboratuvar çalışması.**

**Hantavirus Sempozyumu, 29 Mart 2010.**

### İLGİ ALANLARI VE ÇALIŞMA KONULARI

- Ankara üniversitesi viroloji anabilimdalı: PPRV ve Herpes virus moleküler biyoloji teknikleri, sekans teknikleri, real –time pcr tekniği ve izolasyon.

- UK – Warwick Üniversitesi Viroloji Bölümü: Reverse Genetics
- Refiksaydam Hıfısihha Enstitüsü: CCHF Moleküler Biyoloji teknikleri

## KİŞİSEL DENEYİMLER

**Bilgisayar:** MS Office, Windows, Internet Explorer

## BASILI MAKALELER

ÖZKUL, A., DEMİR, B., KARAOĞLU, T., FERAY, A., **DINCER, E.**, ÖNCEL, T., AND BURGU, İ.(2008 ). Maturation of Immunoglobulin G Avidity after Inactive gE Deleted Bovine Herpesvirus Type 1 (BHV-1) Marker Vaccination *Viral Immunology*. Vol 21, No 1.

OZKUL, A., ERTURK, A., CALISKAN, E., SARAC, F., CEYLAN, C., MERTENS, P., KABAKLIB, O., **DINCER, E.**, CIZMECI, S., G.(2009). Segment 10 based molecular epidemiology of bluetongue virus (BTV) isolates from Turkey: 1999–2001. *Virus Research* **142**: 134–139.

OZKAYA, E., **DINCER, E.**, CARHAN, A., UYAR, Y., ERTEKA, M., WHITEHOUSEC, C., A., AND OZKUL, A. (2010). Molecular Epidemiology of Crimean -Congo Hemorrhagic Fever Virus in Turkey: Occurance of Local Topotype. *Virus Research*. Vol 149, **p**: 64 – 70.

## BASKIDA OLAN MAKALELER

CONCURRENT INFECTIONS OF CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGAC FEVER AND VISCERAL LEISHMANIASIS IN A TURKISH GIRL