



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**PESTE DES PETITS RUMINANTS
VİRUSUNUN AŞI VE SAHA SUŞLARININ
MOLEKÜLER AYRIMI**

Mustafa Emin ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Nisan-2018
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Mustafa Emin ÖZ tarafından hazırlanan “Peste des Petits Ruminants Virusunun Aşı ve Saha Suşlarının Moleküler Ayrımı” adlı tez çalışması 12/04/2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan- Danışman

Doç. Dr. Emrah TORLAK

.....

Üye

Doç. Dr. Oğuzhan AVCI

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Ali Tefvik UNCU

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Mehmet KARALI
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Mustafa Emin ÖZ
Tarih: 12/04/2018

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PESTE DES PETITS RUMINANTS VİRUSUNUN AŞI VE SAHA SUŞLARININ MOLEKÜLER AYRIMI

Mustafa Emin ÖZ

**Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

Danışman: Doç. Dr. Emrah TORLAK

2018, 83+xii Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Emrah TORLAK

Doç. Dr. Oğuzhan AVCI

Dr. Öğr. Üyesi Ali Tefik UNCU

Koyun ve Keçi Vebası (Peste des Petits Ruminants; PPR) genellikle yüksek ateş, depresyon, göz-burun lezyonları, nekroze-eroziv stomatit, enterit, solunum sistemi semptomları, pis kokulu ishal ve ölüm ile karakterize; yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden bulaşıcı bir viral hastalıktır. İlk olarak 1942 yılında Fildişi Sahilleri'nde tanımlanmış ve daha sonraki yıllarda Afrika'nın doğusu, Arap Yarımadası, Orta Doğu ve Güney Doğu Asya'da bildirilmiştir. Hastalık Türkiye'de, ilk kez resmi olarak Eylül 1999'da rapor edilmiştir.

PPR virusu (PPRV), *Paramyxoviridae* ailesinin *Morbillivirus* genusunda yer alır. Tek bir serotipi bulunan virusun; füzyon (F) ve nükleokapsid (N) gen sekanslarının referans alındığı filogenetik analizlerinde dört genetik hatta ayrıldığı görülmektedir. Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilen PPRV suşlarıyla yapılan çalışmalarda, bu suşların IV. genetik hatta yer aldığı tespit edilmiştir. Ülkemizde hastalıkla mücadele kapsamında 2010 yılından beri aşılama kampanyaları yapılmaktadır. Kullanılan aşı suşu (Nigeria75/1) genetik hat I'de yer almaktadır.

PPRV'nin laboratuvar teşhisinde etkin ve hızlı sonuçların elde edildiği Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon - RT-PZR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction) modifikasyonları rutin tanıda diğer teşhis metotlarının yerini almıştır. PZR ürünleri ve denatürasyonlarının incelenmesi; hassas ve özgün sonuçlar verebilen floresan sistemler, teknolojik yenilikler ve moleküler çalışmalar sayesinde gelişim sürecine devam etmektedir. Yüksek kapasiteli, güvenilir ve hızlı bir yöntem olan Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (High Resolution Melting – HRM), gerçek zamanlı PZR ile kombine uygulanabilen bir yöntemdir. HRM analizleri ile mutasyon taraması ve genotiplendirme başta olmak üzere moleküler düzeyde birçok çalışma yapılmaktadır.

Bu çalışmada, PPRV'nin doğal enfektif saha suşları ile aşı suşunun F gen bazlı moleküler ayırımına yönelik gerçek zamanlı RT-PZR ile kombine HRM analizi geliştirilmiştir. Bu sayede PPRV'nin laboratuvar teşhisinde yeni bir yaklaşımla hastalığın kontrol ve eradikasyonuna katkı sağlanması hedeflenmiştir.

Anahtar kelimeler: F gen, Geçek Zamanlı RT-PZR, Genetik Hat IV, HRM, Küçük Ruminant Vebası

ABSTRACT

MSc THESIS

MOLECULAR DIFFERENTIATION OF VACCINE AND FIELD STRAINS OF PESTE DES PETITS RUMINANTS VIRUS

Mustafa Emin OZ

**The Graduate School Of Natural And Applied Science Of
Necmettin Erbakan University
The Degree Of Master Of Science
In Molecular Biology And Genetics**

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Emrah TORLAK

2018, 83+xii Pages

Jury

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Emrah TORLAK

Assoc. Prof. Dr. Oğuzhan AVCI

Assit. Prof. Ali Tevfik UNCU

Peste des Petits Ruminants (PPR) usually is a contagious viral disease characterized by high fever, depression, eye and nasal lesions, necrotic erosive stomatitis, enteritis, pneumonia, malodorous diarrhea and death, with high morbidity and mortality. PPR was first described in the Ivory Coast in 1942 and later reported in the east of Africa, the Arabian Peninsula, the Middle East and South East Asia. PPR, first time in Turkey has been officially reported in September 1999.

PPR virus (PPRV) has been classified within the genus *Morbillivirus* in the family *Paramyxoviridae*. While PPRV has only one serotype, the phylogenetic analysis of the virus with based on the fusion (F) and nucleocapsid (N) genes sequences indicates that the virus has four distinct genetic lineages. Studies with virus strains isolated from different regions of Turkey indicates that these strains represented lineage IV on PPRV. Vaccination has been carried out against the PPR disease where in Turkey since 2010. And we know this vaccine strain is represented lineage I (Nigeria75/1) on PPRV.

RT-PCR modifications that provides effective and rapid results in laboratory diagnosis for PPRV, are used more frequently than other diagnostic methods in routine diagnosis. The investigation of the denaturation of PCR products continues to develop thanks to fluorescent systems that provide sensitive and specific results, and technological innovations, and molecular studies. The High Resolution Melting (HRM) analysis performed in combination by real-time PCR is a method which rapid, reliable and high capacity. A lot of investigation can be done with by using HRM analysis at the molecular studies. Especially in mutation screening and in genotyping.

In this study, we have developed real-time RT-PCR combination with HRM analysis, which detection F gene based molecular difference of vaccine and natural infective field strains of PPRV. And we have aimed to contribute to the control and eradication of the disease with a new approach in PPRV's laboratory diagnosis.

Keywords: F gene, Real-time RT-PCR, Lineage IV, HRM, Peste des Petits Ruminants

ÖNSÖZ

Çalışmanın tüm aşamalarına destek ve yardımlarıyla katkı sağlayan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Emrah TORLAK'a, HRM analizlerinin gerçekleştirilmesinde bilgi ve tecrübesini paylaşan Necmettin Erbakan Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Ali Tevfik UNCU'ya, hücre kültürü çalışmalarının yürütülmesinde yardım eden Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Oğuzhan AVCI'ya, laboratuvar çalışmaları ve tez yazım aşamasında özverili yardım ve tavsiyeleriyle destek olan Dr. Müge DOĞAN'a ve saha örneklerinin temini ile laboratuvar çalışmalarının yürütülmesini sağlayan Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Tez çalışmaları boyunca sabırla anlayış gösteren sevgili eşim ve kızlarıma sonsuz teşekkür ediyorum.

Mustafa Emin ÖZ
KONYA-2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Koyun ve Keçi Vebası Hastalığı	3
2.1.1. Hastalığın tanımı ve önemi	3
2.1.2. Hastalığın bulaşması	4
2.1.3. Klinik belirtiler	4
2.1.4. Hastalığa karşı koruyucu aşı	5
2.1.5. Türkiye’de koyun ve keçi vebası	6
2.2. Viral Yapı.....	6
2.2.1. Sınıflandırma.....	6
2.2.2. Viral proteinler	6
2.2.2.1. Yapısal viral proteinler.....	8
2.2.2.1.1. Nükleoprotein (N protein).....	8
2.2.2.1.2. Fosfoprotein (P protein)	9
2.2.2.1.3. Polimeraz protein (Large-L protein)	9
2.2.2.1.4. Matriks protein (M protein)	9
2.2.2.1.5. Hemaglutinasyon protein (H protein)	10
2.2.2.1.6. Füzyon protein (F protein)	10
2.2.2.2. Yapısal olmayan viral proteinler.....	11
2.2.3. Viral replikasyon	11
2.3. PPRV’nin Moleküler Metotlarla Teşhisi	12
2.3.1. Taqman oligoproplarının çalışma prensibi.....	13
2.3.2. PPR virusunun RT-PZR analizlerinde hedeflenen genler.....	14
2.4. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (High Resolution Melting – HRM)	15
2.4.1. DNA Tm derecesi	17
2.4.2. Denatürasyon eğrisi (HRM eğrisi).....	18
2.4.3. Normalize ve türev eğriler	19
2.4.4. HRM’de kullanılan nükleik asit floresan boyalar	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Aşı Suşu	23
3.2. Saha Suşları.....	23
3.2.1. Saha suşlarının hücre kültürü	27

3.2.1.1. Hücre kültüründe kullanılan vasatlar ve kimyasallar.....	27
3.2.1.2. Hücrelerin çoğaltılması ve pasajlanması.....	28
3.2.1.3. Hücrelerin dondurulması ve çözündürülmesi	29
3.2.1.4. İnokulum hazırlanması ve monolayer hücre kültürüne inokulasyon	29
3.3. Moleküler Tanımlama.....	30
3.3.1. Moleküler analizlerde kullanılan kit ve sarf malzemeler	30
3.3.2. Moleküler analizlerde kullanılan cihazlar	32
3.3.3. Viral RNA ekstraksiyonu	33
3.3.3.1. RNA dilüsyonlarının hazırlanması.....	33
3.3.4. Viral RNA'nın gerçek zamanlı RT-PZR ile tespit edilmesi	33
3.3.5. Viral RNA'nın konvansiyonel RT-PZR ile tespit edilmesi	34
3.3.5.1. RT-PZR ürünlerinin görüntülenmesi	35
3.4. PPRV Aşısı ve Saha Suşlarının Moleküler Ayrımı	36
3.4.1. Primer tasarımı	36
3.4.2. Primer optimizasyonu	37
3.4.3. Gerçek zamanlı RT-PZR ve HRM analizi	38
3.4.3.1. Gerçek zamanlı RT-PZR analizi	38
3.4.3.2. HRM analizi	39
3.4.4. RFLP RT-PZR analizi.....	40
3.4.5. Saha suşlarının dizin analizi.....	41
3.4.5.1. PZR ürünlerinin saflaştırılması	41
3.4.5.2. Dizin analizinin gerçekleştirilmesi.....	41
3.4.5.3. PPRV F gen soyağacı ve network oluşturulması	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	48
4.1. Saha Suşlarının Tanımlanması.....	48
4.1.1. Saha suşlarının hücre kültürü bulguları.....	48
4.1.2. Saha suşlarının RT-PZR bulguları	49
4.1.2.1. Gerçek zamanlı RT-PZR bulguları	49
4.1.2.2. Konvansiyonel RT-PZR bulguları	50
4.2. Aşısı ve Saha Suşlarının Moleküler Ayrımı	50
4.2.1. Primer çiftinin optimizasyon bulguları	50
4.2.2. Gerçek zamanlı RT-PZR ve HRM analiz bulguları.....	51
4.2.2.1. Gerçek zamanlı RT-PZR bulguları ve standart eğri oluşturulması.....	51
4.2.2.2. HRM analiz bulguları.....	53
4.2.3. RFLP RT-PZR analiz bulguları	57
4.2.4. Dizin analizi, soyağacı ve network bulguları.....	57
4.3. Tartışma	64
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	68
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	83

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A:	Adenin
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
dd H ₂ O:	Deiyonize su
dk:	Dakika
C:	Sitozin
CO ₂ :	Karbon dioksit
CT:	Threshold Cycle (Eşik döngü)
G:	Guanin
gr:	Gram
KCl :	Potasyum klorür
KDa :	Kilo dalton
KH ₂ PO ₄ :	Potasyum dihidrojen fosfat
NaCl :	Sodyum klorür
NaOH :	Sodyum hidroksit
Na ₂ HPO ₄ :	Disodyumhidrojen fosfat
Ng:	Nano gram
nm :	Nano metre
nt :	Nükleotid
M:	Molar
mg:	Mikro gram
mM:	Mikro Molar
ml:	Mililitre
pH :	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
pmol:	Pikomol
sn:	Saniye
T:	Timin
°C :	Derece santigrat
µl:	Mikrolitre

Kısaltmalar

AB:	Avrupa Birliği
bç :	Baz çifti
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA:	Komplementer Deoksiribonüklik Asit
CPE :	Sitopatik Etki
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
dNTP :	Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA:	Etilendiamin tetra asetik asit
EMPRES :	Emergency Prevention System for Animal Health
FAM:	Carboxyfluorescein
FAO :	Food and Agriculture Organization
FBS:	Fötal bovine serum
GCP:	Genotype confidence percentage
HRM:	High Resolution Melting (Yüksek Çözünürlüklü Erime)
NCBI:	National Center Biotechnology Information
OIE :	Office Internationale des Epizooties - World Organisation for Animal Health
ORF:	Open reading frame
PBS:	Fosfat tamponu solüsyonu
PPR:	Peste des Petits Ruminants-Koyun Keçi Vebası
PPRV :	Peste des Petits Ruminants Virus
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RdRp :	RNA Dependent RNA Polymerase
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA :	Ribonükleik Asit
RNAase :	Ribonükleikasiti Parçalayan Enzim
RNP:	Ribonükleoprotein
RPV :	Rinderpest Virus
RT :	Reverse Transcriptase
RT- PCR :	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SNP:	Single nucleotide polymorphism
SLAM:	Signaling lymphocytic activation molecule
TBE :	Tris-Borat-EDTA
TAMRA:	Carboxy-Tetramethyl-Rhodamine
Tm:	Temperature melting
UTR :	Untranslated region
UV :	Ultraviyole
Vero :	Africa Green Monkey Kidney

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 3.1. Saha örneklerine ait bilgiler	24
Çizelge 3.2. PBS hazırlamada kullanılan kimyasallar	28
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primer setleri	31
Çizelge 3.4. Analizlerde kullanılan diğer cihaz ve gereçler.....	32
Çizelge 3.5. Gerçek zamanlı RT-PZR protokolü	34
Çizelge 3.6. Konvansiyonel RT-PZR protokolü	35
Çizelge 3.7. Tris-Borat-EDTA (TBE) Solüsyon Hazırlama Formülasyonu	36
Çizelge 3.8. Gradient RT-PZR protokolü	37
Çizelge 3.9. Gerçek zamanlı RT-PZR protokolü	39
Çizelge 3.10. HRM analiz protokolü	40
Çizelge 3.11. RE analiz protokolü	41
Çizelge 3.12. Dizin analizi reaksiyon protokolü	42
Çizelge 3.13. PPRV F gen için GenBank'a rapor edilen suşlar.....	44
Çizelge 4.1. PPRV F gen aşısı ve saha suşları arasındaki nükleotid değişimleri	57
Çizelge 4.2. PPRV F gen network analizi haplogrupları	62

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. PPR virusu (a) ve proteinleri (b).....	8
Şekil 2.2. PPRV replikasyonu.....	12
Şekil 2.3. Taqman sisteminin çalışma prensibi.....	14
Şekil 2.4. Denatürasyon eğrisi analizi.....	19
Şekil 2.5. Normalize eğriler.....	20
Şekil 2.6. Türev eğriler.....	20
Şekil 2.7. Boya doyumluk modeli.....	22
Şekil 4.1. A: Vero hücre kontrol. B: Vero hücre kültürüne inokulasyonu takiben 5.gün hücre görünümü.....	48
Şekil 4.2. Saha suşlarının gerçek zamanlı RT-PZR analizi.....	49
Şekil 4.3. Saha suşlarının RT-PZR jel elektroforezi.....	50
Şekil 4.4. Primer optimizasyonu jel elektroforezi.....	50
Şekil 4.5. HRM ile kombine gerçek zamanlı RT-PZR.....	51
Şekil 4.6. Gerçek zamanlı RT-PZR’de kullanılan pozitif kontrolün sensitivitesi	52
Şekil 4.7. Gerçek zamanlı RT-PZR standart eğri.....	52
Şekil 4.8. PPRV aşısı ve saha suşlarına ait dizin analizi.....	53
Şekil 4.9. PPRV aşısı ve saha suşları denatürasyon eğrileri.....	54
Şekil 4.10. PPRV aşısı ve saha suşları normalize eğrileri.....	54
Şekil 4.11. PPRV aşısı ve saha suşlarının genotiplendirilmesi.....	55
Şekil 4.12. Tm derecelerine göre tespit edilen melt curve analizi.....	56
Şekil 4.13. RFLP RT-PZR jel elektroforezi.....	57
Şekil 4.14. Pairwise Distances analizi.....	58
Şekil 4.15. PPRV F gen aşısı ve saha suşları nükleotid dizinleri.....	59
Şekil 4.16. Diğer ülkelerden GenBank’a bildirilen suşlarla oluşturulan PPRV F gen soyağacı.....	60
Şekil 4.17. Türkiye’den GenBank’a bildirilen suşlarla oluşturulan PPRV F gen soyağacı.....	61
Şekil 4.18. PPRV F gen network analizi.....	63

1. GİRİŞ

Küçük Ruminant Vebası (Peste des Petits Ruminants; PPR) koyun ve keçilerde yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden bulaşıcı viral bir hastalıktır (Gargadenec ve Lalanne, 1942; Braide, 1981; OIE, 2004). Hastalık birçok Asya ve Afrika ülkesinde görülmektedir. PPR Türkiye’de ilk kez resmi olarak Eylül 1999’da rapor edilmiştir (OIE, 1999). PPR genellikle yüksek ateş, göz-burun akıntısı, nekrotik stomatitis, enterit, pnömoni, pis kokulu ishal, depresyon ve ölümle karakterizedir (OIE, 2013). Hastalık etkeni olan Peste des Petits Ruminants Virusu (PPRV), *Paramyxoviridae* ailesinin *Morbillivirus* genusunda yer alır (Barrett ve ark., 2006). Tek bir serotipi bulunan PPRV’nin, füzyon (F) ve nükleokapsid (N) gen sekanslarının referans alındığı filogenetik analizlerinde, dört genetik hatta ayrıldığı görülmektedir (Balamurugan ve ark., 2010b; Munir ve ark., 2012a). Yapılan çalışmalarda, Türkiye’de sirküle olan PPRV suşlarının IV. genetik hatta yer aldığı tespit edilmiştir (Özkul ve ark., 2002; Dağalp ve Sait, 2013; Güler ve ark., 2014; Tarakcı, 2014).

Koyun ve Keçi Vebası’nın görüldüğü ülkelerde, hastalıkla mücadele kapsamında aşılama çalışmalarının yapıldığı bilinmektedir (Santhosh ve ark., 2013). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Koyun ve Keçi Vebası Hastalığına karşı daha etkin ve hızlı müdahale edilebilmesi ve hastalığın kontrol altına alınabilmesi amacı ile 2010 yılında AB destekli koyun ve keçilerin PPR aşısıyla aşılama projesini başlatmıştır (Genelge, 2010/02). Bu projede kullanılan aşı suşu (Nigeria75/1) genetik hat I’de yer almaktadır (Luka ve ark., 2011; Muniraju ve ark., 2013).

PPRV’nin laboratuvar tanısında uygulanacak metotların hassas, spesifik ve hızlı olması, hastalığın kontrol altına alınması ve ekonomik kayıpların en az seviyede tutulması için oldukça önemlidir. Klinik semptomlara bağlı olarak PPRV enfeksiyonundan şüphe edilse dahi kesin teşhis için laboratuvar tanısının konulması gereklidir (OIE, 2004; Parida ve ark., 2015).

Son yıllarda moleküler biyolojik metotlar PPRV’nin rutin laboratuvar tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır (Kerur ve ark., 2008; Batten ve ark., 2011; Polci ve ark., 2015). PPRV’nin gerçek zamanlı RT-PZR (reverse transcription polymerase chain reaction – RT-PCR) ile moleküler tanımlanmasına yönelik yapılan ilk çalışma Bao ve ark. (2008) tarafından bildirilmiştir. Spesifik problemlerin kullanıldığı gerçek zamanlı RT-PZR ile sekans analizine gerek kalmadan sonuçlar alınabilmektedir (Polci ve ark., 2015).

PZR ürünleri ve denatürasyonlarının incelenmesi; hassas ve spesifik sonuçlar veren floresan sistemler, teknolojik yenilikler ve moleküler çalışmalar sayesinde gelişim sürecine devam etmektedir (Hanson ve Ballantyne, 2013; Iacumin ve ark., 2015; Villinger ve ark., 2017). Yüksek kapasiteli, güvenilir ve hızlı bir yöntem olan Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (High Resolution Melting – HRM), gerçek zamanlı PZR ile kombine uygulanabilen bir yöntemdir. HRM ile mutasyon taraması ve genotiplendirme başta olmak üzere; genetik haritalama, assosiyasyon çalışmaları, DNA metilasyon, aday gen taraması, populasyon veya alt grupta allel yaygınlığının belirlenmesi, heterozigotluk kaybının taranması, DNA parmakizi analizi, haplotip bloklarının karakterizasyonu, tür tanımlanması, HLA tiplleme, somatik mutasyon oranlarının belirlenmesi gibi birçok çalışma ile moleküler ayırım yapılmaktadır (Corbett Life Science, 2006; Ghorashi ve ark., 2011; Varillas ve ark., 2011; Daniels ve ark., 2015; Draht ve ark., 2016; Sun ve ark., 2016).

HRM, kolay uygulanan ve etkin sonuçların elde edildiği uygun maliyetli bir metottur. Yapılan çalışmalarda, gerçek zamanlı PZR ile kombine uygulanan HRM analizlerinin enfeksiyon etkenlerinin moleküler tanımlamasına olanak sağladığı ifade edilmiştir (Hewson ve ark., 2009; Ghorashi ve ark., 2011; Bester ve ark., 2012).

Bu çalışmada; gerçek zamanlı RT-PZR ile PPRV (F gen) spesifik nükleik asit tespiti ve PPRV'nin aşı suşu (genetik hat I) ile doğal enfektif saha suşlarının (genetik hat IV) F gen bazlı moleküler ayırımını gerçekleştirebilen HRM metodunun geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Koyun ve Keçi Vebası Hastalığı

2.1.1. Hastalığın tanımı ve önemi

Koyun ve Keçi Vebası genellikle yüksek ateş, depresyon, göz-burun lezyonları, nekroze-eroziv stomatit, enterit, solunum problemi semptomları, pis kokulu ishal ve ölüm ile karakterize önemli bir viral hastalıktır (OIE, 2013). PPR ilk olarak 1942 yılında Fildişi Sahilleri'nde pseudorinderpest, kata, pneumoenteritis kompleks ve stomatitis pneumoenteritis sendromu gibi isimlerle tanımlanmıştır (Gargadennec ve Lalanne, 1942; Braide, 1981). Hastalığın seyri perakut, akut veya subakuttur (OIE, 2013). Mortalite ve morbidite oranının yüksek olması ve ekonomik kayıplara neden olması sebebiyle Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının ilgili birimlerine bildirim zorunlu bir hastalıktır (Resmi gazete, 1997; 2012).

Güney-Doğu Asya ve Afrika'da istihdam ve sürdürülebilir tarım için büyük öneme sahip çiftlik hayvanı yetiştiriciliği, dünya genelinde tarımsal gelirin yaklaşık %40'ını oluşturur. PPR salgınları, görüldüğü ülkelerde tarımsal üretimde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Taylor ve ark., 2005; Abubakar ve ark., 2011; Santhosh ve ark., 2013; Kumar ve ark., 2014-1). Ülkemizde yapılan çalışmalarda PPRV'nin küçükbaş hayvan yetiştiriciliği için potansiyel bir tehdit olduğuna dikkat çekilmiştir (Özkul ve ark., 2002; Yesilbag ve ark., 2005; Batten ve ark., 2011).

Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Türkiye'nin de aralarında bulunduğu birçok ülkede (Güney Afrika, Asya, Çin ve Güney Avrupa) mevcut küçükbaş hayvan popülasyonunun %63'ünün PPR enfeksiyon riski taşıdığını ve hastalığın yakın bölgelere hızlı bir şekilde yayıldığını rapor etmiştir (FAO, 2009; Libeau ve ark., 2014). OIE ve EMPRES (Gıda ve Tarım Örgütü Acil Önleyici Sistem), hastalığın kontrolü çalışmalarını fakirlikle mücadele programlarında temel hedef olarak belirlemiştir (FAO, 2009; OIE, 2015).

PPR'nin görüldüğü ülkelerde hastalıkla mücadele kapsamında aşılama kampanyaları yapılmaktadır. Aşılama ve koruyucu önlemlere rağmen, hastalık küçük ruminant yetiştiriciliği için büyük bir risk faktörü olmaya devam etmektedir (Özkul ve ark., 2002; Abubakar ve ark., 2011; Batten ve ark., 2011; Santhosh ve ark., 2013).

2.1.2. Hastalığın bulaşması

Enfeksiyonun en önemli bulaşma yolu, ateşli dönemdeki hasta hayvanların sürü içerisinde diğer duyarlı hayvanlarla olan yakın temasıdır (Braide, 1981). Virus klinik belirtiler ortaya çıkmadan önce oral, nasal, konjunktival akıntı ve idrar yoluyla saçılmaktadır (Bundza ve ark., 1988). Yapılan çalışmalar enfekte keçilerden alınan rektal svap ve sürüntüden RT-PZR ile PPRV tespit edilmesi sayesinde, hayvan dışkılarının virusun çevreye saçılması ve enfeksiyon oluşumunda önemli bir kaynak olduğunu göstermiştir (Abubakar ve ark., 2012; Kumar ve ark., 2014-1).

Kontamine altlık, suluk ve materyallerin virusun bulaşma ve yayılmasında rol aldığı dikkate alındığında, hastalıkla etkin mücadele ve biyogüvenlik açısından enfekte hayvan atıklarının dezenfekte edilmesi gerektiği tavsiye edilmektedir (Kumar ve ark., 2014-1). Kontrolsüz yapılan hayvan sevkleri, hayvan pazarlarındaki bulaşma, barınak hijyen şartlarının iyi olmaması ve mevsimsel etkenler gibi birçok çevresel faktör, hastalığın bulaşması ve bölgesel olarak yayılmasına neden olmaktadır (Abubakar ve ark., 2011).

2.1.3. Klinik belirtiler

Enfeksiyon perakut, akut ve subakut formlarda seyredebilir. Enfeksiyonun seyrinde hayvanın türü, yaşı, alınan virusun virulens ve miktarı ile sekonder enfeksiyonların belirleyici rolü vardır. Virusun inkübasyon süresi 2-7 gündür ve viremi dönemi 3-5 gün devam etmektedir (OIE, 2013).

Hastalığın perakut formunda, inkübasyondan sonra 40-42 °C ye kadar yükselen ateş ve klinik semptomlar ile 2-4 gün içinde şiddetli bir ishal başlar ve kollaps sonucu ölümler görülür. Perakut formda morbidite %100, mortalite %90'dır (OIE, 2004).

Hastalığın belirgin klinik semptomları akut formda ortaya çıkar (Diallo, 2006). İnkübasyon periyodunu takiben 5-7 gün içerisinde ani ısı artışı (39.5-41 °C), gözler ve burunda seröz akıntı, depresyon, iştahsızlık, halsizlik ve ağızda kuruluk semptomları ile kendini gösterir (Ahmad ve ark., 2005). Ateşli dönemi atlatan hayvanların göz ve ağız mukozalarında kızarıklık meydana gelir (Bundza ve ark., 1988). Epitelyal dokuda oluşan nekrozlar dilin üstünde, yanakların iç kısmında, dudaklarda, damakta, diş etlerinde toplu iğne başı büyüklüğünde grimsi renkte odaklar

şeklinde ve bu odaklar zamanla artarak birleşir. Ağız mukozasının görünümü tamamen değişir ve salya artışı gözlenir. Hastalığın ilerleyen evrelerinde, ağızdan karakteristik pis bir koku yayılmaktadır (FAO, 1999).

Akut formda; hızlı, hırıltılı ve thoracoabdominal solunum ile solunum gücüne bağlı olarak baş ve boyunu ileri uzatma, burun deliklerini açma, dili dışarı çıkarma ve hafif iniltili bir öksürükle beraber sallantılı yürüyüş gözlemlenir. Ateşden 2-3 gün sonra ishal, dehidrasyon, zayıflama ve bitkinlik semptomları ortaya çıkar. Hayvanların çoğunda ateş başladıktan 10-12 gün sonra ölüm şekillenir. Enfeksiyonun gebe hayvanlarda yavru atıklarına sebep olduğu bilinmektedir (OIE, 2015).

PPR'nin subklinik formunda belirgin klinik semptomlar ortaya çıkmaz. Hafif şekilde seyreden solunum sistemi bozuklukları ve ara sıra yükselip inen ateş dışında önemli bir klinik belirti yoktur (Gül ve ark., 2006).

PPRV lenf ve epitel hücrelerine affinite gösterir. Bu dokuların yoğun olduğu organ ve sistemlerde şiddetli lezyonlara neden olur (Abraham, 2005). Viral enfeksiyonlarda immun yanıt 3-4 günde gelişen nötralizan antikor ile başlamakta ve gelişen immun yanıt aktifleşerek virüsü konaktan temizlemeye çalışmaktadır (Munir ve ark., 2012b). PPRV immunsupresyon oluşturur ve hastalığı atlama ya da aşılama hayvanlarda güçlü bir hücre ve humoral immun yanıt şekillenir (Rajak ve ark., 2005; Santhosh ve ark., 2013).

2.1.4. Hastalığa karşı koruyucu aşı

İlk olarak Nigeria75/1 suşundan üretilen attenue canlı aşı ile başlayan aşı üretme çalışmalarında başarıya ulaşılamamıştır (Gilbert ve Monnier, 1962; Benazet, 1973). Bu nedenle PPRV ve Rinderpest virus (RPV) arasındaki antijenik yakınlık dikkate alınarak, hastalıktan korunmak için attenue RP (Rinderpest) aşısı kullanılmıştır. Yapılan analizlerde, PPRV'ye karşı nötralizan antikor oluşmadığı, fakat bu aşının 1-3 yıl süreyle koruma sağladığı görülmüştür (Taylor, 1979). Bu durum her iki virüsün F proteinlerinin %80 oranında benzerlik göstermesine bağlı olarak, aşılama hayvanlarda F proteine karşı oluşan antikor yanıtının, PPR enfeksiyonuna bağışıklık oluşturduğunu düşündürmüştür (Diallo ve ark., 2007). Daha sonraki yıllarda Nigeria75/1, Arasur ve Sungri suşlarının Vero hücre kültüründe yapılan attenue aşı üretme çalışmalarında başarıya ulaşılmıştır (Diallo ve ark., 1989; Santhosh ve ark., 2013). Bu aşılama gebe

koyunlarda güvenli olduğu ve 6 yıl koruma sağladığı bildirilmiştir (Rajak ve ark., 2005; Sen ve ark., 2010; Santhosh ve ark., 2013).

2.1.5. Türkiye’de koyun ve keçi vebası

PPR, Türkiye’de ilk kez resmi olarak Eylül 1999’da rapor edilmiştir (OIE, 1999). Fakat Alçığır ve ark. (1996) patomorfolojik ve immunohistolojik olarak, Tatar (1998) virolojik olarak enfeksiyonu daha önce göstermiştir. Yapılan saha çalışmaları ile endemik olduğu belirtilen PPR’nin, epidemiyolojisi desteklenmiştir (Tatar ve Alkan, 1999; Özkul ve ark., 2002; Tatar ve ark., 2002; Toplu, 2004; Cam ve ark., 2005; Yesilbag ve ark., 2005; Kul ve ark., 2007; Albayrak ve Alkan, 2009; Albayrak ve Gür, 2010). Ülkemizde sirküle olan PPRV suşlarının moleküler tanımlaması ve filogenetik araştırmasına yönelik çalışmalar mevcuttur (Dağalp ve Sait, 2013; Güler ve ark., 2014; Tarakcı, 2014).

2.2. Viral Yapı

2.2.1. Sınıflandırma

PPRV, *Mononegavirales* takımında bulunan *Paramyxoviridae* ailesinin *Paramyxovirinae* alt ailesinde bulunan *Morbillivirus* genusunda yer alır (Barrett ve ark., 2006). *Morbillivirus* genusunda bulunan virusların insan ve hayvanlarda önemli hastalıklara neden olduğu bilinmektedir (Taylor ve ark., 2005).

PPRV segmentsiz, negatif polariteli, tek zincirli, linear RNA’lı bir virustur. Replikasyon işlemi konak hücrenin sitoplazmasında gerçekleşir (Murphy ve ark., 1999). Virusa pleomorfik (siferik ve filamentöz) şeklini virionu saran lipid yapıdaki zarf verir. Virusun yarılanma ömrü 37 °C de 2 saattir ve donmuş dokularda uzun süre canlılığını koruyabilir (OIE, 2009).

2.2.2. Viral proteinler

PPR virusu 400-500 nm çapındadır ve elektron mikroskopunda karakteristik olarak balıksırtı (herring-bone) görünümüne sahiptir. Helikal nükleokapsidi saran lipid yapıdaki zarf ile birlikte pleomorfik bir partikül şeklinde görülen iki yapısal üniteden

meydana gelir. Virus zarfının lipid yapısı konak hücreden köken almaktadır. Bu yapının konak hücreye tutunmada (hemaglutinasyon protein-H) ve hücreye girişinde (füzyon protein-F) aracılık eden iki adet glikoproteini bulunmaktadır (Bossart ve ark., 2013). H ve F glikoproteinleri negatif boyama ile görüntülemeye 8-12 nm boyunda zarfın yüzeyinde bulunan çıkıntılar (spike) şeklindedir (Gibbs ve ark., 1979; Barrett, 1999; Lamb ve Kolakofsky, 2001).

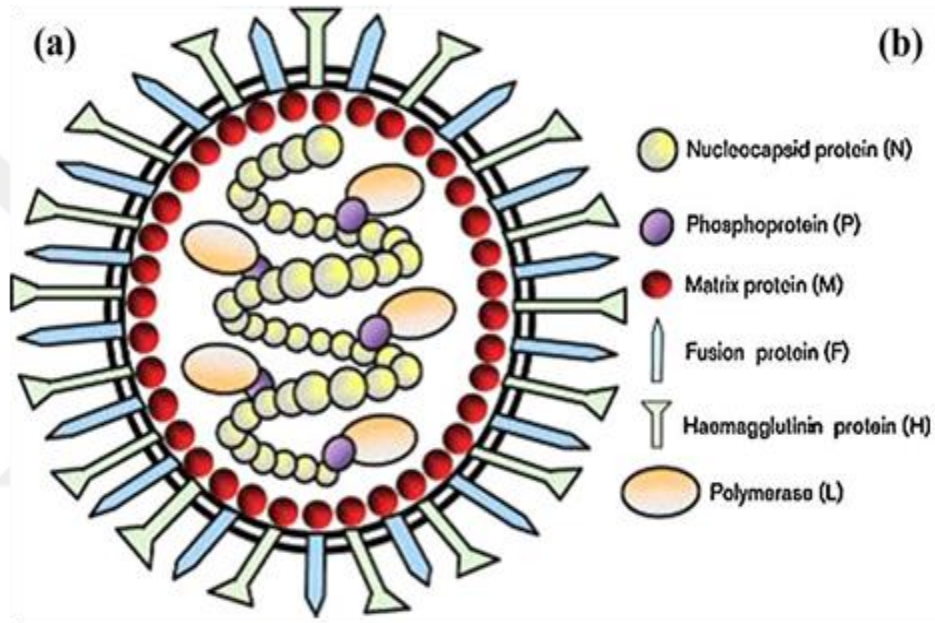
Tek zincirli formda olan RNA genomu 15948 nükleotid (nt) uzunluğundadır. PPRV 6 yapısal ve 2 yapısal olmayan 8 proteini kodlayan 6 transkripsiyonel üniteden oluşur (Şekil 2.1.). Bu gen bölgeleri, RNA'ya bağlı olan Nükleoprotein (N), Fosfoprotein (P), Polimeraz-Large proteini (L), Matrix proteini (M), Füzyon glikoproteini (F) ve Hemaglutinin glikoproteini (H) yapısal proteinlerini; C ve V yapısal olmayan proteinlerini kodlar (Bailey ve ark., 2005). Sitoplazmada replike olan *Paramyxoviruslar*, konak hücre çekirdeğinde bulunan enzimlere ulaşamadığından kendi mRNA transkripsiyonunu gerçekleştiremez (Taylor ve ark., 2005).

Tek bir serotipi bulunan PPRV'nin, mevcut izolatlarının F ve N proteinleri ile yapılan kısmi sekans analizlerinde 4 farklı genetik hattı (lineage) belirlenmiştir (Munir ve ark., 2012a). Hat 1, 1970'li yıllarda Afrika'dan izole edilen virusları (Nijerya 75/1, 75/2, 75/3, 76/1, Senegal), hat 2 ise 1980'li yıllarda Afrika'dan izole edilen virusları (Ivory Coast/89, Guinea 91) içerir (Luka ve ark., 2011; Munir ve ark., 2012a). Hat 3, Afrika ve Asya kıtalarında ortak bulunan virusları (Oman 72 Dorcas, Oman 72 Ibri, Oman 83, India 92, Sudan 72, Etiyopya 96), hat 4 ise Asya viruslarını (Bangladeş 93, İsrail 94, İran 94, Nepal 95, India 94 UP, India 94 MAH, India 94 RAJ, Pakistan 94, Suudi Arabistan 94, Türkiye 96, India 96 Bengal, India 96 Orissa, Türkiye 00) içerir (Dhar ve ark., 2002; Özkul ve ark., 2002; Abraham, 2005; Couacy-Hymann ve ark., 2005). Bununla birlikte N geni sekans verilerine göre hat 4'ün aynı dönemlerde Afrika'da (Kamerun-1997) da görüldüğü bildirilmiştir. Son salgınlar araştırıldığında genetik hat 4 viruslarının Asya, Afrika ve Ortadoğuda yeni bölgelere yayıldığı (Çin (2007), Fas (2008), Cezayir (2011), Tanzanya (2012), Demokratik Kongo Cumhuriyeti (2012), Angola (2012), Komor Adaları (2012)) rapor edilmiştir (Libeau ve ark., 2014).

PPRV ısı, güneş ışığı ve ultra viyole (UV) ışınları ile asit (pH<4) ve alkali çözeltilere (pH>10) karşı oldukça duyarlıdır. Düşük ısı ve yüksek nemli ortamlarda enfeksiyözitesini sürdürebilir. Lipoprotein yapıdaki virus zarı, lipofilik dezenfektan ve yağ eriticilere karşı oldukça hassastır. Alkol, eter, fenol gibi yağ çözücüler ve

%2-5'lik NaOH çözeltisi dezenfektan olarak kullanılabilir. Virus enfekte karkaslarda laktik asit oluşumunu engellediğinden, ölümden sonra lenf yumrularında 4 °C'de 8 gün enfeksiyözitesini koruyabilir (OIE, 2009).

PPRV duyarlı hücre kültürlerinde sitopatik etki (CPE) yapmaktadır. F glikoproteininin hücre zarını eriterek oluşturduğu sinsityal dev hücreler, viral replikasyon sırasında oluşan intra-sitoplazmik ve intra-nüklear inklüzyon cisimcikleri tespit edilen CPE şekilleridir. Duyarlı hücre kültürlerinde, CPE oluşumunun 3-19 gün arasında değiştiği bildirilmiştir (Gibbs ve ark., 1979).



Şekil 2.1. PPR virusu (a) ve proteinleri (b) (Banyard ve ark., 2010)

2.2.2.1. Yapısal viral proteinler

2.2.2.1.1. Nükleoprotein (N protein)

N proteini virion ve enfekte hücrede en çok bulunan, segmentsiz negatif polariteli major viral proteindir. Viral nükleik asidi sararak genomu şekillendirir ve dış etkenlerden korur. Hücre içi enzimlere karşı oldukça hassas olan bu protein, immünitinin oluşmasında önemli rol oynamaktadır (Rima, 1983; Diallo ve ark., 1987; Bailey ve ark., 2005). N proteini virusun enkapsidasyon, replikasyon ve transkripsiyonu için P ve L proteinleri ile ribonükleoprotein kompleksini oluşturmaktadır (Maclachla ve Dubovi, 2011).

Poliakrilamid jel elektroforezde 58 KDa moleküler ağırlığa sahip olduğu tespit edilen N proteini, tüm genom diziliminde 55-1744 nükleotid aralığında yer almaktadır (Parida ve ark., 2015). Bu protein transkripsiyon şemasında ilk bölgedir ve 3' ucunda 107 nükleotidden oluşan transkripsiyonu başlatan promotor gen dizilimine sahiptir (Bankamp ve ark., 1996).

2.2.2.1.2. Fosfoprotein (P protein)

P proteini, replikasyonda transkribe edilen ikinci gendir. N ve L proteinleri ile birlikte viral replikasyonda ve RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RNA Dependent RNA polymerase- RdRp) sentezlenmesinde görev alır (Taylor ve ark., 2005; Maclachla ve Dubovi, 2011). Yapısal olmayan proteinlerin sentezlenmesi bu proteinin alternatif okuma bölgelerinde gerçekleşmektedir (EU267273). Tüm genom diziliminde 1748-3402 nükleotid aralığındadır ve poliakrilamid jel elektroforezde 55 KDa moleküler ağırlığa sahiptir (Parida ve ark., 2015).

2.2.2.1.3. Polimeraz protein (Large-L protein)

Polimeraz proteini (L protein) PPRV proteinleri içerisinde yapı olarak en büyüğüdür. L proteini polimerizasyon aktivitesinin yanı sıra poliadenilasyon, metilasyon ve kep formasyonu (Capping) fonksiyonlarına sahiptir (Lamb ve Kolakofsky, 2001). Polimeraz protein, co-factor olan P proteini ile ilişkili olduğunda RdRp aktivasyonu oluşturabilir (Taylor ve ark., 2005). Tüm genom diziliminde 9266-15908 nükleotidleri arasında 6552 adet nükleotid tarafından kodlanır ve 247 KDa ağırlığındadır (Parida ve ark., 2015). Transkripsiyonun polarize sıralı doğası ve daha sonra azalan mRNA miktarı nedeni ile en son transkribe olan gendir (Mc Ilhattonve ark., 1977).

2.2.2.1.4. Matriks protein (M protein)

Matriks protein, zarf yüzeyinde bulunan glikoproteinler ile ribonükleoprotein (RNP) arasında köprü görevi üstlenir. Yeni oluşan viral yapının tomurcuklanma aşamasında önemli bir role sahiptir (Simons ve Garoff, 1980). M proteini RNA sentez miktarının kontrolünden sorumludur (Maclachla ve Dubovi, 2011). M proteininin

fonksiyonları, burada meydana gelecek değişimlerin tolere edilemeyeceğini göstermektedir (Abraham, 2005). PPRV'nin tüm genom diziliminde 3406-4888 nükleotidleri arasında yer alan 1008 nükleotid tarafından sentezlenir ve 38-39 KDa ağırlığındadır (Diallo, 1990; Parida ve ark., 2015).

2.2.2.1.5. Hemaglutinasyon protein (H protein)

H proteini, virionun konak hücreyi enfekte edebilmesi için hücre reseptörüne tutunmakla görevli olan yüzey glikoproteinidir. *Paramyxoviridae* ailesinin sınıflandırılmasında kriterdir ve *Paramyxovirus* genusu üyelerinde hemaglutinasyon ve sınırlı nöroaminidaz aktivitesi gösterir (Seth ve Shaila, 2001; Abraham, 2005). H proteinin, humoral immun yanıt ve nötralizan antikor oluşumunda önemli rol alması nedeni ile *Paramyxoviruslarda* antijenik determinantlar açısından baskın bir protein olduğu bilinmektedir (Munir ve ark., 2012b). F proteinin sitoplazmaya füzyon ile girişinde düzenleyici rol alır (Moll ve ark., 2002). PPRV genom diziliminde 7306-9262 nükleotidleri aralığında 1830 nükleotid tarafından kodlanmaktadır ve 69 KDa ağırlığındadır (Parida ve ark., 2015).

2.2.2.1.6. Füzyon protein (F protein)

PPRV'nin konak hücre sitoplazmasına füzyon ile geçişini sağlayan yüzey glikoproteinidir. Sitoplazmada gerçekleşen replikasyondan sonra konak hücre membranında glikolize olan F proteini, komşu hücreleri de enfekte ederek füzyon oluşturur ve bu şekilde dev hücreler meydana gelir (Maclachla ve Dubovi, 2011). F proteininden, öncelikle inaktif öncü F0 proteini kodlanır ve bu protein konak hücrelerine ait hücre proteaz enzimleri ile kesilip birbirine di-sülfid bağı ile bağlı F1 ve F2 aktif proteinine bölünür (Lamb ve Kolakofsky, 2001). F proteini proteaz enzimleriyle kesilip aktif duruma geldiğinde, virion enfeksiyöz forma dönüşebilir (Abraham, 2005). Konakta bağışıklığın devamını sağlayan nötralizan antikorların oluşmasından sorumludur (Munir ve ark., 2012b).

Oldukça korunmuş olan F proteini, PPRV'nin tüm genom diziliminde 4892-7302 nükleotidleri arasında yer alan 1641 adet nükleotid tarafından sentezlenir (Parida ve ark., 2015). PPRV ile yapılan filogenetik çalışmalarda, hedeflenen gen

bölgelerindedir (Özkul ve ark., 2002; Munir ve ark., 2012a; Dağalp ve Sait, 2013; Tarakcı, 2014).

2.2.2.2. Yapısal olmayan viral proteinler

P proteininin alternatif okuma bölgelerinden iki adet yapısal olmayan C (1829-2362) ve V (1807-2701) proteinleri sentezlenmektedir. Yapısal olmasada bu proteinlerin enfeksiyon oluşumunda önemli role sahip olduğu bildirilmiştir (Abraham, 2005; Maclachla ve Dubovi, 2011).

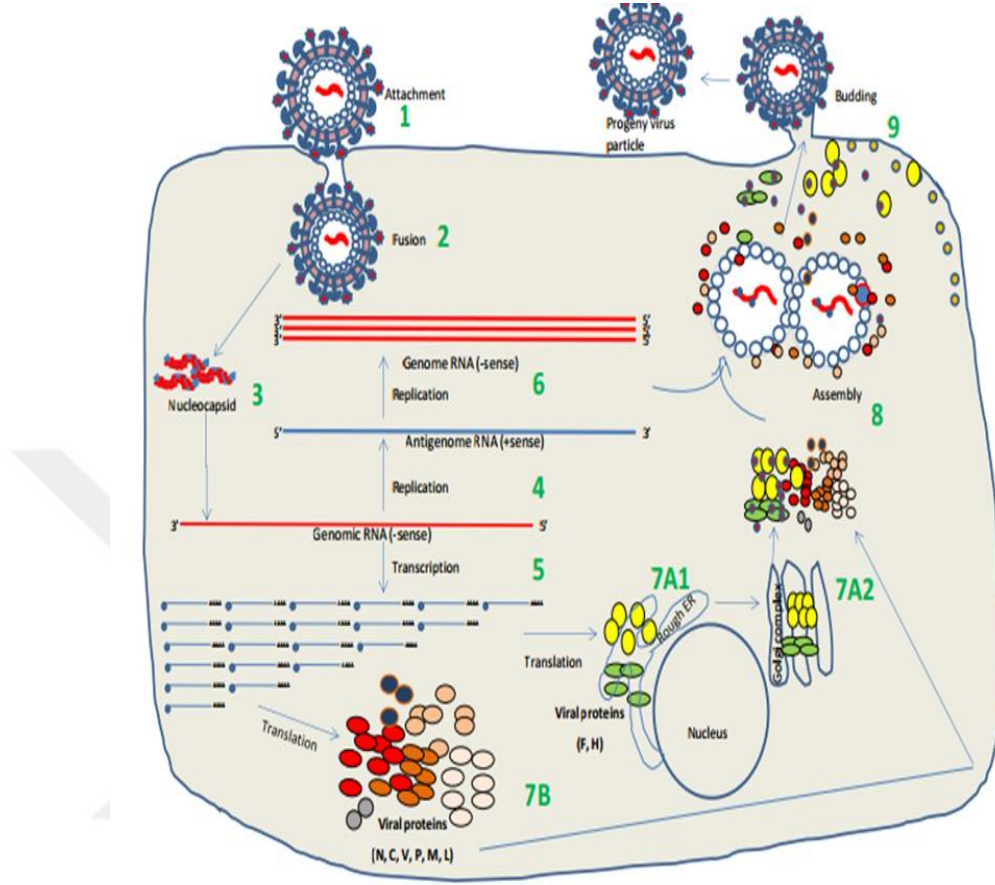
2.2.3. Viral replikasyon

Paramyxovirus'lar, diğer birçok negatif polariteli RNA virusu gibi replikasyon işlemini konak hücrenin sitoplazmasında gerçekleştirir (Maclachla ve Dubovi, 2011). Nükleokapsidin konak hücre sitoplazmasına füzyonu ile gen ekspresyonunda gerekli viral proteinlerin sentezlenmesi için öncelikli olarak transkripsiyon işlemi başlar (Fields ve ark., 2007). Transkripsiyonla mRNA sentezi ve pozitif polariteli ters zincir sentezi viral genom üzerinden gerçekleştirilir. (Lamb ve Kolakofsky, 2001).

Paramyxovirus'ların transkripsiyon ve replikasyonunda, genom diziliminin terminal ucunda bulunan N geninin 52 nükleotidden oluşan başlama bölgesi ve okuma bölgesinden (ORF-open reading frame) önceki çevrilmemiş bölge (untranslated region-UTR) promotor role sahiptir (Parida ve ark., 2015). RNA sentezi genomik RNA'nın 3' ucundan başlar ve sıralı-kesintisiz sentez mekanizması ile 6-10 farklı mRNA transkribe edilir. Transkripsiyonu, başlıklama ve poliadenilasyon safhaları takip etmektedir. N protein konsantrasyonu kritik seviyeye ulaştığında, genomik RNA'nın 3' ucundaki promotor sekans transkribe edilir ve N protein yeni RNA zincirine bağlanır. Bu şekilde mesaj-terminasyon sinyalleri polimeraz tarafından görülmez ve tam pozitif polariteli antijenom ipliği elde edilir. Antijenom ipliği ve N protein kompleksinin oluşturulmasıyla negatif polariteli RNA sentezlenmesi başlatılır. Yeni genomik RNA'nın oluşmasının ardından mRNA sentezinin ikinci aşaması ile birlikte viral proteinlerin sentez miktarı önemli ölçüde artmış olur (Maclachla ve Dubovi, 2011; Kumar ve ark., 2014-2; Parida ve ark., 2015).

Transkripsiyon ve translasyon işlemlerinin ardından virion, hücre duvarından glikoproteinlerini ve diğer bileşenlerini temin ederek replikasyon işlemi tamamlar.

Projeni virusları, tomurcuklanma ile saçılır ve olgun virionların oluşumu tamamlanır (Şekil 2.2.) (Murphy ve ark., 1995; Maclachla ve Dubovi, 2011).



Şekil 2.2. PPRV replikasyonu (Kumar ve ark., 2014-2)

2.3. PPRV'nin Moleküler Metotlarla Teşhisi

PPRV'nin laboratuvar tanısında uygulanacak metotların hızlı ve etkin olması, hastalığın kontrol altına alınması ve ekonomik kayıpların en az seviyede tutulması için oldukça önemlidir (OIE, 2004; Parida ve ark., 2015). PPRV'nin laboratuvar teşhisinde; antijen ve antikor tespiti, virus izolasyonu ve nükleik asit tespiti gibi kabul gören metotların kullanıldığı bilinmektedir (Forsyth ve Barrett, 1995; Singh ve ark., 2004; Kerur ve ark., 2008). Son yıllarda, güvenilir bir tanı yöntemi olan RT-PZR modifikasyonlarının rutin laboratuvar teşhisinde diğer metotların yerini aldığı görülmektedir (Balamurugan ve ark., 2006; Kwiatek ve ark., 2007; Kerur ve ark., 2008; Kwiatek ve ark., 2010; Parida ve ark., 2015).

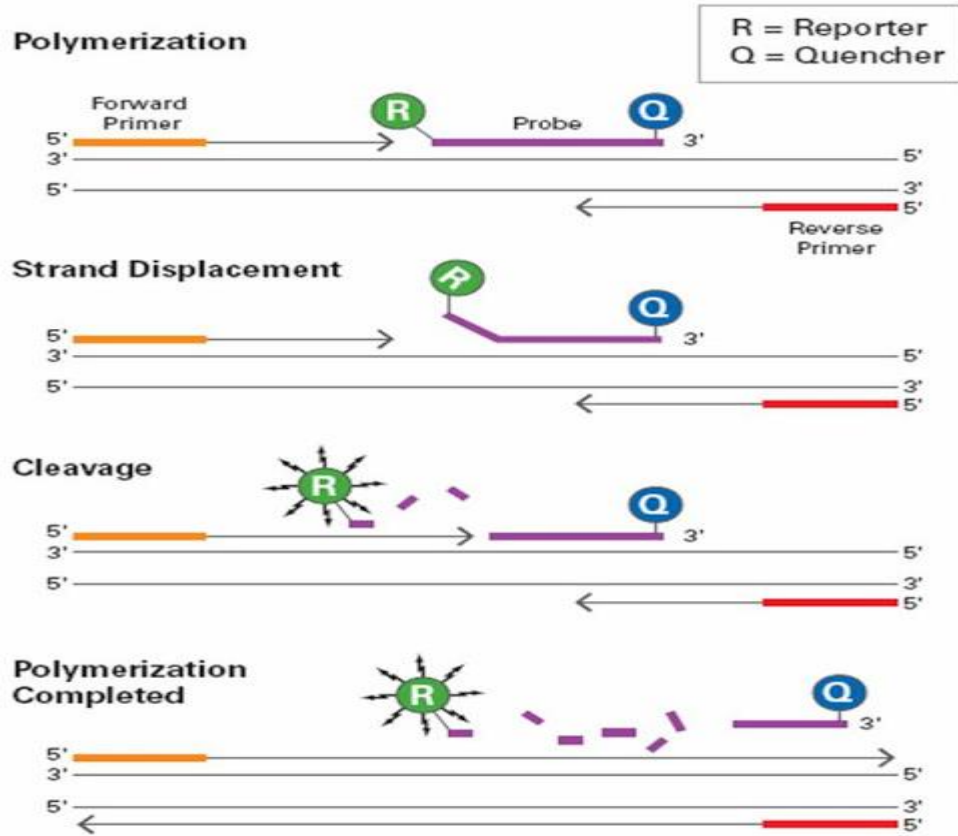
Gerçek zamanlı RT-PZR'de, floresan boyalar (SYBR-Green, EVA Green) ve hedef sekansa özgül probler kullanılarak hassas sonuçlar alınmaktadır (Bustin, 2000; Bao ve ark., 2008; Kwiatek ve ark., 2010; Balamurugan ve ark., 2012). Bu metot ile yapılan analizlerde, sekans analizine gerek kalmadan sonuç elde edilebilir (Polci ve ark., 2015). PPRV spesifik primer-prob tasarımında, hedeflenen gen bölgesinin RT-PZR'nin verimliliğini etkilediği görülmektedir (Bustin, 2002; Kwiatek ve ark., 2010; Batten ve ark., 2011). Analizlerde hedef ürün büyüklüğünün 100 ± 20 baz çifti (bç) olması tavsiye edilmektedir (Dinçer ve Özkul, 2015).

PPRV'nin moleküler metotlar ile tanısında kullanılan RNA; canlı hayvanlardan burun-göz akıntısı, antikoagülanlı kan, ölen/öldürülen hayvanlardan ise lenf nodülleri (mezenterik ve bronşiyal lenf düğümleri), akciğer, dalak ve bağırsak mukozasından yapılan nükleik asit ekstraksiyonu ile elde edilir (OIE, 2013).

2.3.1. Taqman oligoproplarının çalışma prensibi

Taqman oligoprobu; hedef diziyeye özgül 5' ucunda raportör florokrom (6-carboxyfluorescein =6-FAM), 3' ucunda baskılayıcı florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine =TAMRA) olarak adlandırılan ve floresan özelliği gösteren maddelerle işaretli oligoproblardır. Hibridizasyon prensibiyle çalışan Taqman oligoproplarının kullanıldığı gerçek zamanlı RT-PZR analizlerinin oldukça seçici, duyarlı ve hızlı olduğu bildirilmiştir (Balamurugan ve ark., 2010a; Kwiatek ve ark., 2010; Polci ve ark., 2015).

Hedef sekans üzerinde primerler arasında kalan bir bölgeye yerleşen probun cDNA ile hibridizasyonu devam ettiği sürece, raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması 3' ucundaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. *Taq* DNA polimeraz, probun bağlandığı noktaya geldiğinde reaksiyonun devamı için 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu yıkmaya başlar. Bu sayede söndürücü (quencher) tarafından floresan ışması engellenen raportör florokrom, serbest hale geçerek sinyal oluşturur (Şekil 2.3.). Her termal döngüde üretilen ürün miktarı ile sinyal şiddetinde artış gözlenmektedir (Bustin, 2000; Tsai ve ark., 2012; Polinski ve ark., 2013).



Şekil 2.3. Taqman sisteminin çalışma prensibi (Taqman Probes, 2016)

2.3.2. PPR virusunun RT-PZR analizlerinde hedeflenen genler

PPRV'nin RT-PZR modifikasyonları ile teşhisinde primer-prob seçimlerinin önemli olduğu bildirilmiştir. Bu amaçla F ve N genini hedefleyen primer setlerinin tasarlandığı birçok çalışma mevcuttur (Forsyth ve Barrett, 1995; Couacy-Hymann ve ark., 2002; Kwiatek ve ark., 2010; Batten ve ark., 2011). Genetik hatların tespitine yönelik yapılan araştırmalarda, F ve N genleri ile birlikte M ve H genlerini hedefleyen primer setlerinin kullanıldığı bilinmektedir (Balamurugan ve ark., 2010b; Kumar ve ark., 2014-1).

Nükleokapsid geni PPRV'de promotor bölgeye en yakın proteindir. B hücre reseptörlerine bağlanan N proteine karşı, enfeksiyonun erken dönemlerinde antikor yanıtı oluşmaktadır (Laine ve ark., 2003). Genetik olarak yüksek oranda korunmuş olan N geni baz alınarak yapılan RT-PZR analizleri ve filogenetik çalışmaların, virusun diğer gen bölgeleri ile yapılan analizlerinden daha öncelikli ve duyarlı olduğu bildirilmiştir (Kwiatek ve ark., 2007; Bao ve ark., 2008; Kumar ve ark., 2014-1).

F genini hedefleyen çalışmalar daha çok genetik hat tespitinde geliştirilen PCR modifikasyonlarıdır (Forsyth ve Barrett, 1995; Couacy-Hymann ve ark., 2002; Özkul ve ark., 2002; Kerur ve ark., 2008). Ülkemizde, PPRV enfeksiyonlarına karşı koruyucu olarak kullanılan aşı suşu Nig75/1 (genetik hat I) ile sahada tespit edilen ve genetik hat IV'de yer alan doğal enfektif suşların F gen ayırımına yönelik bir RFLP RT-PZR çalışması mevcuttur. Bu çalışmada, aşı suşunda iki band (202 ve 246 bp) görülürken, saha suşlarında hedef bölge dışında band (448 bp) oluşumu görülmemektedir (Güler ve ark., 2014).

2.4. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (High Resolution Melting – HRM)

DNA denatürasyonlarının görüntülenmesinde absorbans değişimini referans alan UV spektrofotometrelerin kullanıldığı konvansiyonel metotlar mevcuttur (Santa Lucia ve Hicks, 2004; Wittwer ve Kusakawa, 2004). Güncel moleküler çalışmalarda, hassas ve etkin sonuçlar elde edilen floresan sistemlerin kullanıldığı metotlar ile denatürasyonların daha etkin olarak tanımlandığı görülmektedir (Hanson ve Ballantyne, 2013; Iacumin ve ark., 2015; Villinger ve ark., 2017).

DNA denatürasyonlarının gözlemlendiği HRM (High Resolution Melting), yüksek kapasiteli ve güvenilir bir yöntem olarak gerçek zamanlı PZR ile kombine uygulanabilen etkin bir moleküler metottur. Bu yöntem ile aynı anda teşhis ve moleküler ayırım yapılmaktadır (Ghorashi ve ark., 2011; Varillas ve ark., 2011; Sun ve ark., 2016). HRM yöntemi mutasyonlarla ilişkili spesifik hastalıkların tespiti ve genotiplendirme başta olmak üzere; tek nükleotid polimorfizmi (single-nucleotide polymorphism-SNP), genetik haritalama, assosiyasyon çalışmaları, DNA metilasyon, aday gen taraması, populasyon veya alt grupta allel yaygınlığının belirlenmesi, heterozigotluk kaybının taranması, DNA parmakizi analizi, haplotip blokların karakterizasyonu, tür tanımlanması, HLA tiplleme, somatik mutasyon oranlarının belirlenmesi gibi birçok çalışmada kullanılmaktadır (Worm ve Guldborg, 2001; Corbett Life Science, 2006; Krypuy ve ark., 2006; Price ve ark., 2007; Lin ve ark., 2008; Zhou ve ark., 2008; Nguyen-Dumont ve ark., 2009; Vossen ve ark., 2009; Varillas ve ark., 2011; Daniels ve ark., 2015; Draht ve ark., 2016). Uygun maliyetli ve kolay uygulanabilen bu yöntem ile hızlı ve hassas sonuçlar elde edilebilmektedir (Akiyoshi ve ark., 2013; Lin ve ark., 2014).

HRM analizinde, standart PZR bileşenlerine ve nükleik asit floresan boyalara ihtiyaç duyulmaktadır (Montgomery ve ark., 2007). DNA denatürasyonu bu boyalar yardımıyla takip edilmekte ve denatürasyon ile birlikte floresan sinyal şiddetinde azalma meydana gelmektedir (Ririe ve ark., 1997). Yüksek optik ve termal duyarlılıktaki florometrik cihazlar, DNA denatürasyonu ile değişen floresan sinyallerini değerlendirecek ve bu değişimi görüntüleyecek şekilde geliştirilmiştir (Montgomery ve ark., 2007). HRM analizleri florometrik cihazın çözünürlüğü, sıcaklık ve floresan ölçümü (Herrmann ve ark., 2006), çift zincirli DNA'ya bağlanma özelliği olan floresan boyalar (Wittwer ve ark., 2003), nükleik asit miktarı ve spesifik PZR ürünlerinin eldesi gibi değişkenlerden etkilenmektedir (Ghorashi ve ark., 2011). Bu analizde veriler 2 sn'deki 0.1-1.0 °C sıcaklık artışına karşılık gelen floresan sinyal şiddeti değişiminin ölçülmesi ile elde edilir. DNA denatürasyonu artan her 0.1 °C için ölçüm yapılması ile çok iyi takip edilebilmektedir (Gundry ve ark., 1999; Wittwer ve Kusukawa, 2004).

HRM analizlerinde erime eğrilerinin değerlendirilmesi sayesinde, PZR ampikon sekans varyasyonları ve bilinen sekans verilerinin ilişkilendirilmesi prensibine bağlı olarak genotiplendirme ve moleküler karakterizasyon yapılmaktadır (Reed ve ark., 2007; Ghorashi ve ark., 2011). Bu moleküler tanımlamaların kolaylıkla yorumlanabileceği gösterilmiştir (Hewson ve ark., 2009). Genotiplendirme ve nükleik sekans varyasyon taramalarında gerçek zamanlı PZR temelinde yapılan HRM analiz verilerinin sekans analizlerinden daha hızlı (Hewson ve ark., 2009), konvansiyonel metotlardan (mikrobiyal tarama ve tür identifikasyonu vb. gibi) ise daha özgün ve hassas olduğu belirtilmektedir (Jackwood, 2004; Cheng ve ark., 2006; Ghorashi ve ark., 2010; Varillas ve ark., 2011). Özellikle aşı ve saha suşları moleküler ayırımında güvenilir ve hızlı sonuçlar elde edilmesi, salgın hastalıklarla mücadele kapsamında yapılan aşılama programları ve moleküler epidemiyolojik araştırmalar açısından önem arz etmektedir (Ghorashi ve ark., 2011; Bester ve ark., 2012).

Kapalı tüp sistemi olarak adlandırılan HRM analizinin diğer gen tarama yöntemlerine göre bazı avantajları şunlardır; analizin jel ya da matris ayrımına gerek kalmadan PZR ile aynı tüpte gerçekleştirilmesi (Wittwer ve ark., 2001), kontaminasyon riskinin düşük olması, PZR'den sonra 10-15 dk içerisinde ürünlerin pürifiye edilmeden HRM için veri eldesi sayesinde analizin kısa sürede yapılmasıdır (Wittwer ve ark., 2005; Montgomery ve ark., 2007; Sun ve ark., 2016).

HRM ile tutarlı ve etkili sonuçlar elde edebilmek için kullanılacak olan genomik DNA'nın yüksek kalitede olmasına, analizden önce nükleik asit miktarlarının

eşitlenmesine, PZR'nin optimizasyonuna, iyi amplifiye edilmiş spesifik ürünlerin elde edilmesine ve nonspesifik bağlanmaların önüne geçilmesine dikkat edilmelidir (Reed ve ark., 2007; Vossen ve ark., 2009; Ghorashi ve ark., 2011). HRM analizlerinin tekrar edilebilir ve güvenilir olması, yüksek GCP (genotype confidence percentage) ve düşük standart sapma gösteren replikonların değişik zamanlarda tekrar test edilmesine bağlıdır (Ghorashi ve ark., 2011; Sun ve ark., 2016). Ayrıca PZR amplikon uzunluğu, primer setinin hedeflediği gen, floresan boya seçimi ve PZR koşulları analiz sonuçlarını doğrudan etkilemektedir (van der Stoep ve ark., 2009).

HRM ile varyasyonların belirlenmesi, SNP, delesyon, insersiyon ve inversiyon gibi mutasyon taramalarında kısa amplikonlar (50-300 bp), uzun sekans varyasyonlarının belirlenmesinde daha büyük amplikonlar (200-500 bp) ile çalışılması tavsiye edilmektedir (Montgomery ve ark., 2007; Montgomery ve ark., 2010). Uygulanabilirliği, etkin ve hassas sonuçların hızlı bir şekilde elde edilmesi gibi özellikleri nedeniyle moleküler çalışmalar ve klinik tanıda HRM analizlerine olan ilginin arttığı bildirilmiştir (Varillas ve ark., 2011; Xu ve ark., 2016; Zahorakova ve ark., 2016).

2.4.1. DNA Tm derecesi

DNA ikili sarmalında hidrojen bağlarının fiziksel ve kimyasal etkilerle kırılarak sarmal yapının çözülmesi olayına denatürasyon denir (Alberts ve ark., 2002; Temizkan ve Arda, 2008). DNA Tm derecesi, DNA çift zincirinin %50'sinin denatüre olması için gerekli olan sıcaklık derecesi olarak ifade edilmektedir (Barker, 1971). DNA dizilerinin erime profili karakteristiktir, erime profillerindeki kararlılığı belirleyen en önemli faktörler sekans uzunluğu ve bu sekansın sahip olduğu GC yüzdesidir. Denatürasyon sıcaklığı DNA'nın kararlılığına bağlı olduğundan sekans yapısı denatürasyonu doğrudan etkilenmektedir (Ririe ve ark., 1997). GC yüzde oranı, AT yüzde oranından fazla olan bir DNA dizisinin Tm derecesi, hidrojen bağı sayısına bağlı olarak daha yüksektir. Başka bir ifadeyle, GC içeriğinin fazla olması DNA'nın kararlılığını dolayısıyla denatürasyon sıcaklığını artırmaktadır (Barker, 1971).

Denatürasyon deneyleri, DNA baz diziliminin termodinamik kararlılığa etki ettiğini göstermektedir (Wada ve ark., 1980). Aynı oranda GC içeren farklı iki dizinin termodinamik kararlılıkları farklı olacağından, GC yüzde oranları aynı olan farklı iki DNA'nın Tm dereceleri değişmektedir (Breslauer ve ark., 1986). DNA Tm derecesini

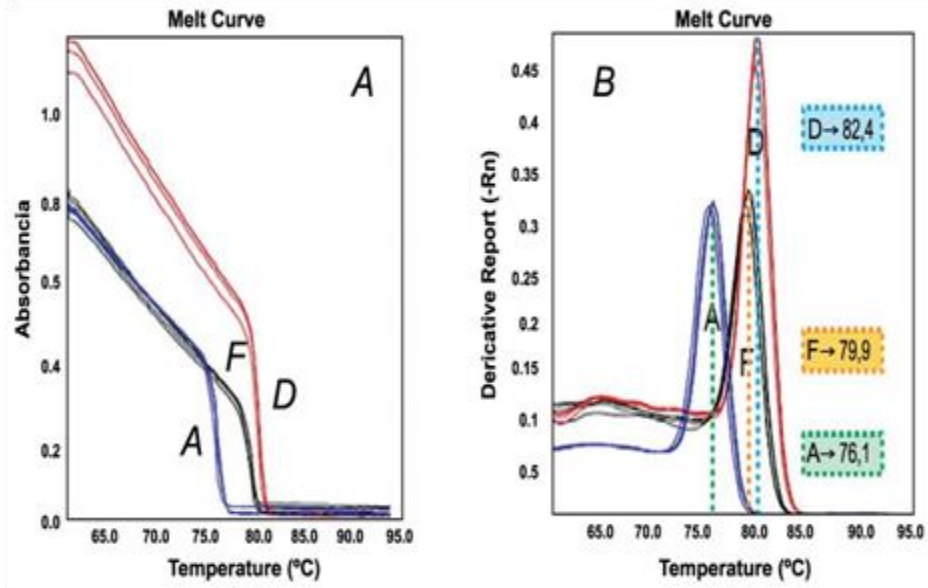
değiştiren diğeri bir durum ise mutasyonlardır. Bu değişimi mutasyona uğrayan bazı pürin veya pürimidin olması belirler. Teorik olarak, DNA baz dizisinde meydana gelen \pm %1'lik GC değişimi, T_m derecesini ± 0.4 °C değiştirmektedir (Benjamin, 1997).

2.4.2. Denatürasyon eğrisi (HRM eğrisi)

Gerçek zamanlı PZR'de hedef nükleik asit amplikasyonu ile floresan sinyal şiddeti artmaktadır. HRM analizinde ise amplifiye olan DNA örneklerinin artan sıcaklıkla birlikte denatüre olması ve floresan boyanın amplikonlardan ayrılmasına bağlı olarak floresan sinyal şiddeti kademeli olarak azalmaktadır. DNA denatürasyonunun, floresan sinyal şiddetinde oluşan değişikle takip edilebildiği eğrilere denatürasyon eğrisi denir (Nygren ve ark., 1998).

Denatürasyon eğrisi x ekseninde sıcaklık değerleri ve y eksenindeki floresan değerleri ile çizilir (Şekil 2.4.). Bu eğriler belirlenen denatürasyon sıcaklık değerleri için 2 sn'lik zaman diliminde, 0.1 °C'lik sıcaklık artışına karşılık floresan sinyal şiddetindeki değişimi gösterir. HRM analizinde elde edilen bu göstergeler ham veriyi sunmaktadır (Nygren ve ark., 1998). PZR'de oluşan primer-dimer bağlanmaları düşük sıcaklıkta denatüre olduğundan, denatürasyon eğrisi analizi ile ayırt edilmesi kolaydır (Kubista ve ark., 2006; Ghorashi ve ark., 2011).

T_m derecesi denatürasyon türev eğrisinin tepe noktasıdır ve denatürasyon eğrisinin kırılma noktası olarak ifade edilir. T_m derecesinde floresan sinyalinde hızlı bir azalma eğilimi görülmektedir (Ririe ve ark., 1997).

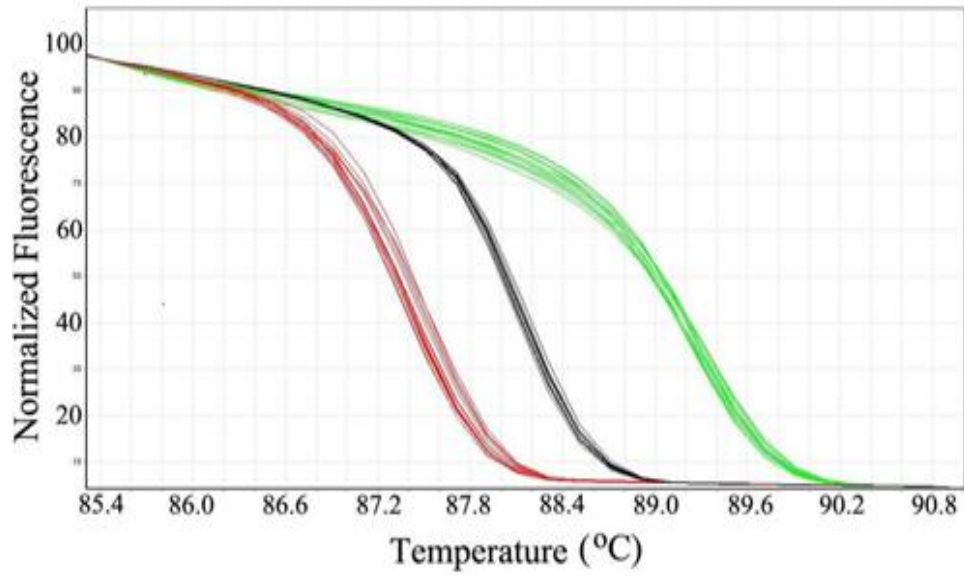


Şekil 2.4. Denatürasyon eğrisi (HRM) analizi (Becker ve ark., 2013)

2.4.3. Normalize ve türev eğriler

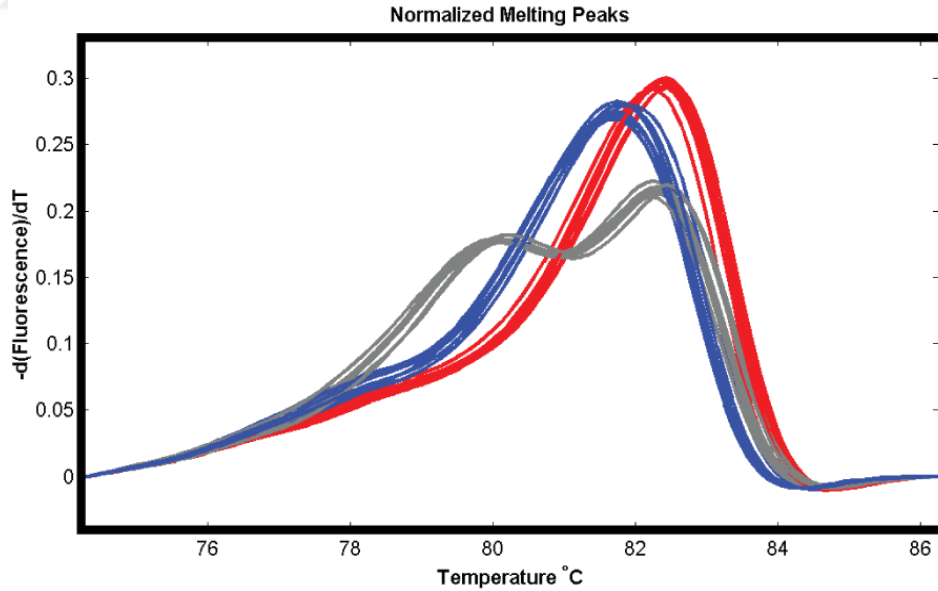
Normalize eğriler bilinen ve bilinmeyen DNA amplikonlarının karşılaştırılması için aynı başlangıç ve bitiş floresan sinyal değerlerini belirleyen ve HRM analizinin yorumlanmasına olanak veren eğrilerdir (Herrmann ve ark., 2006). Normalize eğrilerde (Şekil 2.5.) sıcaklık değerleri x ekseninde, normalize floresan değerleri y eksenindedir. HRM analizlerinde öncelikle ham veriler elde edilir ve bu verilerle normalizasyon bölgesi belirlenmektedir (Sun ve ark., 2016).

Tm derecesi değişikliklerini HRM'den sonra manuel olarak analiz etmek için denatürasyon öncesi ve sonrası faz bölgelerinin işaretlenmesi normalizasyon olarak ifade edilir. X eksenini üzerinde hareket ettirilen eğrilerin normalizasyonu ile örneklerin ortak sıcaklık değerlerini elde etmek amaçlanmaktadır (Wittwer ve ark., 2003; Tajiri-Utagawa ve ark., 2009).



Şekil 2.5. Normalize eğriler (Sun ve ark., 2016)

Türev eğri, amplikonların denatürasyonuna bağlı olarak değişen floresan sinyalinin tepe noktasıdır. Türev eğride sıcaklık dereceleri x ekseninde ve floresanın sıcaklık türevi de $(-dF/dT)$ y ekseninde (Şekil 2.6.) görülmektedir (Herrmann ve ark., 2006; Thomsen ve ark., 2012).



Şekil 2.6. Türev eğriler (Thomsen ve ark., 2012)

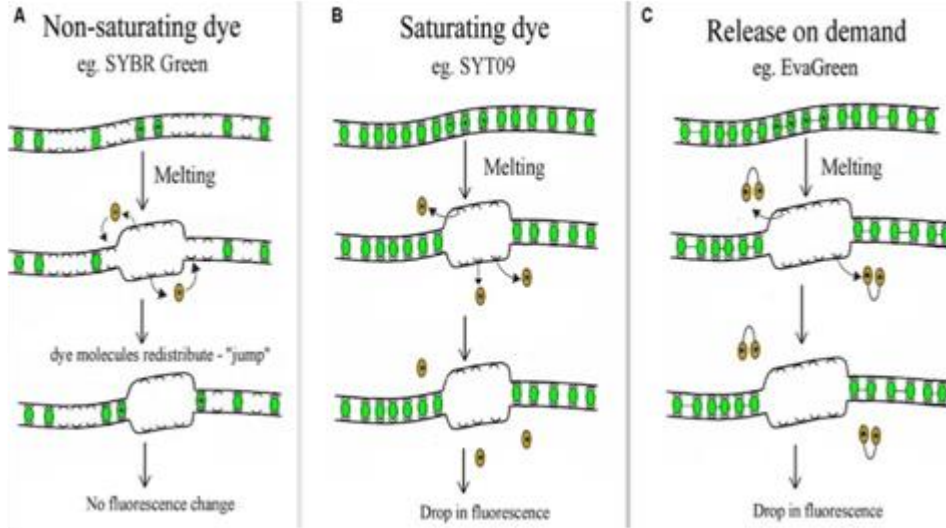
2.4.4. HRM'de kullanılan nükleik asit floresan boyalar

HRM analizlerinde floresan sinyal şiddeti değişimini gösterebilme prensibine dayanarak, çift zincirli DNA'nın denatürasyon karakterinin belirlenmesini sağlayan floresan boyalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu boyaların spesifik problemlerden daha ekonomik olduğu bildirilmiştir (White ve Potts, 2006; Varillas ve ark., 2011). HRM analizlerinde kullanılan nükleik asit floresan boyalar, çift zincirli DNA'ya bağlanma özelliği olan ve tek zincirli DNA ile etkileşim göstermeyen boyalardır. Floresan sinyalin doğru bir şekilde ölçülmesi, özgül floresan boyaların çift zincirli DNA moleküllerine yoğun olarak bağlanması ve daha sonra DNA denatürasyonunun doğru bir şekilde takip edilebilmesine bağlıdır (Cosa ve ark., 2001). Floresan boyaların ampliconlarla doyumluğa ulaşabilmesi için analiz için optimize edilmesi gerekmektedir (Ghorashi ve ark., 2011).

Birinci nesil boyalar olarak nitelendirilen Etidyum bromür ve Propidyum iyodit gibi boyalar çoğunlukla nükleik asit görüntüleme, floresan mikroskop incelemeleri ve DNA işaretlemelerde kullanılmaktadırlar. Ancak bu boyaların kullanımı mutajenik ve karsinojenik özellikleri ve yeni nesil boyaların kullanımı nedeni ile son dönemlerde azalmıştır (Cosa ve ark., 2001).

HRM analizlerinde kullanılan ve ikinci nesil boyalar olarak değerlendirilebilecek *SYBR Green* gibi boyaların; reaksiyon içerisindeki yüksek konsantrasyonları PZR inhibitörü olarak, düşük konsantrasyonları ise denatüre olmamış bölgelere yeniden bağlanmaları yönüyle analiz sonucunu olumsuz şekilde etkilemektedir. Böyle bir durumda denatürasyon kinetiklerinin görüntülenmesi ve T_m derecesi saptama hassasiyetinin azalması, hatalı floresan sinyal ölçümlerini ortaya çıkarmaktadır (Monis ve ark., 2005; Vossen ve ark., 2009; Sun ve ark., 2016).

Son dönemlerde PZR'yi inhibe edici etkilerinin daha az olduğu tespit edilen LCGreen, EvaGreen, SYTO9 gibi üçüncü nesil boyalar, bu özellikleri nedeniyle yüksek konsantrasyonlarda kullanılabilir. Ampliconların bu boyalar ile olan doyumluğunu arttırmak için yüksek konsantrasyonda kullanılması durumunda istenmeyen bağlanmaların azalacağı bildirilmiştir (Şekil 2.7.) (Monis ve ark., 2005; Sun ve ark., 2016).



Şekil 2.7. Boya doygunluk modeli (Sun ve ark., 2016)

Bu boyaların kullanımı ile ölçülen floresan sinyal şiddetindeki değişiklik denatürasyonu doğru oranda yansıtmaktadır. PZR'yi inhibe edici etkilerinin az olduğu bilinen boyaların yüksek doygunlukta kullanımı ile HRM'de hassasiyetin arttığı görülmüştür (Wittwer ve ark., 2003; Herrmann ve ark., 2006).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Aşı Suşu

Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden (Ankara, Türkiye) temin edilen canlı attenüe liyofilize PPR aşısı (Nig 75/1) RT-PZR analizlerde pozitif kontrol olarak; HRM analizlerinde genetik hat I'i temsil etmesi için kullanıldı.

3.2. Saha Suşları

Çalışmamızda Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğüne 2015-2017 yıllarında PPR şüphesi ile gelen küçük ruminanta ait örneklerden, gerçek zamanlı RT-PZR ile PPRV pozitif değerlendirilen 45 (32 koyun ve 13 keçi) adet kan (11) ve doku (34) örneği kullanıldı. Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü otopsi salonunda alınan doku (akciğer, karaciğer, dalak ve mezenterik lenf nodülü) ve buffy coat' ları elde edilen EDTA'lı kan örnekleri, hücre kültürü ve viral RNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere -80 °C de saklandı. Eş zamanlı olarak Enstitü Numune Kabul Biriminden çalışmada kullanılan örnekler ile ilgili bilgi alındı (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Saha örneklerine ait bilgiler

Sıra No	İl-İlçe	Tür	İrk	Cinsiyet	Yaş	PPR Aşı Durumu	PPR Aşı Tarihi (güncel)	Numune Türü	Klinik Bulgular ve Nekropsi
1	Niğde	Koyun	Akkaraman	D	Fötüs	-	-	AKC, KC, Dalak, Beyin	Klinik bulgu yok
2	Antalya	Koyun	İvesi	D	3≤	Aşılı	28.12.2015	Kan	Ateş
3	Antalya	Koyun	İvesi	D	5≤	Aşılı	28.12.2015	Kan	Ateş
4	Antalya	Koyun	İvesi	D	5≤	Aşılı	28.12.2015	Kan	Ateş
5	Antalya	Koyun	Pırlak	D	6≤	Aşılı	28.12.2015	Kan	Klinik bulgu yok
6	Antalya	Koyun	Pırlak	D	5≤	Aşılı	28.12.2015	Kan	Ateş
7	Antalya	Koyun	Pırlak	D	6≤	Aşılı	28.12.2015	Kan	Klinik bulgu yok
8	Aksaray	Keçi	Kıl Keçisi	D	6≤	Aşılı	24.12.2015	AKC, KC, Dalak, Lenf	Solunum problemi
9	Isparta	Koyun	Pırlak	-	Fötüs	-	-	AKC, KC, Dalak, Beyin	Klinik bulgu yok
10	Niğde	Koyun	Akkaraman	D	6≤	Aşılı	15.11.2013	AKC, KC, Dalak, Lenf	AKC Pnömoni
11	Niğde	Koyun	Akkaraman	D	2≤	Aşılı	06.09.2015	AKC, Dalak, Lenf	AKC Pnömoni
12	Konya	Koyun	Akkaraman	E	7≤	Aşısız	-	AKC, KC, Dalak, Lenf	Solunum problemi
13	Antalya	Keçi	Kıl Keçisi	D	3≤	Aşılı	16.11.2015	AKC, KC, Dalak, Lenf	Klinik bulgu yok
14	Antalya	Koyun	Pırlak	D	0- 6 ay	Aşısız	-	AKC, KC, Dalak, Lenf	Ateş, ishal
15	Niğde	Koyun	Akkaraman	D	2≤	Aşılı	08.06.2017	AKC, KC, Dalak, Lenf	AKC Pnömoni
16	Antalya	Keçi	Kıl Keçisi	D	0- 6 ay	Aşısız	-	AKC, KC, Dalak, Lenf	Ateş, ishal
17	Antalya	Keçi	Kıl Keçisi	D	2≤	Aşılı	2.12.2016	Kan	Ateş
18	Antalya	Keçi	Kıl Keçisi	E	2≤	Aşılı	2.12.2016	AKC, KC, Dalak, Lenf	AKC Pnömoni
19	Aksaray	Koyun	Akkaraman	D	3≤	Aşısız	-	AKC, KC, Dalak, Lenf	Solunum problemi

20	Aksaray	Koyun	Akkaraman	D	5≤	Aşısız	-	AKC, KC, Dalak, Lenf	Solunum problemi
21	Konya	Koyun	Akkaraman	E	6≤	Aşısız	-	AKC, KC, Dalak, Lenf	Klinik bulgu yok
22	Konya	Keçi	Honamlı	E	2≤	Aşılı	05.08.2017	AKC, KC, Dalak, Lenf	Solunum problemi
23	Konya	Koyun	Pırlak	-	Fötüs	-	-	AKC, KC, Dalak, Beyin	Klinik bulgu yok
24	Antalya	Keçi	Kıl Keçisi	D	Fötüs	-	-	AKC, KC, Dalak, Beyin	Solunum problemi, ateş
25	Antalya	Keçi	Kıl Keçisi	D	Fötüs	-	-	AKC, KC, Dalak, Beyin	Ateş
26	Konya	Koyun	Akkaraman	-	Fötüs	-	-	AKC, KC, Dalak, Beyin	Solunum problemi
27	Konya	Koyun	Akkaraman	-	Fötüs	-	-	AKC, KC, Dalak, Beyin	Solunum problemi
28	Konya	Koyun	Akkaraman	-	Fötüs	-	-	AKC, KC, Dalak, Beyin	Klinik bulgu yok
29	Niğde	Koyun	Akkaraman	-	Fötüs	-	-	AKC, KC, Dalak, Beyin	Solunum problemi
30	Niğde	Koyun	Akkaraman	D	Fötüs	-	-	AKC, KC, Dalak, Beyin	Klinik bulgu yok
31	Antalya	Koyun	Pırlak	D	5≤	Aşılı	24.09.2017	AKC, KC, Dalak, Lenf	Ateş, ishal
32	Antalya	Koyun	Pırlak	D	4≤	Aşılı	24.09.2017	AKC, KC, Dalak, Lenf	AKC Pnömoni
33	Konya	Koyun	Akkaraman	D	5≤	Aşısız	-	AKC, KC, Dalak, Lenf	AKC Pnömoni
34	Burdur	Keçi	Kıl Keçisi	D	2≤	Aşısız	-	Kan	Solunum problemi
35	Isparta	Keçi	Kıl Keçisi	D	2≤	Aşılı	23.10.2017	Kan	Solunum problemi
36	Isparta	Keçi	Kıl Keçisi	D	3≤	Aşılı	23.10.2017	Kan	Solunum problemi
37	Isparta	Keçi	Kıl Keçisi	D	2≤	Aşısız	-	Kan	Solunum problemi
38	Konya	Keçi	Kıl Keçisi	-	Fötüs	-	-	AKC, KC, Dalak, Beyin	Klinik bulgu yok
39	Konya	Koyun	Ramonov	D	6-12 ay	Aşısız	-	AKC, KC, Dalak, Lenf	Ateş, ishal
40	Konya	Koyun	Ramonov	D	6-12 ay	Aşısız	-	AKC, KC, Dalak, Lenf	Ateş, ishal
41	Antalya	Koyun	Pırlak	-	Fötüs	-	-	AKC, KC, Dalak, Beyin	Solunum problemi, ateş
42	Konya	Koyun	Akkaraman	-	Fötüs	-	-	AKC, KC, Dalak, Beyin	Klinik bulgu yok

43	Aksaray	Koyun	Akkaraman	-	Fötüs	-	-	AKC, KC, Dalak, Beyin	Solunum problemi
44	Konya	Koyun	Akkaraman	-	Fötüs	-	-	AKC, KC, Dalak, Beyin	Solunum problemi
45	Konya	Koyun	Akkaraman	D	Fötüs	-	-	AKC, KC, Dalak, Beyin	Klinik bulgu yok
Fötüs numunelerinin anneleri PPR aşılıdır ve klinik bulgular annelere aittir. AKC: Akciğer, KC: Karaciğer									

3.2.1. Saha suşlarının hücre kültürü

Saha suşlarının hücre kültüründe izolasyonu için Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen Vero (Afrika yeşil maymun böbrek hücresi) devamlı hücre hattı kullanıldı. Hücreler ticari olarak temin edilen Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Solution (Biological industrial, İsrail-Beit HaEmek, kat no. 03-033-1B) ilaveli Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Almanya-Darmstadt, kat. no: D5796) ile fetal sığır serumu (FBS) (Biological industrial, İsrail-Beit HaEmek, kat no. 04-007-1B) kullanılarak üretildi.

3.2.1.1. Hücre kültüründe kullanılan vasatlar ve kimyasallar

Saha örnekleri DMEM içerisine %0.5 FBS ve %0.5 konsantrant antibiyotik-antimikotik solüsyonu ilave edilerek hazırlanan vasat ile laboratuvara taşındı. Hücrelerin üretilmesi amacıyla DMEM kullanıldı ve flasklarda hücrelerin çoğalmaları için DMEM'e %10 FBS ve %1 konsantrant antibiyotik-antimikotik solüsyonu ilave edildi. Doku homojenizatlarının hücre kültürüne ekiminde DMEM'e %5 konsantrant antibiyotik-antimikotik ilave edilerek hazırlanan vasat kullanıldı. Virus izolasyonunda %1 konsantrant FBS ve antibiyotik-antimikotik solüsyonu içeren Minimum Essential Medium Eagle (Sigma-Aldrich, Almanya-Darmstadt, kat. no: M4655) kullanıldı. Hücrelerin dondurulmasında %10 Dimethyl Sülfoksit-DMSO (Merck, Almanya-Darmstadt, kat. no: 102950) ilave edilerek hazırlanan fetal sığır serumu kullanıldı. Hücreler flaskın tabanından Tripsin-Versene (Biological industrial, İsrail-Beit HaEmek, kat no. 03-054-1A) ile ayrıldı. Fosfat tampon solüsyonunun (Phosphate Buffer Saline-PBS) hazırlanmasında aşağıda belirtilen kimyasallar (Çizelge 3.2.) 1 litre distile su içerisinde eritildi (Temizkan ve Arda, 2008) ve pH 7.2' ye ayarlandı (WTW inoLab, Almanya-Weilheim, kat. no: 1AA310). Daha sonra tampon çözelti 120 °C'de 30 dk sterilize edildi ve 4 °C'de saklandı.

Çizelge 3.2. PBS hazırlamada kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Miktarı
Sodyum klorür–NaCl (Sigma-Aldrich, Almanya-Darmstadt, kat no: 106404)	8000 mg (0,14 M)
Potasyum klorür-KCl (Sigma-Aldrich, Almanya-Darmstadt, kat no: 104936)	200 mg (2,7 mM)
Sodyum fosfat dibasic-Na ₂ HPO ₄ (Sigma-Aldrich, Almanya-Darmstadt, kat no: 106586)	910 mg (8,1 mM)
Potasyum dihidrojen fosfat-KH ₂ PO ₄ (Sigma-Aldrich, Almanya-Darmstadt, kat no: 104873)	120 mg (1,5 mM)

3.2.1.2. Hücrelerin çoğaltılması ve pasajlanması

Vero hücrelerini pasajlamada, vasat döküldükten sonra flask (75 cm²) içerisinde 2 ml Trypsin-Versene ilave edilerek kalan FBS ve hücre toksinlerini uzaklaştırmak için flask birkaç kere çalkalandı ve mevcut Trypsin–Versene pipet yardımıyla flaskdan alındı. Bu işlemin ardından 4 ml Trypsin –Versene ilave edilerek 37 °C’de %5 CO₂ altında hücreler 5 dk periyotlar ile kontrol edildi. 15 dk sonunda flaskdan tamamen ayrılan hücreler pipetle alındı ve 15 ml’lik steril falkon tüplere konuldu. Üzerlerine 4 ml vasat ilave edilen falkon tüpler 15 dk süreyle 1000 rpm’de santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı atılarak hücreler vasat ile 2 kez yıkandı (Payment ve Turdel, 1993).

Bu yıkama işleminde hücre peleti üzerine 5 ml hücre kültür vasatı eklenerek pipetleme yapıldıktan sonra santrifüj edildi ve sonra üstteki sıvı uzaklaştırıldı. Yıkamadan sonra üstteki 100 µl hücre süspansiyonuna 5 µl %0.4 tripan blue ilave edilerek hücreler thoma lamında sayıldı. Hücreler flasklar için 2 X 10⁷ hücre/ml, 6 gözlü pleytler için 2 X 10⁶ hücre/ml olacak şekilde eklendi ve flasklara 25 ml, pleytlere 2 ml vasat ilave edilerek 37 °C’de %5 CO₂ içeren atmosferde inkübe edildi (Payment ve Turdel, 1993). Kültürlerde monolayer oluşumu invert mikroskop (Olympus IX71, ABD) ile her gün kontrol edildi ve hücre kültür vasatı 2 günde bir değiştirildi. Yaklaşık olarak %90 oranında monolayer oluşuncaya kadar inkübasyona devam edildi ve flasklardan hücre kültürünün devamlılığı için yeni pasajlar yapıldı. 6 gözlü pleytler ise virus inokulasyonunda kullanıldı.

3.2.1.3. Hücrelerin dondurulması ve çözündürülmesi

Hücre peletinin üzerine 1/10 oranında DMSO içeren FBS eklenerek homojenizasyonun ardından 2 ml'lik kriyotüplere taşınan hücreler önce 15 dk 4 °C'de sonra 30 dk - 20 °C'de inkübe edilerek sıvı azot tankına kaldırıldı (Payment ve Turdel, 1993).

Dondurulmuş hücrelerden pasaj yapmak için 37 °C'de su banyosunda (Memmert W350, Almanya-Schwabach) hücreler hızlı bir şekilde çözündürüldü ve pasajlama işleminde de belirtildiği şekilde yıkama yapılarak DMSO uzaklaştırıldı. Yıkama işleminin ardından hücrelere vasat ilave edilerek flasklarda monolayer oluşması için 37 °C de %5 CO₂ içeren atmosferde inkübe edildi (Payment ve Turdel, 1993).

3.2.1.4. İnokulum hazırlanması ve monolayer hücre kültürüne inokulasyon

Doku homojenizatları, steril ependorf tüplere inokulum vasatı ilave edilerek doku parçalayıcı ile hazırlandı. 4 °C - 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edilen homojenizatın süpernatant kısmı 0.20 µm'lik enjektör filtreden (Sartorius Minisart, Almanya-Goettingen, kat. no: 16534) geçirilerek inokulum elde edildi (Payment ve Turdel, 1993). İnokulum 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ ve 10⁻⁴ olacak şekilde sulandırıldı ve hücre kültürüne inokulasyon için %90 monolayer gözlenen 6 gözlü pleytler kullanıldı.

Adsorbsiyona bağlı inokulasyon yöntemi ile inokulasyon yapıldı (Payment ve Turdel, 1993). Hücre yüzeylerinin toksik maddelerden arındırılması için PBS ile yıkama işlemine tabi tutuldu ve her bir göze 200 µl olmak üzere stok inokulum, inokulum dilasyonları ve negatif kontrolün her biri ikişer göze inokule edildi. Daha sonra pleytler yavaş bir şekilde çalkalandı ve 1 saat 37 °C'de %5 CO₂ içeren atmosferde inkübe edildi. İnkübasyon süresince 15 dakikada bir pleytler çalkalandı. İnkübasyonun sonunda inokulum pipet yardımıyla alındı ve hücrelerin üzerine 2 ml virus izolasyon vasatı ilave edilerek 37 °C'de %5 CO₂ ortamlı inkübatöre kaldırıldı.

Hücreler invert mikroskopda 5 gün süre ile her gün kontrol edildi ve bu süreyi takiben infekte hücrelerden kör pasaj yapıldı. Kör pasaj için 5. günün sonunda 6 gözlü hücre pleytleri -80 °C'de 2 saat süreyle donduruldu. Daha sonra 37 °C'de 1 saat inkübe edilerek hücrelerin parçalanması ve virusun dışarı çıkması sağlandı. Santrifüj işleminin ardından süpernatant kısmı alınarak bir sonraki pasaj için kullanıldı.

3.3. Moleküler Tanımlama

3.3.1. Moleküler analizlerde kullanılan kit ve sarf malzemeler

Saha örnekleri ve hücre kültürü izolatlarından viral RNA ekstraksiyonu için ticari olarak temin edilen RNeasy Mini kit (Qiagen, Almanya-Hilden, kat. no: 74104) kullanıldı. Gradient RT-PZR, RFLP RT-PZR ve HRM analizleri için OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Almanya-Hilden, kat. no: 210212); gerçek zamanlı RT-PZR analizi için QuantiFast Probe RT-PCR Plus Kit (Qiagen, Almanya-Hilden, kat. no: 204482) kullanıldı. HRM analizlerinde nukleik asit floresan boya olarak EvaGreen (Biotium, ABD-Fremont, kat no:31000), ve RFLP analizlerinde EcoR1 (Thermo Scientific, ABD-Waltham, kat. no:ER0271) restriksiyon enzimi kullanıldı. Primerler ve prob MacroGen (Güney Kore-Seoul) firmasından ticari olarak temin edildi. Çalışmanın primer setlerine ait bilgiler Çizelge 3.3.'de gösterilmektedir. Dizin analizi için ampikonların saflaştırılmasında High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Almanya-Mannheim, kat. no:11732668001) kullanıldı ve dizin analizleri BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Scientific, ABD-Waltham, kat. no:4337455) ile gerçekleştirildi. RT-PZR ürünlerini agaroz jelde yürütmek amacıyla; 1X Tris-Borat-EDTA (TBE buffer) solüsyonu, agaroz (Lonza, ABD-Rockland, kat. no: 50002), GelRed (Biotium, ABD-Fremont, kat no:41003), DNA yükleme boyası-6X Loading dye (Vivantis, Malezya-Selangor, kat. no: NM0410) ve DNA marker-100bp DNA Ladder (Vivantis, Malezya-Selangor, kat. no: NL1407) kullanıldı.

Bu çalışmada tasarlanan primer setinin (Çizelge 3.3.) hedeflediği gen bölgesine ait dizinler aşağıda gösterildiği gibidir. Kırmızı bölge forward primeri, mavi bölge reverse primeri ve yeşil bölge nükleotid değişimlerini göstermektedir.

Aşı suşuna ait hedef bölge dizini: 5'-
TCATTGATGAA**TCCCAAGC**AATTGAA**AGTTT**AAAAACCAGTCTTGAGAAG
 TCGAATCAGGCAATAGAAGAA**TCAGACTTGCAAATAAGGAGAC** -3'

Saha suşuna ait hedef bölge dizini: 5'-
TCATTGATGAA**CTCCAAGC**AATTGAG**AGTTT**AAAAACCAGTCTTGAGAAG
 TCGAATCAGGCAATAGAAGAA**TCAGACTTGCAAATAAGGAGAC** -3'

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primer setleri

Primer Adı	Primer Dizilimi 5'-3'	Gen Diziliminde Yeri	Hedef Gen	Ürün Büyüklüğü (bp)	Kaynak
PPRVF1b	AGTACAAAAGATTGCTGATCACAGT	760-784	F	448	Forsyth ve Barrett, 1995
PPRVF2d	GGGTCTCGAAGGCTAGGCCCGAATA	1183-1207			
Real-NPPRf-1	AGAGTTCAATATGTTTRTTAGCCTCCAT	483-508	N	141	Batten ve ark., 2011
Real-NPPRr-1	TTCCCCARTCACTCTYCTTTGT	551-576			
Real-NPPRp-1	FAM-CACCGGAYACKGCAGCTGACTCAGAA-Tamra	603-624			
PPRVF-HRMf	TCATTGATGAATTCCCAAGC	954-973	F	95	Bu çalışmada tasarlandı (Primer3 yazılımı)
PPRVF-HRMr	GTCTCCTTATTTGCAAGTCTGA	1027-1048			

3.3.2. Moleküler analizlerde kullanılan cihazlar

Doku örnekleri doku parçalayıcı (TissueRuptor, Qiagen, İsviçre-Hombrechtikon) kullanılarak homojenize edildi ve viral RNA ekstraksiyonları otomatik ekstraksiyon robotu (QIAcube, Qiagen, Almanya-Hilden) ile yapıldı. Elde edilen nükleik asit ekstraktlarından RNA miktar ölçümü mikro hacim spektrofotometre (DeNovix, ABD-Wilmington) kullanılarak gerçekleştirildi. Gradient ve RFLP RT-PZR analizleri LifeECO Thermal Cycler (Bioer, Çin-Hangzhou) cihazında yapıldı ve RT-PZR ürünleri Consort EV231 elektroforezde (Consort, Belçika-Hertenstraat) yürütüldü. Agaroz jel görüntüleme Slite 200W WIFI Jel Görüntüleme sistemi (Pacific Image Electronics, ABD-Torrance) kullanıldı. Gerçek zamanlı RT-PZR ve HRM analizleri ise Qiagen Rotor-Gene Q (5PLEX HRM, Qiagen, Almanya-Hilden) cihazı kullanılarak yapıldı. Dizin analizi 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Japonya-Tokyo) cihazı ile gerçekleştirildi. Analizlerde kullanılan diğer cihaz ve gereçler Çizelge 3.4.'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.4. Analizlerde kullanılan diğer cihaz ve gereçler

Mikrosantrifüj G (IKA, ABD-Wilmington)
Santrifüj-5702 (Eppendorf, Almanya-Hamburg)
Mini Vorteks (IKA, ABD-Wilmington)
Hassas terazi (Precisa, İsviçre-Dietikon, kat. no: F161401)
Etiüv Heracell 150 (Thermo Scientific, ABD-Waltham, kat. no: 50116047)
Micro strip tüp (Qiagen, Almanya-Hilden, kat. no: F161401)
Eppendorf tüp-1,5 (LP İtaliana, İtalya-Milano, kat. no: L111540)
Eppendorf tüp-2 ml (LP İtaliana, İtalya-Milano, kat. no: C385013)
Pipet takımı (Gilson, ABD-Middeolton, kat. no: F161401)
Mikrodalga fırın (Arçelik,Türkiye)

3.3.3. Viral RNA ekstraksiyonu

Saha örnekleri ve hücre kültürlerinden viral RNA ekstraksiyonu, otomatik ekstraksiyon robotu kullanılarak RNeasy Mini Kit (Kwiatek ve ark., 2007; Zakian ve ark., 2016) ile üretici firmanın belirttiği protokole uygun şekilde gerçekleştirildi. Dokulardan (akciğer, karaciğer, dalak ve mezenterik lenf nodülü) alınan 30 mg örnekler 2 ml kapaklı ependorf tüplere konuldu ve üzerine 200 µl nükleaz içermeyen su ilave edilerek doku parçalayıcı ile tamamen homojenize edildi. Homojenizatlar 15.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi ve süpernatant alınarak RNA ekstraksiyonunda kullanıldı. EDTA'lı kanlar 1500 rpm'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi ve "buffy coat" lar otomatik pipetle ayrıştırılarak RNA ekstraksiyonu için kullanıldı. CPE oluşumu gözlenen 6 gözlü hücre pleytleri -70 °C'de 2 saat süreyle dondurulduktan sonra 37 °C'de 1 saat tutularak hücreler parçalandı. Vasatlar daha sonra 3000 rpm'de 4 °C - 15 dk santrifüj edildi ve RNA ekstraksiyonunda kullanıldı.

3.3.3.1. RNA dilüsyonlarının hazırlanması

RNA ekstraktlarının konsantrasyonu mikro hacim spektrofotometre cihazında 30 ng/µl olacak şekilde deiyonize su (ddH₂O) ile sulandırılarak ölçüldü ve analizler yapılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

3.3.4. Viral RNA'nın gerçek zamanlı RT-PZR ile tespit edilmesi

Saha örnekleri Batten ve ark. (2011)'nın bildirdiği gerçek zamanlı RT-PZR (Çizelge 3.3.) modifiye edilerek PPRV (N gen) pozitif tespit edildi. QuantiFast Probe RT-PCR Plus Kit ile yapılan analizlerde, PPR aşısı pozitif kontrol, nükleaz içermeyen su negatif kontrol olarak kullanıldı. Her bir 0.2 ml'lik PZR tüpü için gerçek zamanlı RT-PZR protokolü (Çizelge 3.5.) ve termal döngü programı aşağıda gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.5. Gerçek zamanlı RT-PZR protokolü

Reaktif	Miktar (µl)
QuantiFast Mix1	6.25
QuantiFast Mix2	6.25
QuantiFast RTMix	0.5
Primer Forward (10 pmol/µl)	1
Primer Reverse (10 pmol/µl)	1
Probe (5 pmol/µl)	1
Viral RNA (30 ng/µl)	5
Distile su	4
Toplam hacim	25

Termal döngü programı

Ters transkripsiyon	50 °C	20 dk	
PZR başlangıç aktivasyonu	95 °C	5 dk	
Denatürasyon	95 °C	15 sn	} 40 döngü
Bağlanma / Uzatma	60 °C	30 sn	

3.3.5. Viral RNA'nın konvansiyonel RT-PZR ile tespit edilmesi

Gerçek zamanlı RT-PZR ile PPRV (N gen) tespit edilen saha örnekleri, eş zamanlı olarak Forsyth ve Barrett'in (1995) bildirdiği konvansiyonel RT-PZR (Çizelge 3.3) ile PPRV F gen pozitif tespit edildi. OneStep RT-PCR Kit kullanılan analizlerde, elde edilen ampikonlar %1.5'lik agaroz jel elektroforezde 120 voltta 30 dk yürütülerek UV görüntüleme sisteminde değerlendirildi. Her bir 0.2 ml'lik PZR tüpü için RT-PZR protokolü (Çizelge 3.6.) ve termal döngü programı aşağıda gösterildiği gibidir

Çizelge 3.6. Konvansiyonel RT-PZR protokolü

Reaktif	Miktar (µl)
5X RT-PCR Buffer	5
5X Q Solution	5
10 mM dNTP mix	1
Primer PPRVF1b (10 pmol/µl)	1
Primer PPRVF2d (10 pmol/µl)	1
Enzyme Mix	1
Viral RNA (30 ng/µl)	3
Distile su	8
Toplam hacim	25

Termal döngü programı

Ters transkripsiyon	50 °C	30 dk	
PZR başlangıç aktivasyonu	95 °C	15 dk	
Denatürasyon	94 °C	1 dk	} 40 döngü
Bağlanma	50 °C	1 dk	
Uzatma	72 °C	2 dk	
Son uzatma	72 °C	10 dk	

3.3.5.1. RT-PZR ürünlerinin görüntülenmesi

Viral RNA üzerinde hedef bölgenin amplifikasyonu ve primer dimerlerin oluşmadığından emin olabilmek için RT-PZR ürünleri %1.5'lik agaroz jelde yürütülerek UV görüntüleme sisteminde değerlendirildi. Agaroz jel 600 mg agaroz üzerine 90 ml 1X TBE solüsyonu ilave edilerek hazırlandı. Erlenmayer içerisinde sulandırılan süspansiyon daha sonra mikrodalga fırında eritilerek homojen hale getirildi. 60 °C'ye kadar soğutulan karışımın içerisine 9 µl GelRed ilave edilerek iyice karıştırıldıktan sonra tarakları takılı olan jel taşıyıcısına dökülerek donması için 30 dk

bekletildi. Kullanılan 1X TBE solüsyonu, stok 5X TBE solüsyonundan steril distile su ile seyreltilerek hazırlandı (Çizelge 3.7.).

Çizelge 3.7. Tris-Borat-EDTA (TBE) Solüsyon Hazırlama Formülasyonu (5x/l)

Kimyasal Adı	Miktarı
Trizma-base (Thermo Scientific, ABD-Waltham, kat no:T6066)	54 gr
Borik asit (Thermo Scientific, ABD-Waltham, kat no:B6768)	27.5 gr
EDTA (Thermo Scientific, ABD-Waltham, kat no:E5134)	5.92 gr

Agaroz jelin donmasının ardından taraklar uzaklaştırıldı ve jel taşıyıcısı ile birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın içerisine jelin üzerinde 3-4 mm olacak şekilde 1X TBE buffer ilave edildi. 5 µl PZR ürünü 1 µl DNA yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendi. Elektroforezde 120 voltta 30 dk yürütülerek Slite 200W WIFI Jel görüntüleme sisteminde görüntülendi ve DNA marker baz alınarak değerlendirildi.

3.4. PPRV Aşı ve Saha Suşlarının Moleküler Ayrımı

3.4.1. Primer tasarımı

PPRV aşı ve saha suşlarının tanımlanması ve moleküler ayrımına yönelik olarak yapılan analizlerde kullanılan primerler, PPRV F gen 954-1048 nükleotid aralığında kalan 95 bç'lik dizinde ve Primer3-v.0.4.0 (Untergasser ve ark., 2012) yazılımı ile tasarlandı. Bu amaçla referans alınan dizin verileri (genetik hat I Nigeria 75/1-X74443, genetik hat IV; KU325490, JQ519926, JQ519924, KF478924, KF478923, KF478921, KC476651) National Center Biotechnology Information (NCBI) servisinin Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul ve ark., 1997) web sayfasından (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) temin edildi. Ticari olarak liyofilize halde temin edilen primerler, PZR şartlarına uygun olacak şekilde 100 pmol/µl hacimde nükleaz içermeyen steril distile su ile çözülerek 20 µl kadar porsiyonlara ayrıldı ve analizlerde kullanılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.4.2. Primer optimizasyonu

Gerçek zamanlı RT-PZR ile kombine HRM analizlerinde kullanılan primer seti için uygun bağlanma sıcaklığını belirlemek amacıyla OneStep RT-PCR Kit kullanılarak gradient RT-PZR yapıldı. Primer optimizasyonunda; 10 pmol/μl primer dilüsyonu her bir PZR tüpü içerisinde son konsantrasyonu 0.4 pmol/μl ve 0.6 pmol/μl, bağlanma sıcaklıkları ise 52, 55 ve 58 °C olacak şekilde RT-PZR çalışmaları yapılarak uygun bağlanma sıcaklığı belirlendi.

Analizlerde PPR aşısı pozitif kontrol, nükleaz içermeyen su negatif kontrol olarak kullanıldı. Her bir 0.2 ml'lik PZR tüpü için RT-PZR protokolü (Çizelge 3.8.) ve termal döngü programı aşağıda gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.8. Gradient RT-PZR protokolü

Reaktif	Son Primer Konsantrasyonu	
	0.4(pmol/μl)	0.6(pmol/μl)
5X RT-PCR Buffer	5 μl	5 μl
5X Q Solution	5 μl	5 μl
10 mM dNTP mix	1 μl	1 μl
Primer PPRVF-HRMf (10 pmol/μl)	1 μl	1,5 μl
Primer PPRVF-HRMr (10 pmol/μl)	1 μl	1,5 μl
Enzyme Mix	1 μl	1 μl
Viral RNA (30 ng/μl)	3 μl	3 μl
Distile su	8 μl	7 μl
Toplam hacim	25 μl	25 μl

Termal döngü programı		
Ters transkripsiyon	50 °C	30 dk
PZR Başlangıç aktivasyonu	95 °C	15 dk
Denatürasyon	94 °C	30 sn
Bağlanma	52-55-58 °C	30 sn
Uzatma	72 °C	1 dk
Son uzatma	72 °C	10 dk

} 40 döngü

3.4.3. Gerçek zamanlı RT-PZR ve HRM analizi

3.4.3.1. Gerçek zamanlı RT-PZR analizi

Saha suşlarının HRM ile kombine uygulanan gerçek zamanlı RT-PZR analizlerinde, bu çalışmada tasarlanan primer seti kullanıldı. Tekrar edilebilirliğinin ölçülmesi amacıyla viral RNA izolasyonu ve analizler farklı günlerde üçer kez tekrar edildi. OneStep RT-PCR Kit ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda PPR aşısı pozitif kontrol, nükleaz içermeyen su negatif kontrol olarak kullanıldı. Her bir 0.2 ml'lik PZR tüpü için gerçek zamanlı RT-PZR protokolü (Çizelge 3.9.) ve termal döngü programı aşağıda gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.9. Gerçek zamanlı RT-PZR protokolü

Reaktif	Miktar (µl)
5X RT-PCR Buffer	5
5X Q Solution	5
10 mM dNTP mix	1
Primer PPRVF-HRMf (10 pmol/µl)	1
Primer PPRVF-HRMr (10 pmol/µl)	1
EvaGreen	1.25
Enzyme Mix	1
Viral RNA (30 ng/µl)	3
Distile su	6.75
Toplam hacim	25

Termal döngü programı

Ters transkripsiyon	50 °C	30 dk	
PZR başlangıç aktivasyonu	95 °C	10 dk	
Denatürasyon	95 °C	30 sn	} 40 döngü
Bağlanma	55 °C	30 sn	
Uzatma	72 °C	30 sn	

3.4.3.2. HRM analizi

HRM analizleri aynı reaksiyon tüpünde gerçek zamanlı RT-PZR'yi takiben ~15–30 dk'da gerçekleştirildi. İncelenen tüm örnekler her analizde ikili ya da üçlü olarak çalışıldı ve farklı günlerde en az üç defa tekrar edildi. HRM'de kullanılan kalıp RNA'lar 30 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı ve her bir 0.2 ml'lik PZR tüpü için Çizelge 3.9.'da belirtilen reaksiyon karışımı hazırlandı. Analizler Çizelge 3.10.'da gösterilen reaksiyon koşullarında, ampikonlar için 30 °C'lik denatürasyon aralığında her 2 sn'de 0.1 °C sıcaklık artışıyla gerçekleştirildi. Tm derecelerini ifade eden denatürasyon aralığı

ise 60-90 °C olarak belirlendi. Rotor-Gene Q series software version 2.3.1-Build 49 (Qiagen, Almanya-Hilden) yazılımı kullanılarak “HRM Normalised Graph” (Normalizasyon, %0-100 floresan aralığı), “Melt Curve Analysis” (Erime eğrisi analizi) ve “Genotypes Analysis” (Genotiplendirme analizi) analizleri yapıldı ve elde edilen veriler yorumlanarak değerlendirildi.

Çizelge 3.10. HRM analiz protokolü

Program Adı	Döngü Sayısı	Analiz Modu
Ters transkripsiyon	1	-
Başlangıç aktivasyonu	1	-
Amplifikasyon	40	Kantifikasyon
HRM	1	Erime Eğrisi

3.4.4. RFLP RT-PZR analizi

HRM ile PPRV F gen hedef alınarak genetik hat I (aşı) ve genetik hat IV (saha) ayrımı yapılan suşlar, Güler ve ark. (2014)'nın geliştirdiği RFLP RT-PZR ile teyit edildi. Bu analizde Forsyth ve Barrett'in (1995) bildirdiği yöntem modifiye edilerek çalışıldı. Her bir 0.2 ml'lik PZR tüpü için RFLP RT-PZR protokolü ve termal siklus programı Çizelge 3.6.'da gösterildi.

RT-PZR ürünlerine analizi takiben aşağıda belirtilen (Çizelge 3.11.) protokolde (her bir 0.2 ml'lik PZR tüpü için) EcoR1 enzimiyle 37 °C'de 2 saat muamele edilerek RE (restriction endonuclease) analizi yapıldı. Ürünler hazırlanan %1.5'lik agaroz jele yüklendi ve elektroforezde 120 voltta 30 dk yürütülerek UV görüntüleme sisteminde değerlendirildi.

Çizelge 3.11. RE analiz protokolü

Reaktif	Miktar (µl)
10X RE buffer	2.5
Enzim (EcoR1)	1
Ultra saf su	14.5
RT-PZR ürünü	7

3.4.5. Saha suşlarının dizin analizi

Forsyth ve Barrett'in (1995) bildirdiği primer çiftinin (Çizelge 3.3.) hedeflediği bölge HRM analizinin hedeflediği dizini içine alması nedeniyle Çizelge 3.6.'da gösterilen RT-PZR protokolü dizin analizinde kullanıldı.

3.4.5.1. PZR ürünlerinin saflaştırılması

Bu amaçla 6 adet saha suşu temsili olarak seçildi. Elde edilen PZR ürünlerine High Pure PCR Product Purification Kit ile firma tarafından belirtilen protokole uygun olarak saflaştırma yapıldı.

3.4.5.2. Dizin analizinin gerçekleştirilmesi

Saflaştırılan PZR ürünlerinin dizin analizi, 3500 Series Genetic Analyzer cihazı ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit kullanılarak gerçekleştirildi. BigDye Terminator v3.1 için reaksiyon karışımının hazırlanmasında, dizilemesi yapılacak her bir örnek için Çizelge 3.12.'de gösterilen reaksiyon protokolü hazırlandı.

Çizelge 3.12. Dizin analizi reaksiyon protokolü

Reaktif	Miktar (μ l)
BigDye Sequencing Buffer (5X)	2
BigDye Ready Reaction Premix	2
Primer (2 pmol/ μ l)	2
PZR ürünü	2
Distile su	2
Toplam hacim	10

DNA örneklerinin amplifikasyonu aşağıdaki termal siklus programında yapıldı.

Termal döngü programı

96 °C	1 dk	
96 °C	10sn	} 25 döngü
50 °C	5 sn	
60 °C	4 dk	
4 °C	∞	

Örneklerin amplifikasyonunun ardından Receiver Spin Column Safılaştırılması için her bir örneğe kolon işleminden yaklaşık 45-60 dk önce 1 gr Sephadex 14 ml distile su içinde eritilerek karışım hazırlandı ve 4 °C’de saklandı.

Receiver kolon aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı.

1. Hazırlanan sephadex’ten 750 μ l kolonun dip kısmına pipet yardımıyla bırakıldı.
2. Kolonun altındaki kapak çıkarıldı ve kolon toplama tüpüne yerleştirilerek vortekslendi.
3. 5000 rpm +2 °C’de 3 dk santrifüj edildikten sonra toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon tekrar tüpe yerleştirildi. Bu arada sıvının tümü santrifuj edildiğinden jel kristalize hal aldı.
4. Kristalize olan jelin çatlak olup olmadığı kontrol edildikten sonra pipet ucu temas ettirilmeden amplifiye edilen üründen 10 μ l üzerine eklendi.

5. Bu işlemin ardından tekrar 5000 rpm +2 °C’de 3 dk santrifuj edildikten sonra toplama tüpünde biriken sıvıdan 10 µl alınıp genetik analiz cihazının pleytine yerleştirildi ve dizin analizi işlemi yapıldı.

Dizin analizinin ardından elde edilen ham veriler SeqScape Software Verion 3.0 (Applied Biosystem) ile analiz edilerek DNA dizinleri belirlendi.

3.4.5.3. PPRV F gen soyağacı ve network oluşturulması

Dizin analizi yapılan suşlar ve GenBank’a bildirilen referans dizinler (Çizelge 3.13.), MEGA7 (Kumar ve ark., 2016) yazılımı üzerinden MUSCLE (Edgar, 2004) ile hizalandı ve “pairwise distances” (Kumar ve ark., 2016) analizi ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Saha suşlarının kısmi dizinleri ile soyağacı oluşturmak için Türkiye ve diğer ülkelerden GenBank’a rapor edilen dizinler referans alındı (Çizelge 3.13.). FASTA formatına çevrilen kısmi dizinlerin MEGA7 yazılımında Neighbour-Joining (NJ-Komşu Birleştirme) yöntemi ile bootstrap değerleri hesaplandı (1000 replicates) ve “p distance” (Kumar ve ark., 2016) parametresine göre soyağacı oluşturuldu.

Dizin analizi ve soyağacı gerçekleştirilen saha suşlarında, PPRV F gen kısmi dizini nükleotid değişimlerini tespit etmek ve evrimsel sürecini incelemek amacı ile dizinler Bioedit-v7.0.5.3 yazılımında ClustalW (Hall, 1999) üzerinde hizalandı. DnaSP6-v6.11.01 (Rozas ve ark., 2017) ve Network-v5.0.0.3 (<http://www.fluxus-engineering.com>) yazılımları ile “star contraction algorithm” (Foster ve ark., 2001) hesaplaması yapıldıktan sonra “median joining” (Bandelt ve ark., 1999) yöntemi ile network çizildi.

Çizelge 3.13. PPRV F gen için GenBank'a rapor edilen suşlar

Genetik Hat	Ülke	Genbank Erişim No	Suş Adı	Referans Kaynaklar
I	Nijerya	X74443	NIGERIA75/1	Dhar ve ark., 2002
I	Nijerya	EU267274	NIGERIA76/1	Chard ve ark., 2008
II	Fildişi sahilleri	EU267273	ICV89	Chard ve ark., 2008
III	Sudan	HQ131956	Gedarif-KSUD71	Kwiatek ve ark., 2011
III	Katar	FN995206	A37/10 30	Banyard ve ark., 2010
III	Etyopya	FN995997	Ethiopia_1996	Banyard ve ark., 2010
III	Umman	FR667553	Oman_Ibri	Banyard ve ark., 2010
III	Yemen	FN995999	Yemen_2001b	Banyard ve ark., 2010
III	Tanzanya	FN995114	R4/10	Banyard ve ark., 2010
III	Birleşik Arap Emirlikleri	FN996975	UAE_Dorcac	Banyard ve ark., 2010
III	Sudan	FN996000	Sudan_1972	Banyard ve ark., 2010
IV	Katar	FN995205	A37/10 02	Banyard ve ark., 2010
IV	Fas	KC609746	Morocco-2008	Muniraju ve ark., 2013
IV	Mısır	FR667557	Egypt_2009	Banyard ve ark., 2010
IV	Irak	FN995440	Iraq_2002	Banyard ve ark., 2010

IV	Irak	FN995439	Iraq_2000a	Banyard ve ark., 2010
IV	Çin	EU816772	China/Tibet/07-1	Wang ve ark., 2009
IV	Çin	EU815053	China/Tibet/07-02	Wang ve ark., 2009
IV	Nepal	FN996974	Nepal_2009	Banyard ve ark., 2010
IV	Bangladeş	FR667556	Bangladesh_2000	Banyard ve ark., 2010
IV	Hindistan	GQ452015	Sungri/96	Balamurugan ve ark., 2010b
IV	Kuveyt	FR667644	Kuwait_1999	Banyard ve ark., 2010
IV	Suudi Arabistan	FR667645	Saudi_Arabia_1994	Banyard ve ark., 2010
IV	Pakistan	FR667646	Pakistan_1994	Banyard ve ark., 2010
IV	İran	FN995204	R22/10	Banyard ve ark., 2010
IV	Türkiye	FR667647	Turkey_1996	Banyard ve ark., 2010
IV	Türkiye	NC_006383	Turkey 2000	Bailey ve ark., 2005
IV	Türkiye	AJ849636	Turkey/00	Bailey ve ark., 2005
IV	Türkiye	KU175170	Turkey/Dosemealti	Direkt bildiri ¹
IV	Türkiye	EF547923	PPR-TRab02	Direkt bildiri ²
IV	Türkiye	EF547922	PPR-TRab01	Direkt bildiri ²
IV	Türkiye	KC476652	TR/Konya10/2009	Güler ve ark., 2014
IV	Türkiye	KC476651	TR/Nigde02/2011	Güler ve ark., 2014

IV	Türkiye	KC476654	TR/Afyonkarahisar22/2008	Güler ve ark., 2014
IV	Türkiye	KC476653	TR/Aksaray09/2012	Güler ve ark., 2014
IV	Türkiye	JQ519917	TR/KAHRAMANMARAS/2011/49	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ519948	TR/SANLIURFA/2011/50	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ388649	TURKEY/ERZURUM/2011/5	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ388651	TR/GIRESUN/2011/43	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ519930	TR/KUTAHYA/2011/26	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ388631	TR-AYDIN-2011-29	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ388659	TR/ISTANBUL/2010/583	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ388641	TR/BURSA/2011/4	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ388645	TR/CANAKKALE/2011/3934	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ519942	TR/SAKARYA/2011/20	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ519934	TR/MANISA/2011/21	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ519965	TR/IZMIR/2011/27	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ388627	TR-AYDIN-2011-7	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ519954	SINOP/2011/47	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ519944	TR/SAMSUN/2011/7	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ388619	AMASYA2011-8	Direkt bildiri ³

IV	Türkiye	JQ519924	TR/KONYA/2011/23	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ519926	TR/KONYA/2011/36	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ519956	TR/SIVAS/2011/34	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ519939	TR/OSMANIYE/2011/52	Direkt bildiri ³
IV	Türkiye	JQ519907	TR/ADANA/2011/53	Direkt bildiri ³
Direkt bildiri ¹ : Sevik,M. ve Oz,M.E.; Direkt bildiri ² : Unsal Baca,A., Baklan,H. ve Vural,G.; Direkt bildiri ³ : Sait A. Unsal Baca A. ve Atıl E.				

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Konvansiyonel ve gerçek zamanlı RT-PZR metotları ile PPRV pozitif değerlendirilen saha örneklerinde, aşı ve saha suşlarının moleküler ayırımına yönelik olarak gerçek zamanlı RT-PZR ile kombine HRM analizi standardize edilmiştir.

4.1. Saha Suşlarının Tanımlanması

4.1.1. Saha suşlarının hücre kültürü bulguları

Hücre kültürlerinde monolayer oluşumu her gün takip edildi ve 2 günde bir olmak üzere vasat değiştirildi. %90 monolayer oluşumu ile hazırlanan inokulumlardan izolasyon çalışması yapıldı. Virus izolasyonu için hücre kültürlerine 7 gün arayla 4 kez kör pasaj uygulandı. İnkübasyon süresince hücrelerde oluşabilecek değişiklikler kontrol edildi ve 5. günden itibaren 3 örnekte (Örnek Sıra No: 14, 19, 35) CPE görüldü (Şekil 4.1.).

PPRV'nin hücre izolasyonunda adaptasyonun zor olduğu bilinmektedir (OIE, 2012). Yapılan çalışmalarda toplam örnek sayısı dikkate alındığında, virusun izole edilebildiği örnek sayısı çok düşüktür. Bu çalışmalardan Couacy-Hymann ve ark. (2005)'nin deneysel enfeksiyon nedeniyle ölen 23 keçiden 2, Özkul ve ark. (2002)'nin 328 numunedan 2, Tarakcı (2014) 34 koyun akciğerinden 2 tanesinde virusun izole edildiğini bildirilmiştir.



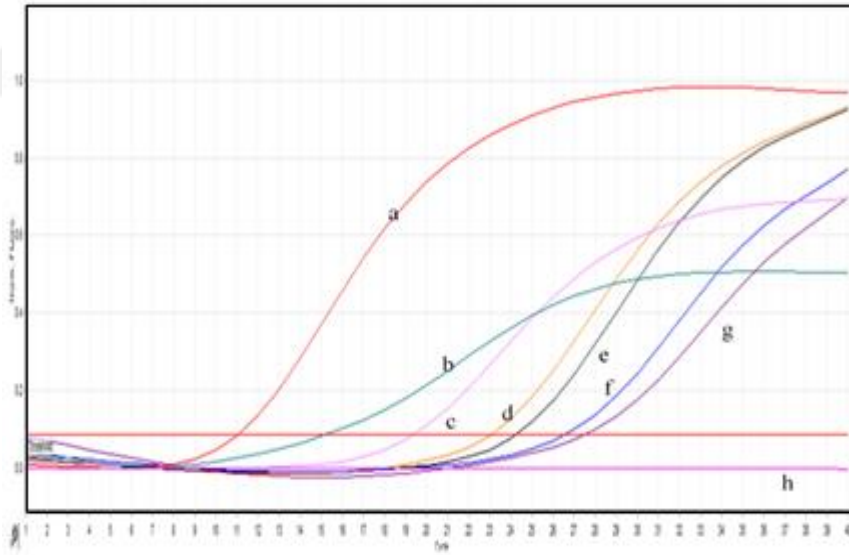
Şekil 4.1. A: Vero hücre kontrol. B: Vero hücre kültürüne inokulasyonu takiben 5. gün hücre görünümü (x40)

Virus izolasyonlarında oluşan problemlerin, hastalığın klinik seyri, örneğin tazeliği ve mevcut virus yükü gibi faktörlere bağlı olarak ortaya çıktığı bilinmektedir (Özkul ve ark., 2002; Couacy-Hymann ve ark., 2005; Couacy-Hymann ve ark., 2007; Albayrak ve Alkan, 2009; Tarakcı, 2014).

4.1.2. Saha suşlarının RT-PZR bulguları

4.1.2.1. Gerçek zamanlı RT-PZR bulguları

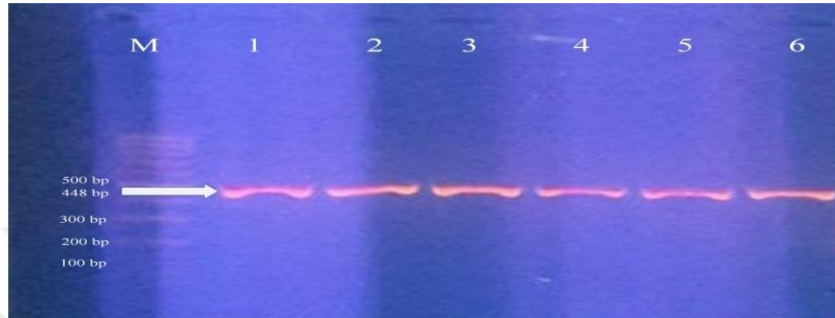
Saha örneklerinin tamamında Batten ve ark. (2011)'nın bildirdiği gerçek zamanlı RT-PZR modifiye edilerek PPRV (N gen) pozitif tespit edildi. Analizde pozitif kontrolün eşik döngü (CT-ThresholdCycle) değeri 11.09, örneklerin eşik döngü değerlerinin 15.23-33.79 aralığında olduğu belirlendi. Negatif kontrolde hiçbir amplifikasyon görülmedi. Qiagen Rotor-Gene Q cihazıyla yapılan analizden elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait görüntü Şekil 4.2.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.2. Saha suşlarının gerçek zamanlı RT-PZR analizi (a: pozitif kontrol; b, c, d, e, f, g:saha suşları; h: negatif kontrol)

4.1.2.2. Konvansiyonel RT-PZR bulguları

Gerçek zamanlı RT-PZR ile PPRV pozitif bulunan örneklerin tamamı, Forsyth ve Barrett'in (1995) bildirdiği konvansiyonel RT-PZR yöntemi ile PPRV (F gen) pozitif oldukları teyit edildi. Konvansiyonel RT-PZR sonucunda elde edilen ürünlere ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.3.'de gösterilmektedir.

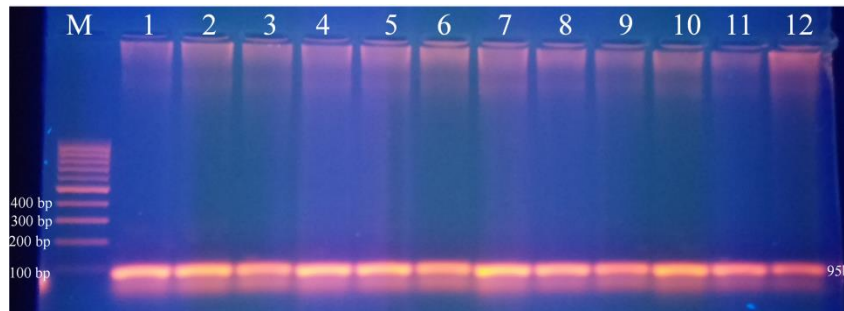


Şekil 4.3. Saha suşlarının RT-PZR jel elektroforezi (Marker, 1. hat: aşı suşu, 2-6. hatlar: saha suşları)

4.2. Aşı ve Saha Suşlarının Moleküler Ayrımı

4.2.1. Primer çiftinin optimizasyon bulguları

HRM ile kombine gerçek zamanlı RT-PZR'de kullanılan primer setinin uygun bağlanma sıcaklığını belirlemek amacıyla gradient RT-PZR yapıldı. Elde edilen ampliconlar agaroz jele yüklenerek UV görüntüleme sisteminde görüntülendi. Sonuçlar değerlendirildiğinde primer seti için en uygun bağlanma sıcaklığının 0.4 pmol/μl primer konsantrasyonunda 55 °C olduğu tespit edildi. RT-PZR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.4.'de gösterilmektedir.

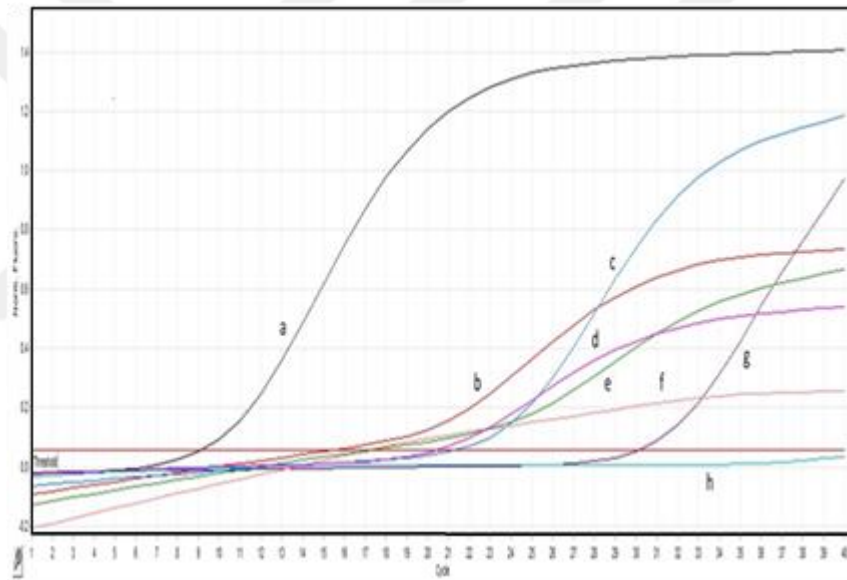


Şekil 4.4. Primer optimizasyonu jel elektroforezi (Marker, 1. hat: aşı suşu, 2-12. hat: saha suşları)

4.2.2. Gerçek zamanlı RT-PZR ve HRM analiz bulguları

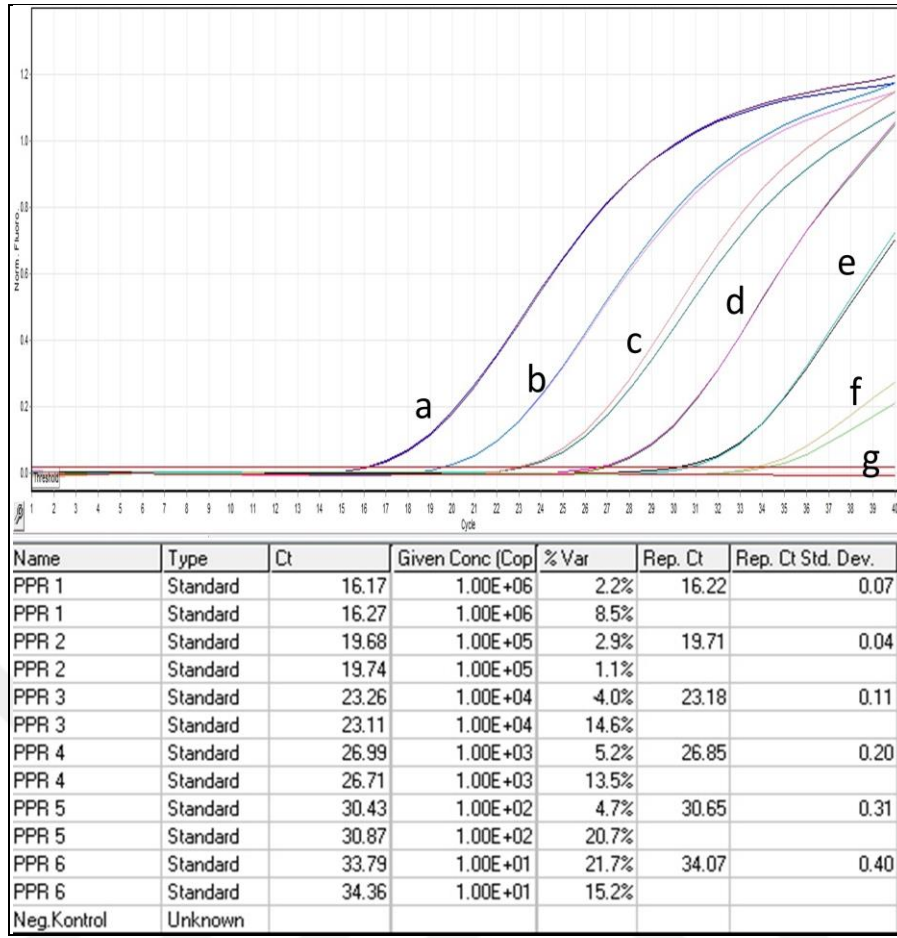
4.2.2.1. Gerçek zamanlı RT-PZR bulguları ve standart eğri oluşturulması

Saha suşları HRM analizinden önce aynı reaksiyon tüpü içerisinde gerçek zamanlı RT-PZR (Çizelge 3.9.) ile PPRV (F gen) pozitif tespit edildi. Uygulanan bu protokole göre saha örneklerinin tamamı amplifiye olurken, negatif kontrolde hiçbir amplifikasyon gerçekleşmedi. Pozitif kontrolün CT değerinin 9.11, örneklerin CT değerlerinin 14.67-36.86 aralığında olduğu görüldü. Qiagen Rotor-Gene Q cihazıyla yapılan analizden elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait temsili görüntü Şekil 4.5.'de gösterilmektedir.



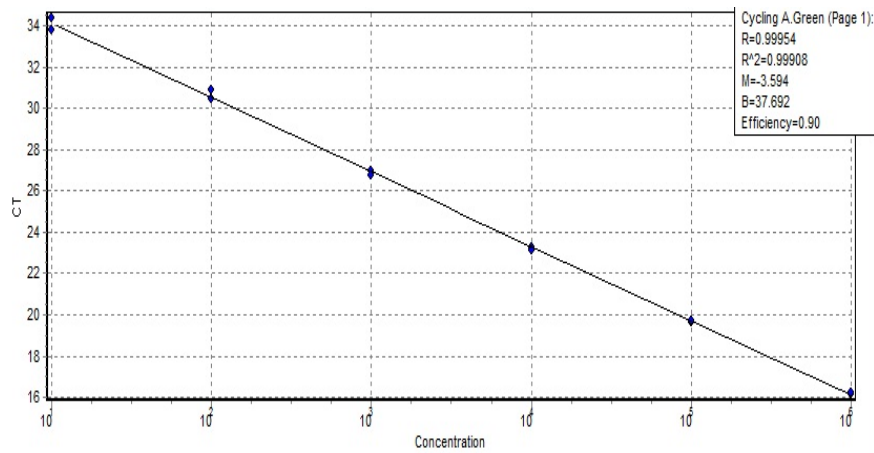
Şekil 4.5. HRM ile kombine gerçek zamanlı RT-PZR (a: pozitif kontrol; b, c, d, e, f, g: saha örnekleri; h: negatif kontrol)

Gerçek zamanlı RT-PZR'de kullanılan pozitif kontrol, etkinliğinin saptanması amacıyla 10^{-6} kadar sulandırıldı ve dilüsyonlardan elde edilen kopya sayıları standart eğrinin oluşturulmasında kullanıldı. Çoklu denemelerle yapılan analiz sonucunda pozitif kontrol dilüsyonlarının ortalama CT değerlerinin sırasıyla 16.22, 19.71, 23.18, 26.85, 30.65, 34.07 olduğu saptandı. Negatif kontrolde hiçbir amplifikasyon tespit edilmedi. Hazırlanan dilüsyon analizlerine ait amplifikasyon eğrileri, standart sapma ve % varyasyon değerleri Şekil 4.6.'da gösterilmektedir.



Şekil 4.6. Gerçek zamanlı RT-PZR’de kullanılan pozitif kontrolün sensitivitesi (a: 10^{-1} , b: 10^{-2} , c: 10^{-3} , d: 10^{-4} , e: 10^{-5} , f: 10^{-6} g: negatif kontrol)

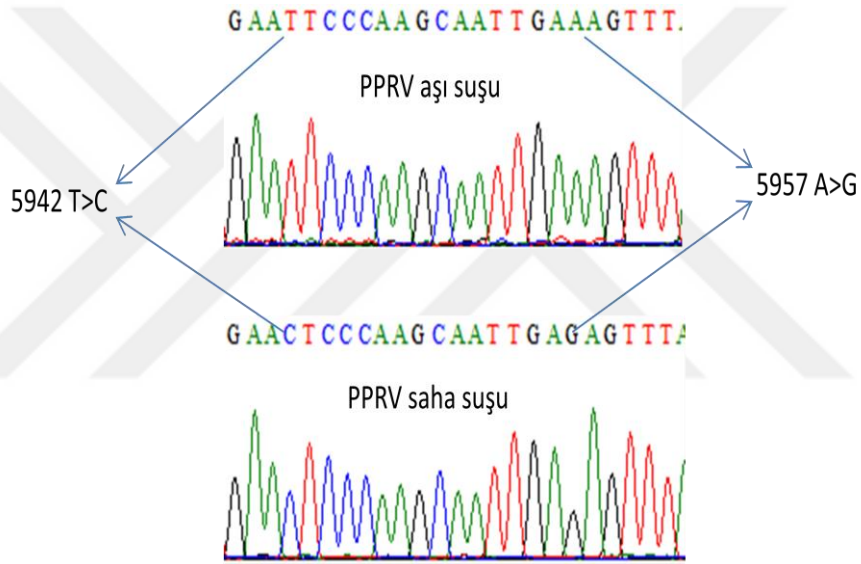
Hazırlanan dilüsyonlar ile oluşturulan standart eğride; viral yükteki azalma doğrusallık gösterdi, regresyon değeri $R^2 = 0.99908$, efficiency değeri %90, slope aralığı 3.5 olarak hesaplandı ve testin tekrarlanabilir olduğu görüldü (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Gerçek zamanlı RT-PZR standart eğri

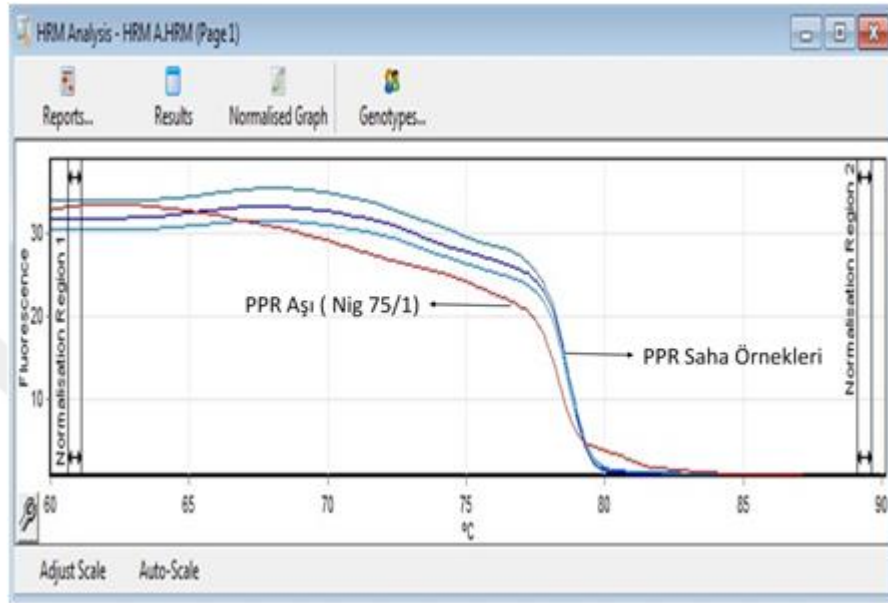
4.2.2.2. HRM analiz bulguları

Aşı ve saha suşlarında PPRV (F gen) 5942. nt'de T>C ve 5957. nt'de A>G nükleotid değişiminin (Şekil 4.8.) HRM yöntemi ile belirlenmesi ve genetik hatların tespit edilmesi için 45 adet saha örneği ile çalışıldı. Tm derecelerinin ifade edildiği denatürasyon aralığında, Rotor-Gene Q series software version 2.3.1 (Build 49) yazılımı kullanılarak "HRM Normalised Graph" (Normalizasyon, %0-100 floresan aralığı), "Genotypes Analysis" (Genotiplendirme analizi) ve "Melt Curve Analysis" (Erime eğrisi analizi) analizleri yapıldı. Analiz verilerine göre çalışılan suşların tamamının doğal enfektif saha suşu (genetik hat IV) olduğu görüldü.

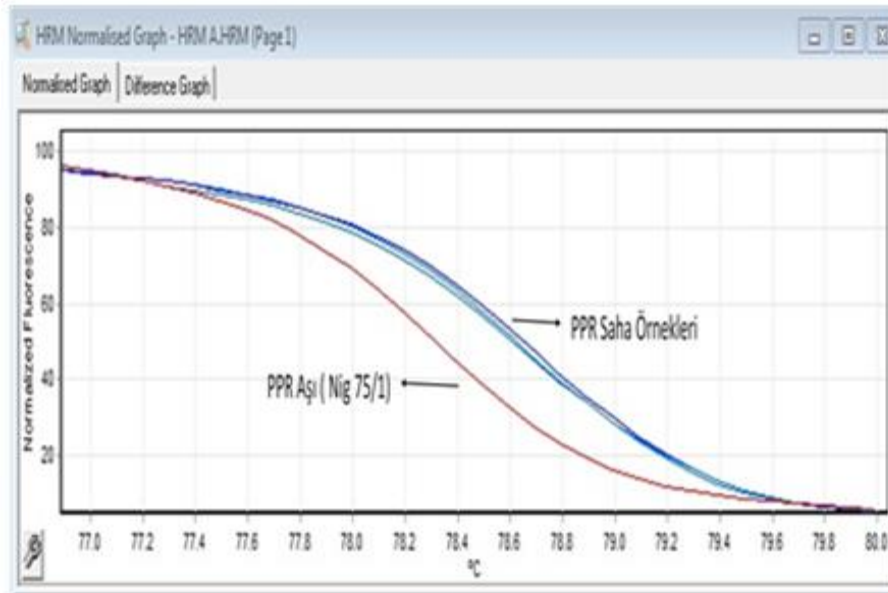


Şekil 4.8. PPRV aşı ve saha suşlarına ait dizin analizi (5942 T>C – 5957 A>G mutasyonları)

Saha suşlarının HRM analizi ile elde edilen denatürasyon eğrilerinden (Şekil 4.9.), normalizasyon bölgelerinin belirlenmesi ile Nigeria75/1 aşısı suşunun referans eğri olarak kullanıldığı normalize eğriler incelendi. Buna göre aşı ve saha suşları arasında net bir ayırım oluştu ve benzer olan örneklerin aynı grup içerisinde kümelendiği gözlemlendi (Şekil 4.10.).

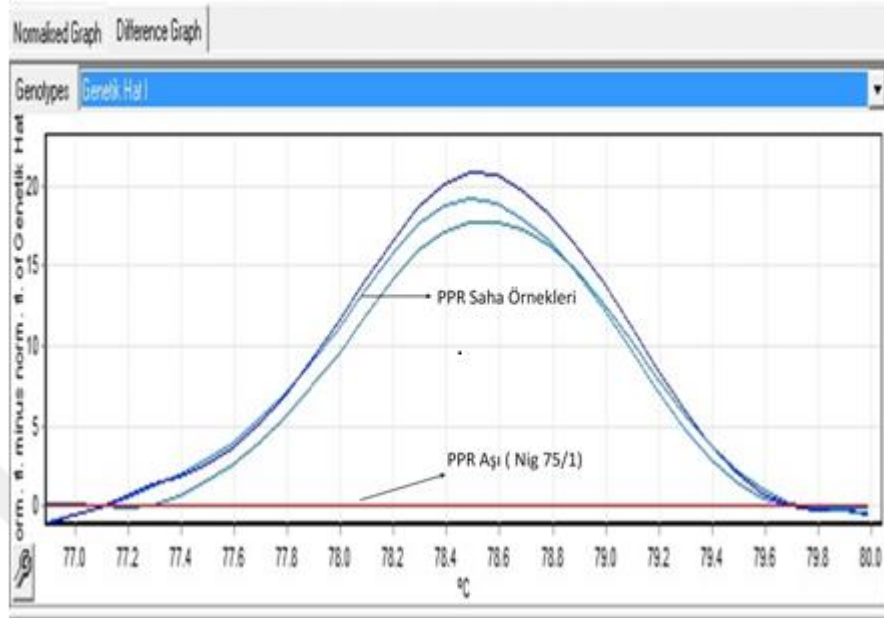


Şekil 4.9. PPRV aşısı ve saha suşları denatürasyon eğrileri



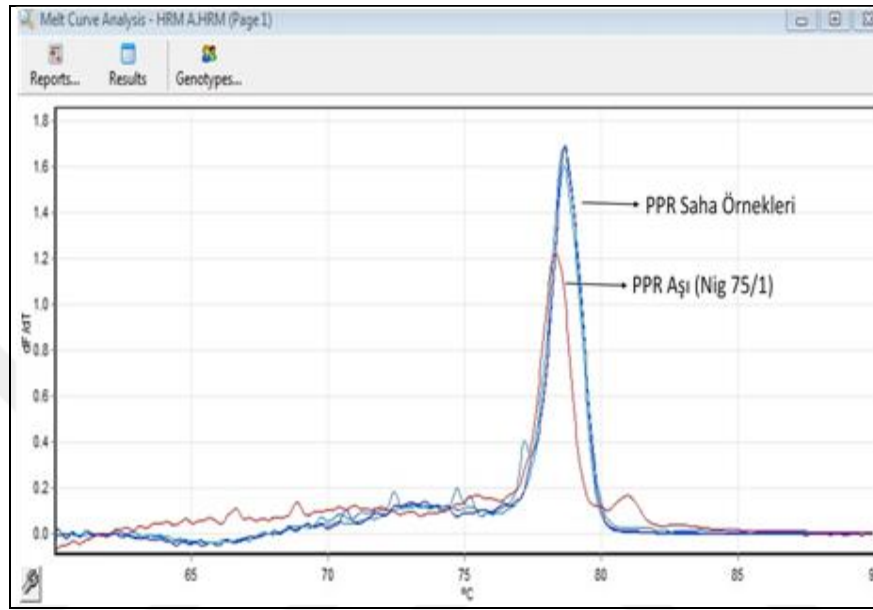
Şekil 4.10. PPRV aşısı ve saha suşları normalize eğrileri

Erime eğrilerinin normalizasyon bölgeleri ile değerlendirilmesinin ardından, aşı ve saha suşlarında genotiplendirme yönüyle de uyumlu bir tiplendirme tespit edildi (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. PPRV aşısı ve saha suşlarının genotiplendirilmesi

HRM ve genotiplendirme analizleri ile eş zamanlı olarak, Tm derecelerinin referans alındığı “Melt Curve Analysis” analizi yapıldı ve türev eğrilerine göre sonuçlar değerlendirildi. PPRV aşısı ve saha suşlarının Tm dereceleri kıyaslandığında, aşısı suşunun (Tm derecesi 78.32 °C) saha suşlarından (Tm derecesi 78.67 °C) daha erken sıcaklıkta pik verdiği gözlemlendi (Şekil 4.12.).

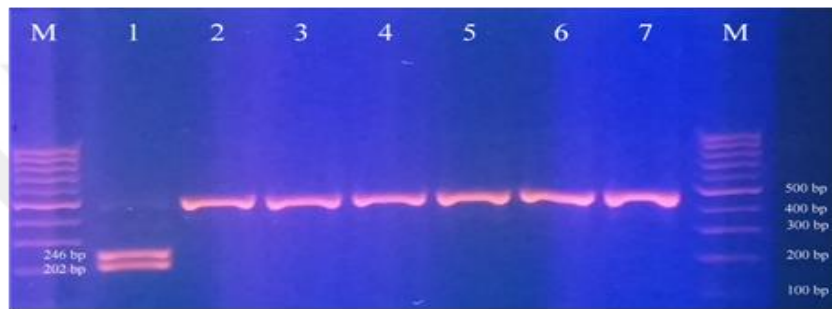


Şekil 4.12. Tm derecelerine göre tespit edilen melt curve analizi

Gerçek zamanlı RT-PZR ile kombine yapılan HRM analiz sonuçları değerlendirildiğinde; geliştirilen bu metodun PPRV F gen spesifik nükleik asit tespiti ile birlikte, aşısı (genetik hat I) ve saha (genetik hat IV) suşlarının moleküler ayrımını gerçekleştirdiği görülmüştür.

4.2.3. RFLP RT-PZR analiz bulguları

HRM ile aşı ve saha suşu ayrımı yapılan örnekler Güler ve ark. (2014)'nın geliştirdiği RFLP RT-PZR metodu ile teyit edildi. RE analizini takiben RT-PZR ürünleri agaroz jele yüklendi ve elektroforezde yürütülerek UV görüntüleme sisteminde değerlendirildi. Analiz sonucuna göre aşı suşunda iki bant (202 ve 246 bp) gözlemlenirken, saha suşlarının tamamımında hedef bölge (448 bp) görüldü. RFLP RT-PZR bulgularının HRM sonuçları ile tamamen uyumlu olduğu tespit edildi. Analize ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.13.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. RFLP RT-PZR jel elektroforezi (Marker, 1. hat: aşı suşu, 2-7. hatlar: saha suşları)

4.2.4. Dizin analizi, soyağacı ve network bulguları

Temsili olarak seçilen 6 adet saha suşu ve aşı suşunun dizin analiz verilerinin Bioedit (v7.0.5.3) ve MEGA7 yazılımları ile nükleotid bazında yapılan karşılaştırmalarında 15 nükleotid değişimi gözlemlendi. Bu değişimler Nig75/1 aşı suşunun tam genomdaki konumuna göre Çizelge 4.1.'de gösterildi.

Çizelge 4.1. PPRV F gen aşı ve saha suşları arasındaki nükleotid değişimleri

PPRV Tam Genomda Konumu	Nükleotid Değişimi	PPRV Tam Genomda Konumu	Nükleotid Değişimi	PPRV Tam Genomda Konumu	Nükleotid Değişimi
5867	G>A	5924	C>T	6035	G>A
5888	C>T	5930	G>A	6050	A>G
5903	A>G	5942	T>C	6053	C>T
5912	C>A	5957	A>G	6077	C>T
5921	A>C	6032	G>A	6080	T>C

MEGA7 yazılımında yapılan ve nükleotid değişimlerinin değerlendirildiği “pairwise distances” analizi (Kumar ve ark., 2016) ile aşı ve saha suşları arasında %5.5-6.7 oranında, saha suşlarının kendi aralarında %0.0-0.8 oranında farklı oldukları (Şekil 4.14.) tespit edildi.

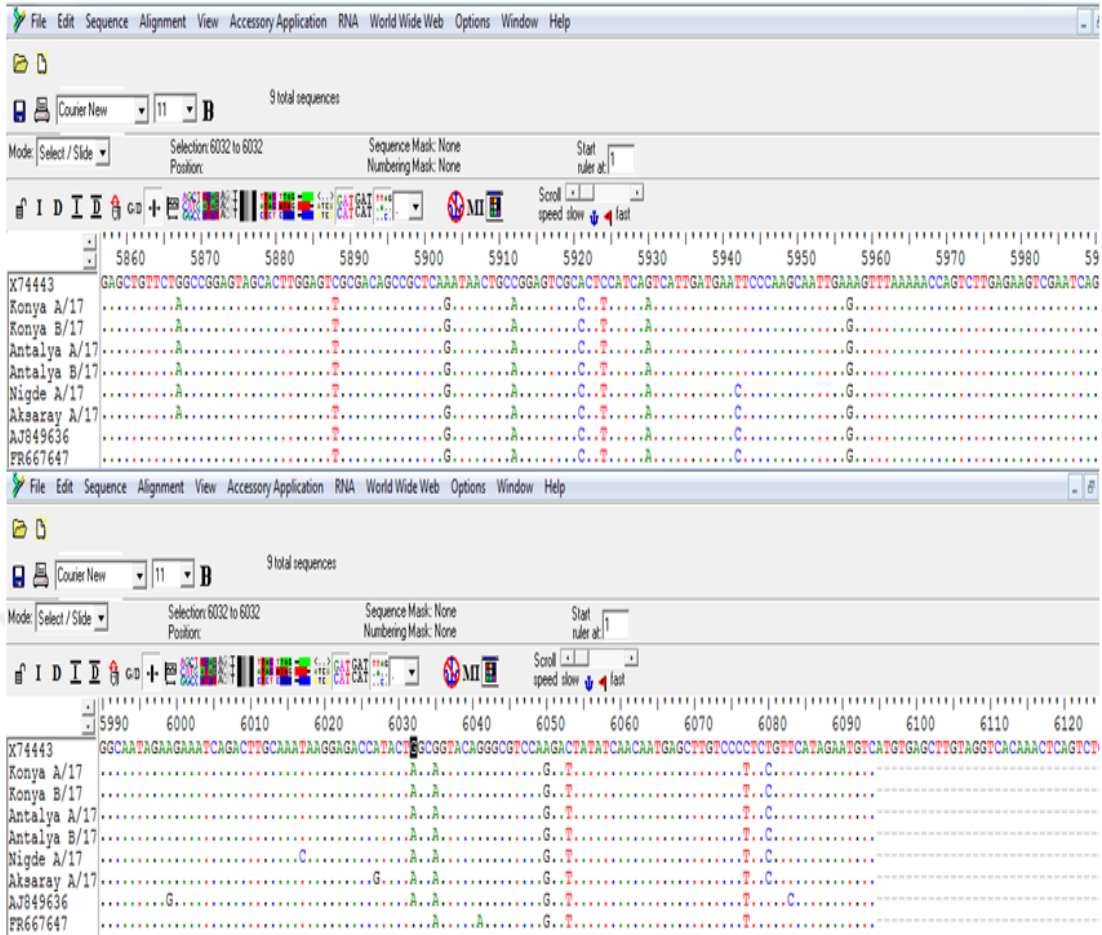
Saha suşlarının Turkey96 (FR667647) ve Turkey00 (AJ849636) suşları ile nükleotid bazında yapılan karşılaştırmasında, her iki referans suş ile beş nükleotid değişiminin olduğu görüldü. Tespit edilen bu değişimlerde saha suşlarının Turkey96 suşu ile %1.7-2.1 oranında ve Turkey00 suşu ile %2.1 oranında farklı oldukları gözlemlendi (Şekil 4.14.). Bioedit (v7.0.5.3) yazılımıyla hizalanan dizinlere ait nükleotid değişimleri Şekil 4.15.’de gösterilmiştir.

Bu değerlendirme ile uyumlu olarak; Dağalp ve Sait (2013) yaptıkları çalışmada, Türkiye’de sirküle olan PPRV F genin yüksek oranda homolog (%98-100) olduğu ve genetik değişimlerinin hızlı olmadığını belirtmiştir.



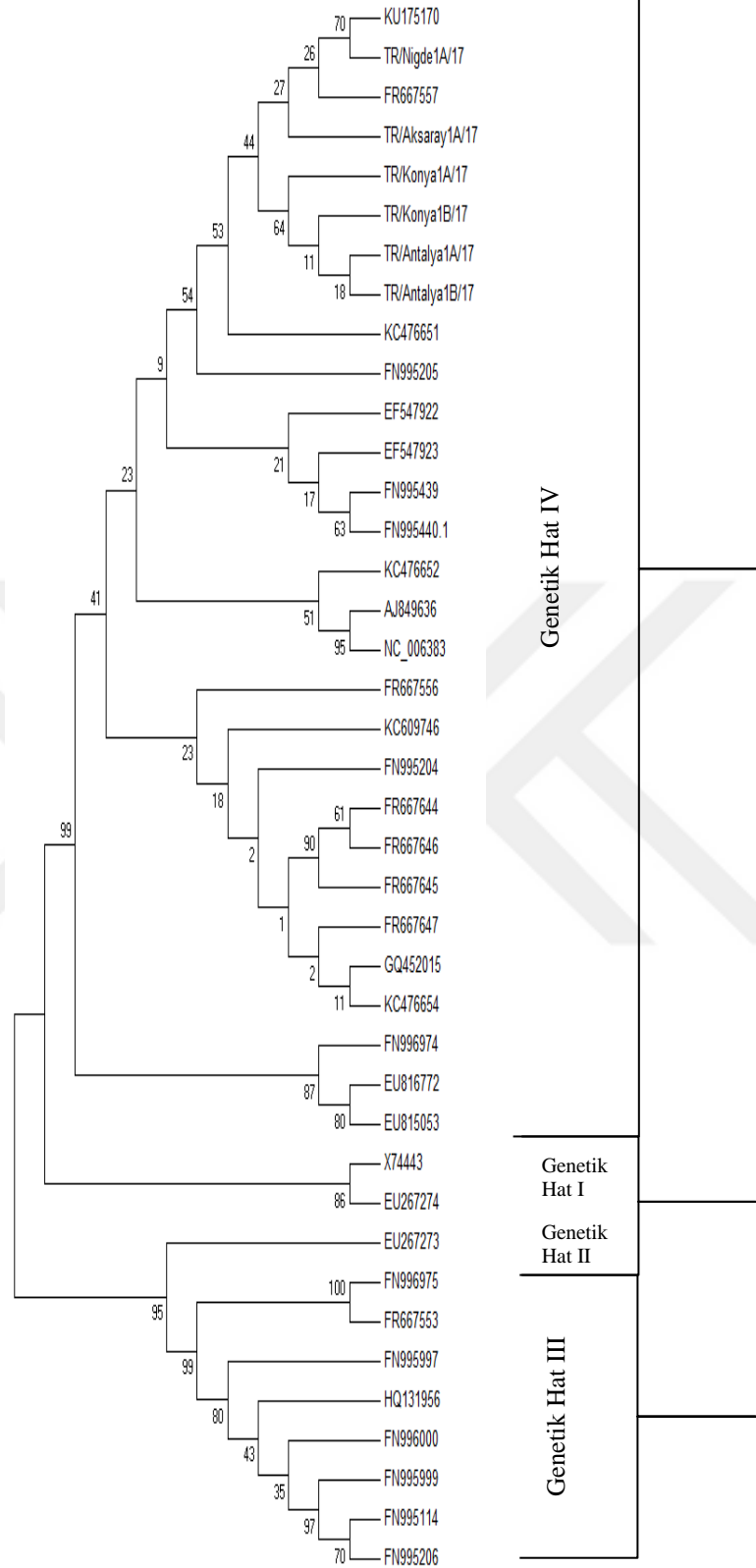
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Konya A/17		0.000	0.000	0.000	0.006	0.006	0.009	0.009	0.015
2. Konya B/17	0.000		0.000	0.000	0.006	0.006	0.009	0.009	0.015
3. Antalya A/17	0.000	0.000		0.000	0.006	0.006	0.009	0.009	0.015
4. Antalya B/17	0.000	0.000	0.000		0.006	0.006	0.009	0.009	0.015
5. Nigde A/17	0.008	0.008	0.008	0.008		0.006	0.009	0.009	0.016
6. Aksaray A/17	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008		0.009	0.009	0.016
7. AJ849636	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021		0.008	0.016
8. FR667647	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021	0.017		0.015
9. X74443	0.059	0.059	0.059	0.059	0.067	0.067	0.063	0.055	

Şekil 4.14. Pairwise Distances analizi

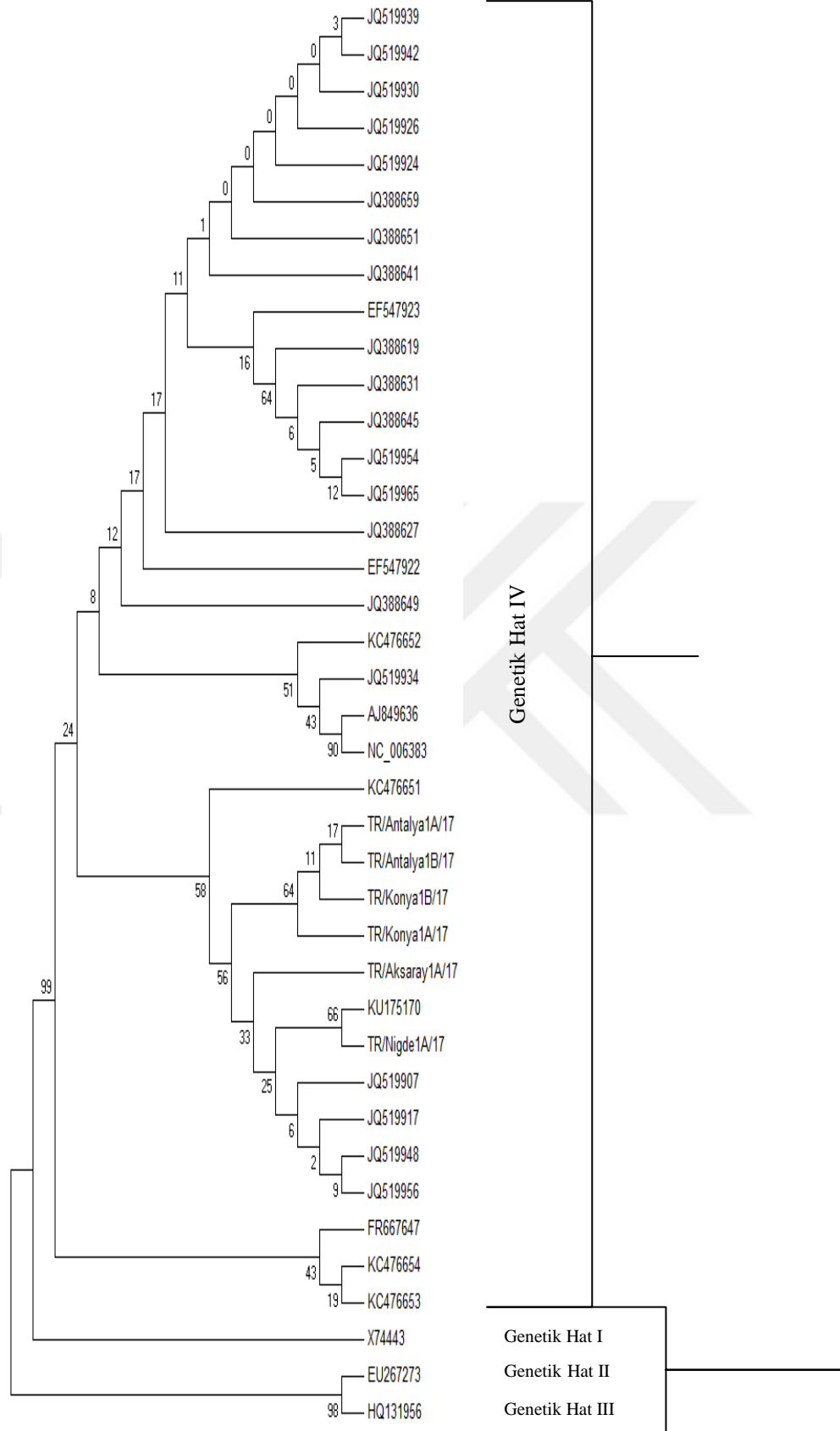


Şekil 4.15. PPRV F gen aşu ve saha şuşları nükleotid dizinleri

Saha şuşlarının genetik hatları temsil eden referans şuşlar (Çizelge 3.13.) ile oluşturulan soyağacında IV. genetik hat içinde yer aldığı görüldü. Aynı soyağacında Iraq 2002, Iraq 2000a, Turkey 2000, Turkey/00, PPR-TRab01, PPR-TRab02, Egypt 2009 ve A37/10 02 şuşlarının çalışma örneklerini oluşturan saha şuşları ile aynı genetik kümede yer aldıkları tespit edildi (Şekil 4.16.). Türkiye'nin farklı bölgelerinden bildirilen şuşlar (Çizelge 3.13.) ile oluşturulan soyağacında ise bölgesel bir ayrım olmadığı ve aynı genetik kümede yer aldıkları belirlendi (Şekil 4.17.).



Şekil 4.16. Diğer ülkelerden GenBank'a bildirilen suşlarla oluşturulan PPRV F gen soyağacı

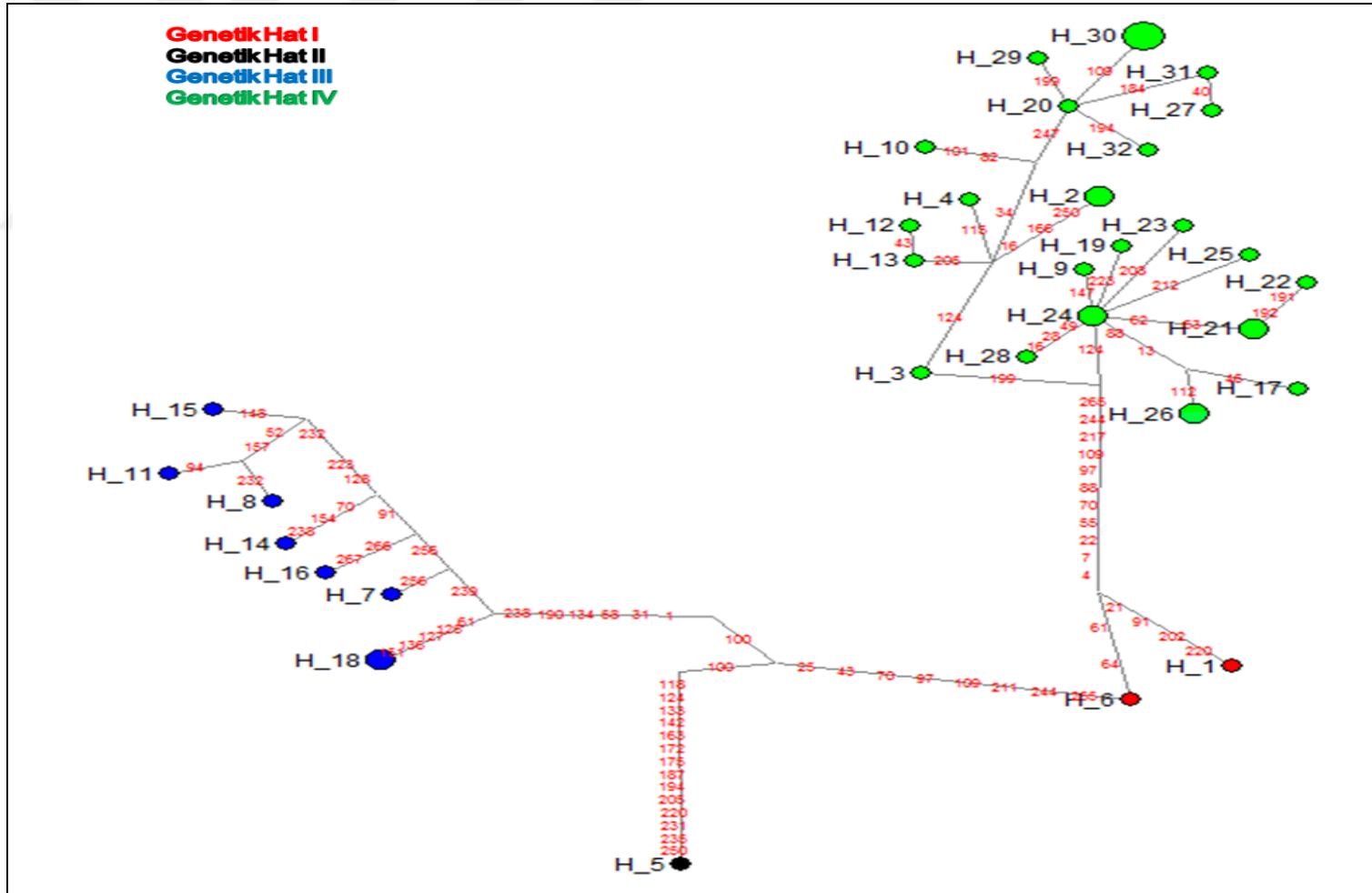


Şekil 4.17. Türkiye'den GenBank'a bildirilen suşlarla oluşturulan PPRV F gen soyağacı

Saha suşlarının F gen kısmi dizini nükleotid değişimlerini tespit etmek ve evrimsel sürecini incelemek amacı ile yapılan network çiziminde (Şekil 4.18) 32 adet haplogrup belirlendi (Çizelge 4.2.). Çizilen network'de saha suşlarının tamamının IV. genetik hat içinde yer alan diğer suşlar ile birlikte olduğu görüldü. Buna göre, H_30 ile H_31 arasında iki (100 ve 184), H_30 ile H_32 arasında iki (100 ve 194), H_31 ile H_32 arasında iki (184 ve 194) adet nukleotid farklılığı tespit edildi. Çalışma dizinlerinin oluşturduğu haplotipler (H_30, H_31, H_32) ile H_20 arasında bir (sırası ile 100, 184, 194), H_2 arasında altı, H_3, H_4, H_13 ve H_10 arasında dört, H_12 arasında beş adet nukleotid farklılığı tespit edildi. Neighbour-Joining yöntemi ile oluşturulan soyağacında (Şekil 4.16.) da görüldüğü üzere, network çiziminde saha suşlarına en yakın dizinin Egypt 2009 (H_20) olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.2. PPRV F gen network analizi haplogrupları

Haplogrup No	GenBank Erişim No	Haplogrup No	GenBank Erişim No	Haplogrup No	GenBank Erişim No
H_1	X74443	H_13	FN995440	H_24/1	GQ452015
H_2/1	AJ849636	H_14	FN995997	H_24/2	KC476654
H_2/2	NC_006383	H_15	FN995999	H_25	KC609746
H_3	EF547922	H_16	FN996000	H_26/1	EU816772
H_4	EF547923	H_17	FN996974	H_26/2	EU815053
H_5	EU267273	H_18/1	FN996975	H_27	KU175170
H_6	EU267274	H_18/2	FR667553	H_28	KC476652
H_7	HQ131956	H_19	FR667556	H_29	KC476651
H_8	FN995114	H_20	FR667557	H_30/1	TR/Konya1A/17
H_9	FN995204	H_21/1	FR667644	H_30/2	TR/Konya1B/17
H_10	FN995205	H_21/2	FR667646	H_30/3	TR/Antalya1A/17
H_11	FN995206	H_22	FR667645	H_30/4	TR/Antalya1B/17
H_12	FN995439	H_23	FR667647	H_31	TR/Nigde1A/17
Not: H_30, 31 ve 32 bu çalışmada tespit edilen saha suşlarıdır.				H_32	TR/Aksaray1A/17



Şekil 4.18. PPRV F gen network analizi

4.3. Tartışma

Küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinin Asya ve Afrika ülkelerinin pek çoğunda ekonomi, istihdam ve sürdürülebilir tarım için büyük önem taşıdığı bilinmektedir. PPR salgınları ise dünyanın bu bölgelerinde sıklıkla görülmekte ve önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Taylor ve ark., 2005, Kumar ve ark., 2014-1). FAO tarafından yapılan çalışmalar ile Türkiye'nin de aralarında bulunduğu birçok ülkede (Güney Afrika, Asya, Çin ve Güney Avrupa) mevcut küçükbaş hayvan popülasyonunun %63'ünün PPR enfeksiyon riski taşıdığı ve hastalığın yakın bölgelere hızlı bir şekilde yayıldığı rapor edilmiştir (FAO, 2009; Libeau ve ark., 2014). Bu kapsamda OIE hastalığın kontrolü çalışmalarını fakirlikle mücadele programlarında temel hedef olarak belirlemiştir (OIE, 2015). Ülkemiz küçükbaş çiftlik hayvanı yetiştiriciliği bakımından PPRV'nin potansiyel bir tehdit olduğu birçok kez ifade edilmiştir (Özkul ve ark., 2002; Yesilbag ve ark., 2005; Batten ve ark., 2011).

PPR'nin görüldüğü bölgelerde, hastalıkla mücadele kapsamında hayvan sevk ve kontrol tedbirlerinin yanısıra aşılama kampanyaları yapılmaktadır. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Koyun ve Keçi Vebası Hastalığına karşı daha etkin ve hızlı müdahale edilmesi ve hastalığın kontrol altına alınması amacıyla 2010 yılında AB destekli koyun ve keçilerin PPR aşısıyla aşılama projesini başlatmıştır (Genelge, 2010/02). Bu projede kullanılan aşı suşunun (Nigeria75/1) genetik hat I'de yer aldığı bilinmektedir (Luka ve ark., 2011; Muniraju ve ark., 2013).

PPR enfeksiyonları klinik teşhis yönüyle benzer semptom gösteren diğer vakalarla karışabilmektedir. Hastalıkla mücadelede PPRV'nin laboratuvar tanısında uygulanacak metotların etkinliği, PPR vakalarının kontrol altına alınması ve hastalık nedeniyle oluşabilecek ekonomik kayıpların en az seviyede tutulması açısından oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalarda, klinik semptomlara bağlı olarak oluşan PPR şüphesinin laboratuvar tanısı ile kesinleştirilmesi gerektiği tavsiye edilmiştir (OIE, 2004; Parida ve ark., 2015).

Moleküler metot modifikasyonları PPRV'nin rutin tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır (Forsyth ve Barrett, 1995; Balamurugan ve ark., 2006; Bao ve ark., 2008; Kerur ve ark., 2008; Kwiatek ve ark., 2010). Son yıllarda, PZR ürünleri ve denatürasyonlarının incelenmesinde floresan sistemlerin geliştirilmesi ile birlikte hassas ve spesifik sonuçların elde edildiği farklı tespit metotları geliştirilmiştir (Hanson ve Ballantyne, 2013; Iacumin ve ark., 2015; Villinger ve ark., 2017). HRM

analizleri PZR ürünleri denatürasyonunun incelenmesi prensibini temel alan yüksek kapasiteli, güvenilir ve hızlı bir metottur (Corbett Life Science, 2006; Ghorashi ve ark., 2011; Varillas ve ark., 2011; Daniels ve ark., 2015; Draht ve ark., 2016; Sun ve ark., 2016). Kolay uygulanabilen HRM analizleri, enfeksiyon etkenlerinin hassas ve etkin tespitine ve bu sayede salgın hastalıkların kontrol edilmesine olanak sağlamaktadır (Hewson ve ark., 2009; Ghorashi ve ark., 2011; Akiyoshi ve ark., 2013; Lin ve ark., 2014).

PPRV'nin hızlı ve etkin laboratuvar teşhisinin; salgınların kontrolü, aşılama ve karantina gibi tedbirlerin ivedilikle uygulanması ve neden olacağı ekonomik kayıpların önüne geçilmesi açısından önemli olduğu bildirilmiştir (OIE, 2004; Diallo, 2006; Kumar ve ark., 2014-1; Parida ve ark., 2015). Çalışmamızda geliştirilen gerçek zamanlı RT-PZR ile kombine HRM metodu sayesinde, PPRV'nin doğal enfektif saha suşlarının tespiti ve aynı zamanda aşı ve saha suşlarının moleküler ayrımının (genetik hat farklılıklarının tespiti) yapılması amaçlanmış, hastalığın kontrol ve eradikasyonuna katkı sağlanması hedeflenmiştir. Ayrıca kısmi dizin analizi, soyağacı ve network analizlerinde PPRV (F gen) ile ilgili güncel veriler elde edilmiştir.

Konya ve çevresinden (Aksaray, Antalya, Burdur, Niğde, Isparta) PPR şüphesiyle Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne gelen ve gerçek zamanlı RT-PZR ile PPRV pozitif olarak değerlendirilen 45 adet (32 koyun ve 13 keçi) küçük ruminanta ait kan ve doku örneklerinde, birçok araştırmacı tarafından önerilen (Gibbs ve ark., 1979; Özkul ve ark., 2002) Vero daimi hücre hattı kullanılarak hücre kültürü izolasyon çalışması yapılmıştır. Virusun hücre adaptasyonu düşük olduğundan (OIE, 2012) 3 adet örnekten virus izole edilmiştir.

CPE görülen örneklerin gerçek zamanlı RT-PZR analizlerinde; PPRV N gen (Batten ve ark., 2011) ve F gen (bu çalışmada uygulandı) spesifik RNA, stok inokulumları ile uyumlu olarak pozitif bulundu. Diğer kör pasajlarda CPE saptanmadı ve inkübasyonu takiben yapılan gerçek zamanlı RT-PZR'de pozitif sonuç tespit edilmedi. Bu çalışmada tespit edilen bulgular Albayrak ve Alkan (2009) ve Tarakcı (2014) (Slam reseptörü işaretli Vero)'nın çalışmalarında elde ettikleri bulgular ile uyumlu bulundu.

Konvansiyonel ya da gerçek zamanlı RT-PZR'de yapılacak araştırmanın niteliği ve hedeflenen gen bölgesi dikkate alındığında, primer tasarımının önemli olduğu görülmektedir (Forsyth ve Barrett 1995; Kwiatek ve ark., 2010; Batten ve ark., 2011). HRM ile kombine RT-PZR'de kullanılan primer çifti, PPRV genetik hat tespitinde daha

önce yapılan bir çok çalışmada olduğu gibi F geni dikkate alınarak tasarlandı (Çizelge 3.3.) (Forsyth ve Barrett, 1995; Couacy-Hymann ve ark., 2002; Özkul ve ark., 2002; Güler ve ark., 2014). Primerlerin en uygun bağlanma sıcaklığının 0.4 pmol/µl primer konsantrasyonunda 55 °C olduğu tespit edildi (Şekil 4.4.).

Saha örneklerinin PPRV spesifik moleküler tanımlamasında, gerçek zamanlı (Batten ve ark., 2011) ve konvansiyonel (Forsyth ve Barrett, 1995) RT-PZR'de tamamen uyumlu sonuçlar elde edildi ve tüm örnekler PPRV pozitif tespit edildi (Şekil 4.2. ve 4.3.). HRM ile kombine uygulanan gerçek zamanlı RT-PZR analizlerinde de benzer şekilde tüm örnekler pozitif bulundu (Şekil 4.5.).

Gerçek zamanlı RT-PZR'nin hemen ardından aynı reaksiyon tüpü içerisinde HRM analizleri gerçekleştirildi. Rotor-Gene Q series software version 2.3.1 (Build 49) modülü kullanılarak HRM normalizasyon (Normalised Graph), genotiplendirme (Genotypes Analysis) ve Tm derecelerinin referans alındığı erime eğrisi (Melt Curve Analysis) analizleri yapıldı. Analiz verilerine göre aşı suşu ve saha suşlarında net bir ayırım gözlemlendi ve çalışılan suşların tamamının doğal enfektif saha suşu (genetik hat IV) olduğu tespit edildi (Şekil 4.10., 4.11. ve 4.12.). HRM tespitleri ile RFLP RT-PZR (Güler ve ark., 2014) karşılaştırılmış ve her iki metodun da sonuçları yönüyle uyumlu olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.13.).

Viral hastalık etkenlerinin dizin ve filogenetik analizleri, etkenin genetik yapısıyla ilgili detaylı bilgiye ulaşılması, virus hareketlerinin takip edilmesi ve salgınlarda etken kaynağını göstermesi açısından önemli moleküler metotlardır. Bu metotlar kullanılarak PPRV'nin teşhisi ve moleküler epidemiyolojisine yönelik birçok çalışma yapılmıştır (Luka ve ark., 2011; Munir ve ark., 2012a; Muniraju ve ark., 2013; Libeau ve ark., 2014).

Bu çalışmada yapılan dizin analizinde, Forsyth ve Barrett'in (1995) bildirdiği 448 bç'lik bölge (PPRV F gen) hedeflendi. Dizin analiz sonucuna göre, aşı suşu ve saha suşlarının nükleotid değişimlerine ilişkin yapılan analizlerinde aşı ve saha suşları arasında %93.3-94.5 oranında, saha suşlarının kendi aralarında %99.2-100 oranında benzer oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.14.). Bu durum PPR virus popülasyonu F gen nükleotid yapısının yüksek oranda homolog olduğunu göstermektedir.

PPRV'nin filogenetik analizleri ile tespit edilen dört genetik hattı mevcuttur (Özkul ve ark., 2002; Balamurugan ve ark., 2010b; Munir ve ark., 2012a; Kumar ve ark., 2014-1). Temsili olarak seçilen 6 adet saha suşu ve genetik hatları gösteren referans dizinlerin Neighbor-joining metodu kullanılarak oluşturulan soyağacında, saha

suşlarının IV. genetik hat içinde yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.16.). Türkiye'nin farklı bölgelerinden bildirilen PPRV suşları ile oluşturulan soyağacında ise bölgesel bir ayırım olmadığı ve suşların aynı genetik kümede yer aldıkları belirlenmiştir (Şekil 4.17.). Türkiye'de izole edilen PPRV suşları ile yapılan birçok çalışmada, ülkemizde sirküle olan PPRV'nin IV. genetik hatta yer aldığı rapor edilmektedir (Özkul ve ark., 2002; Dağalp ve Sait, 2013; Tarakcı, 2014). Network analizinden elde edilen veriler, diğer ülkelerden bildirilen PPRV suşları referans alınarak oluşturulan soyağacı ile uyumlu olarak çalışma suşlarının IV. genetik hatta yer aldığını göstermektedir. Ayrıca bu suşların ülkemizde sirküle olan diğer suşlar gibi Egypt_2009, Iraq_2000a, Iraq_2002 ve A37/10 02 suşları ile yakın ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.18.). Buna göre, daha önce yapılan filogenetik çalışmalar ve bu çalışmada ortaya koyulan bulgularla benzer sonuçlar elde edildiği görülmektedir (Abubakar ve ark., 2011; Munir ve ark., 2012a; Munir ve ark., 2012b; Dağalp ve Sait, 2013; Kumar ve ark., 2014-1; Tarakcı, 2014).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda tasarlanan primerler ile yapılan gerçek zamanlı RT-PZR ve HRM analiz bulgularının, karşılaştırma yapılan diğer metotların sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Buna göre, saha suşlarının tamamı PPRV IV. genetik hatta yer almaktadır.

HRM analizinin kapalı bir sistem olarak PZR ile aynı reaksiyon ortamında uygulanması ve PZR ürünlerinin pürifiye edilmeden analiz sonucunun kısa sürede elde edilmesi, etken tespiti açısından önemli bir avantajdır. PPRV'nin aşısı ve saha suşlarında böyle bir metotla ayırım yapılması rutin teşhiste aşuya bağlı olarak oluşabilecek yanlış değerlendirmelerin önüne geçecektir.

Konya ve çevresinde Koyun ve Keçi Vebası Hastalığının varlığı devam etmektedir. Hastalığa karşı koruyucu tedbirler (hayvan barınak ve pazar yerleri, hayvan sevkleri vb. gibi) ile aşılama çalışmalarına titizlikle devam edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada optimize edilen ve gerçek zamanlı RT-PZR ile kombine uygulanan HRM analizi; klinik örneklerde PPRV F gene spesifik nükleik asit tespitinin yanında, aşısı ve saha suşlarını ayırmada etkili ve hassas bir yöntem olarak laboratuvar rutinine adapte edilebilir. Bu sayede hastalığın kontrol ve eradikasyonuna katkı sağacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abraham, M. G., 2005, Epidemiology of peste des petits ruminants virus in Ethiopia and molecular studies on virulence, Doctoral dissertation, *Institut National Polytechnique*, Toulouse, 1-176.
- Abubakar, M., Ashiq, S., Zahoor, A. B., Arshed, M. J. and Banyard, A. C., 2011, Diagnosis and control strategies for peste des petits ruminants virus global and Pakistan perspectives, *Pakistan Veterinary Journal*, 31 (4), 267-274.
- Abubakar, M., Arshed, M. J., Zahur, A. B., Ali, Q. and Banyard, A. C., 2012, Natural infection with peste des petits ruminants virus a pre and post vaccinal assessment following an outbreak scenario, *Virus Research*, 167 (1), 43-47.
- Ahmad, K., Jamal, S. M., Ali, Q. and Hussain, M., 2005, An outbreak of peste des petits ruminants (PPR) in a goat flock in Okara, Pakistan, *Pakistan Veterinary Journal*, 25 (3), 146-148.
- Akiyoshi, K., Yamada, Y., Honma, Y., Iwasa, S., Kato, K., Hamaguchi, T. and Furuta, K., 2013, KRAS mutations in patients with colorectal cancer as detected by high-resolution melting analysis and direct sequencing, *Anticancer Research*, 33(5), 2129-2134.
- Albayrak, H. and Alkan, F., 2009, PPR virus infection on sheep in blacksea region of Turkey epidemiology and diagnosis by RT-PCR and virus isolation, *Veterinary Research Communications*, 33 (3), 241-249.
- Albayrak, H. and Gür, S., 2010, A serologic investigation for Peste des petits ruminants infection in sheep, cattle and camels (*Camelus dromedarius*) in Aydın province, West Anatolia, *Tropical Animal Health and Production*, 42 (2), 151-153.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P., 2002, The structure and function of DNA, *Molecular Biology of the Cell* (4) Garland Science, USA.
- Alçığır, G., Vural, S. A., ve Toplu, N., 1996, Türkiye’de kuzularda peste des petits ruminants virus enfeksiyonunun patomorfolojik ve immunohistolojik ilk tanımı, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 43, 181-189.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402.
- Bailey, D., Banyard, A., Dash, P., Ozkul, A. and Barrett, T., 2005, Full genome sequence of peste des petits ruminants virus, a member of the Morbillivirus genus, *Virus Research*, 110 (1), 119-124.
- Balamurugan, V., Sen, A., Saravanan, P., Rasool, T. J., Yadav, M. P., Bandyopadhyay, S. K. and Singh, R. K., 2006, Development and characterization of a stable vero cell line constitutively expressing peste des petits ruminants virus (PPRV)

hemagglutinin protein and its potential use as antigen in enzyme-linked immunosorbent assay for serosurveillance of PPRV, *Clinical and Vaccine Immunology*, 13 (12), 1367-1372.

Balamurugan, V., Sen, A., Venkatesan, G., Yadav, V., Bhanot, V., Bhanuprakash, V. and Singh, R. K., 2010a, Application of Semi-quantitative M Gene-Based Hydrolysis Probe (TaqMan) Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Peste des petits ruminants Virus in the Clinical Samples for Investigation into Clinical Prevalence of Disease, *Transboundary and Emerging Diseases*, 57(6), 383-395.

Balamurugan, V., Sen, A., Venkatesan, G., Yadav, V., Bhanot, V., Riyesh, T., Bhanuprakash V. and Singh, R. K., 2010b, Sequence and phylogenetic analyses of the structural genes of virulent isolates and vaccine strains of peste des petits ruminants virus from India, *Transboundary and Emerging Diseases*, 57 (5), 352-364.

Balamurugan, V., Sen, A., Venkatesan, G., Yadav, V., Bhanot, V., Bhanuprakash, V. and Singh, R. K., 2012, A rapid and sensitive one step-SYBR green based semi quantitative real-time RT-PCR for the detection of peste des petits ruminants virus in the clinical samples, *Virologica Sinica*, 27 (1), 1-9.

Bandelt, H. J., Forster, P. and Röhl, A., 1999, Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies, *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48.

Bankamp, B., Horikami, S.M., Thompson, P.D., Huber, M., Billeter, M. and Moyer, S.A., 1996, Domains of the measles virus N protein required for binding to P protein and self-assembly, *Virology*, 216 (1), 272-277.

Banyard, A. C., Parida, S., Batten, C., Oura, C., Kwiatek, O. and Libeau, G., 2010, Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control, *Journal of General Virology*, 91(12), 2885-2897.

Bao, J., Li, L., Wang, Z., Barrett, T., Suo, L., Zhao, W., Liu, Y., Liu, C. and Li, J., 2008, Development of one-step real-time RT-PCR assay for detection and quantitation of peste des petits ruminants virus, *Journal of Virological Methods*, 148 (1), 232-236.

Barker, R., 1971, The polynucleotides and nucleic acids, *Organic Chemistry of Biological Compounds (Foundations of Modern Biochemistry Series)*, Prentice-Hall, New Jersey, Englewood Cliffs, 309-339.

Barrett, T., 1999, Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores, *Veterinary Microbiology*, 69 (1), 3-13.

Barrett, T., Banyard, A. C. and Diallo, A., 2006, Molecular biology of the morbilliviruses, In: Barrett, T., Pastouret, P. P., Taylor, W.P. (Eds.) Rinderpest and Peste des Petits Ruminants – Virus Plagues of Large and Small Ruminants, *Elsevier*, Oxford pp. 13-26).

- Batten, C. A., Banyard, A. C., King, D. P., Henstock, M. R., Edwards, L., Sanders, A., Buczkowski, H., Oura, C. A. L. and Barrett, T., 2011, A real-time RT-PCR assay for the specific detection of Peste des petits ruminants virus, *Journal of Virological Methods*, 171 (2), 401-404.
- Becker, C. E., Kretzmann, N. A., Mattos, A. A. D. and Veiga, A. B. G. D., 2013, Melting curve analysis for the screening of hepatitis B virus genotypes A, D and F in patients from a general hospital in southern Brazil, *Arquivos de Gastroenterologia*, 50(3), 219-225.
- Benazet, B. G. H., 1973, La peste des petits ruminants etude experimentale de la vaccination, Cf Taylor WP (1984).
- Benjamin L., 1997, Genes (Bölün :5) Nucleic acid structure, *Oxford University Press*, New York, 97-113.
- Bester, R., Jooste, A. E., Maree, H. J. and Burger, J. T., 2012, Real-time RT-PCR high-resolution melting curve analysis and multiplex RT-PCR to detect and differentiate grapevine leafroll-associated virus 3 variant groups I, II, III and VI, *Virology Journal*, 9(1), 219.
- Bossart, K. N., Fusco, D. L. and Broder, C. C., 2013, Paramyxovirus entry inviral entry into host cells, *Springer*, New York, 95-127.
- Braide, V. B., 1981, PPR—a review, *World Animal Review*, 39, 25-28.
- Breslauer K. J., Frank R., Blocker H. and Marky L.A., 1986, Predicting DNA duplex stability from the base sequence, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83 (11), 3746-3750.
- Bundza, A., Afshar, A., Dukes, T. W., Myers, D. J., Dulac, G. C. and Becker, S. A., 1988, Experimental peste des petits ruminants (goat plague) in goats and sheep, *Canadian Journal of Veterinary Research*, 52(1), 46-52.
- Bustin, S. A., 2000, Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), 169-193.
- Bustin, S. A., 2002, Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems, *Journal of Molecular Endocrinology*, 29(1), 23-39.
- Cam, Y., Gencay, A., Beyaz, L., Atalay, O., Atasever, A., Ozkul, A. and Kibar, M., 2005, Peste des petits ruminants in a sheep and goat flock in Kayseri province, Turkey, *Veterinary Record*, 157 (17), 523-524.
- Chard, L. S., Bailey, D. S., Dash, P., Banyard, A. C., and Barrett, T., 2008, Full genome sequences of two virulent strains of peste-des-petits ruminants virus, the Côte d'Ivoire 1989 and Nigeria 1976 strains, *Virus Research*, 136(1-2), 192-197.

- Cheng, J. C., Huang, C. L., Lin, C. C., Chen, C. C., Chang, Y. C., Chang, S. S. and Tseng, C. P., 2006, Rapid detection and identification of clinically important bacteria by high-resolution melting analysis after broad-range ribosomal RNA real-time PCR, *Clinical Chemistry*, 52(11), 1997-2004.
- Corbett Life Science, 2006, High Resolution Melt Assay Design and Analysis (CorProtocol™ 6000-1-Sept06), Avustralya.
- Cosa, G., Focsaneanu, K.-S., McLean, J. R. N., McNamee, J. P. and Scaiano, J. C., 2001, Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution. *Photochemistry and Photobiology*, 73 (6), 585–599.
- Couacy-Hymann, E., Roger, F., Hurard, C., Guillou, J. P., Libeau, G. and Diallo, A., 2002, Rapid and sensitive detection of peste des petits ruminants virus by a polymerase chain reaction assay, *Journal of Virological Methods*, 100 (1), 17-25.
- Couacy-Hymann, E., Bodjo, C., Danho, T., Libeau, G. And Diallo, A., 2005, Surveillance of wildlife as a tool for monitoring rinderpest and peste des petits ruminants in West Africa, *Revue Scientifique et Technique-OIE*, 24 (3), 869-877.
- Couacy-Hymann E., Bodjo C., Danho T., Libeau G. and Diallo A, 2007, Evaluation of the virulence of some strains of peste-des-petits-ruminants virus (PPRV) in experimentally infected West African dwarf goats, *Vetirinary Journal January*, 173(1), 178-83.
- Daniels, R., Hamilton, E. J., Durfee, K., Ndiaye, D., Wirth, D. F., Hartl, D. L. and Volkman, S. K., 2015, Methods to Increase the Sensitivity of High Resolution Melting Single Nucleotide Polymorphism Genotyping in Malaria, *Journal of Visualized Experiments*, 105.
- Dağalp, S.B. ve Sait A., 2013, PPRV enfeksiyonunun epidemiyolojisinin N ve F genlerine dayalı farklı PCR teknikleri ile araştırılması, *Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu*, 28-38.
- Dhar, P., Sreenivasa, B. P., Barrett, T., Corteyn, M., Singh, R. P. and Bandyopadhyay, S. K., 2002, Recent epidemiology of peste des petits ruminants virus (PPRV), *Veterinary Microbiology*, 88 (2), 153-159.
- Diallo, A., Barrett, T., Lefevre, P. C. and Taylor, W. P., 1987, Comparison of proteins induced in cells infected with rinderpest and peste des petits ruminants viruses, *Journal of General Virology*, 68 (7), 2033-2038.
- Diallo, A., Taylor, W. P., Lefèvre, P. C. and Provost, A., 1989, Attenuation d'une souche de virus de la peste des petits ruminants candidat pour un vaccin homologué vivant, *Revue D'élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 42(3), 311-319.
- Diallo, A., 1990, Morbillivirus group: genome organisation and proteins, *Veterinary Microbiology*, 23 (1-4), 155-163.

- Diallo, A., 2006, Control of peste des petits ruminants and poverty alleviation, *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 53 (1), 11-13.
- Diallo, A., Minet, C., Le Goff, C., Berhe, G., Albina, E., Libeau, G. and Barrett, T., 2007, The threat of peste des petits ruminants: progress in vaccine development for disease control, *Vaccine*, 25 (30), 5591-5597.
- Dinçer, E., ve Özkul, A., 2015, Development of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (rt RT-PCR) targeting four genes of peste des petits ruminants virus, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 62(4), 283-287.
- Draht, M. X., Smits, K. M., Jooste, V., Tournier, B., Vervoort, M., Ramaekers, C. And Melotte, V., 2016, Analysis of RET promoter CpG island methylation using methylation-specific PCR (MSP), pyrosequencing, and methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM): impact on stage II colon cancer patient outcome, *Clinical Epigenetics*, 8(1), 1.
- Edgar, R. C., 2004, MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.
- EU267273, 2008, Peste-des-petits-ruminants virus strain ICV89, complete genome [online], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU267273>, [Ziyaret Tarihi: 25 Şubat 2016].
- FAO, 1999, Recognizing peste des petits ruminants a field manual [online], <http://www.fao.org/docrep/003/x1703e/x1703e00.HTM>, [Ziyaret Tarihi: 5 Mart 2016].
- FAO, 2009, Peste des petits ruminants (PPR), a challenge for small ruminant production [online], http://www.fao.org/Ag/againfo/resources/documents/AH/PPR_flyer.pdf, [Ziyaret Tarihi: 15 Mart 2016].
- Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., 2007, Fields virology, 5th, *Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia, 1449-1496.
- Forsyth, M. A. and Barrett, T., 1995, Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies, *Virus Research*, 39 (2), 151-163.
- Foster, P., Torroni, A., Renfrew, C. and Röhl, A., 2001, Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution, *Molecular Biology and Evolution*, 18(10), 1864-1881.
- Gargadenne, L. and Lalanne, A., 1942, La peste des petits ruminants, *Bulletin des Services Zoo Technique et des Epizootie de l'Afrique Occidentale Française*, 5, 15-21.
- Genelge, 2010, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü Genelgesi (2010/02), Ankara.

- Ghorashi, S. A., Noormohammadi, A. H. and Markham, P. F., 2010, Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using PCR and high-resolution melting curve analysis, *Microbiology*, *156*(4), 1019-1029.
- Ghorashi, S. A., O'Rourke, D., Ignjatovic, J. and Noormohammadi, A. H., 2011, Differentiation of infectious bursal disease virus strains using real-time RT-PCR and high resolution melt curve analysis, *Journal of Virological Methods*, *171*(1), 264-271.
- Gibbs, E. P., Taylor, W. P., Lawman, M. J. P. and Bryant, J., 1979, Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus Morbillivirus, *Intervirology*, *11* (5), 268-274.
- Gilbert, Y. and Monnier, J., 1962, Adaptation du virus de la peste des petits ruminants aux cultures cellulaires, *Revue D'élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, *15* (4), 321-335.
- Gundry, C.N., Bernard, P.S., Herrmann, M.G., Reed, G.H. and Wittwer, C.T., 1999, Rapid F508del and F508C assay using fluorescent hybridization probes, *Genetic Testing*, *3*, 365-370.
- Gül, Y., Kızıllı, Ö., İssi, M., 2006, Bir kuzuda saptanan subklinik küçük ruminant vebası (peste des petits ruminants, PPR) olgusu, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, *20* (3), 245-247.
- Güler, L., Şevik, M. and Hasöksüz, M., 2014, Phylogenetic analysis of peste des petits ruminants virus from outbreaks in Turkey during 2008-2012, *Turkish Journal of Biology*, *38* (5), 671-678.
- Hall, T. A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, 1999, *Nucleic Acids Symposium Series Vol. 41*, pp. 95-98.
- Hanson, E. K. and Ballantyne, J., 2013, Rapid and inexpensive body fluid identification by RNA profiling-based multiplex High Resolution Melt (HRM) analysis, *F1000 Research*, *2*.
- Herrmann, M.G., Durtschi, J.D., Bromley, L.K., Wittwer, C.T. and Voelkerding, K.V., 2006, Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes, *Clinical Chemistry*, *52*, 494-503.
- Hewson, K., Noormohammadi, A. H., Devlin, J. M., Mardani, K. and Ignjatovic, J., 2009, Rapid detection and non-subjective characterisation of infectious bronchitis virus isolates using high-resolution melt curve analysis and a mathematical model, *Archives of Virology*, *154*(4), 649.
- Iacumin, L., Ginaldi, F., Manzano, M., Anastasi, V., Reale, A., Zotta, T. and Comi, G., 2015, High resolution melting analysis (HRM) as a new tool for the identification

- of species belonging to the *Lactobacillus casei* group and comparison with species-specific PCRs and multiplex PCR, *Food Microbiology*, 46, 357-367.
- Jackwood, D. J., 2004, Recent trends in the molecular diagnosis of infectious bursal disease viruses, *Animal Health Research Reviews*, 5(02), 313-316.
- Kerur, N., Jhala, M. K. and Joshi, C. G., 2008, Genetic characterization of Indian peste des petits ruminants virus (PPRV) by sequencing and phylogenetic analysis of fusion protein and nucleoprotein gene segments, *Research in Veterinary Science*, 85 (1), 176-183.
- Krypuy, M., Newnham, G. M., Thomas, D. M., Conron, M. and Dobrovic, A., 2006, High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer, *BMC Cancer*, 6(1), 295.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J. and Lind, K., 2006, The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95-125.
- Kul, O., Kabakci, N., Atmaca, H. T. and Özkul, A., 2007, Natural peste des petits ruminants virus infection: novel pathologic findings resembling other morbillivirus infections, *Veterinary Pathology Online*, 44 (4), 479 - 486.
- Kumar, K.S., Babu, A., Sundarapandian, G., Roy, P., Thangavelu, A., Kumar, K.Siva., Arumugam, R., Chandran, N.D.J., Muniraju, M., Mahapatra, M., Banyard, A.C., Manohar, B.M. and Parida, S., 2014(1), Molecular characterisation of lineage IV peste des petits ruminants virus using multi gene sequence data, *Veterinary Microbiology*, 174 (1), 39-49.
- Kumar, N., Maherchandani, S., Kashyap, S. K., Singh, S. V., Sharma, S., Chaubey, K. K. and Ly, H., 2014(2), Peste des petits ruminants virus infection of small ruminants: a comprehensive review, *Viruses*, 6(6), 2296.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K., 2016, MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kwiatek, O., Minet, C., Grillet, C., Hurard, C., Carlsson, E., Karimov, B., Albina E., Diallo A., and Libeau, G., 2007, Peste des petits ruminants (PPR) outbreak in Tajikistan, *Journal of Comparative Pathology*, 136 (2), 111-119.
- Kwiatek, O., Keita, D., Gil, P., Fernández-Pinero, J., Clavero, M. A. J., Albina, E. and Libeau, G., 2010, Quantitative one-step real-time RT-PCR for the fast detection of the four genotypes of PPRV, *Journal of Virological Methods*, 165 (2), 168-177.
- Kwiatek, O., Ali, Y. H., Saeed, I. K., Khalafalla, A. I., Mohamed, O. I., Obeida, A. A. and El Harrak, M., 2011, Asian lineage of peste des petits ruminants virus, Africa, *Emerging Infectious Diseases*, 17(7), 1223.

- Laine, D., Trescol-Biémont, M. C., Longhi, S., Libeau, G., Marie, J. C., Vidalain, P. O. and Valentin, H., 2003, Measles virus (MV) nucleoprotein binds to a novel cell surface receptor distinct from FcγRII via its C-terminal domain role in MV-induced immunosuppression, *Journal of Virology*, 77 (21), 11332-11346.
- Lamb, R.A., and Kolakofsky, D., 2001, Paramyxoviridae the viruses and their replication, Fields Virology, 4th, Knipe, D.M., Howley, P.M., *Lippincott Williams and Wilkins*, Philadelphia, 1305–1340.
- Libeau, G., Diallo, A. and Parida, S., 2014, Evolutionary genetics underlying the spread of peste des petits ruminants virus, *Animal Frontiers*, 4 (1), 14-20.
- Lin, J. H., Tseng, C. P., Chen, Y. J., Lin, C. Y., Chang, S. S., Wu, H. S. and Cheng, J. C., 2008, Rapid differentiation of influenza A virus subtypes and genetic screening for virus variants by high-resolution melting analysis, *Journal of Clinical Microbiology*, 46(3), 1090-1097.
- Lin, C. Y., Li, M. J., Chang, J. G., Liu, S. C., Weng, T., Wu, K. H. and Peng, C. T., 2014, High-resolution melting analyses for genetic variants in ARID5B and IKZF1 with childhood acute lymphoblastic leukemia susceptibility loci in Taiwan, *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 52(2), 140-145.
- Luka, P. D., Erume, J., Mwiine, F. N., Ayebazibwe, C. and Shamaki, D., 2011, Molecular characterization and phylogenetic study of peste des petits ruminants viruses from North central States of Nigeria, *BMC Veterinary Research*, 7 (1), 32.
- Maclachla, N.J. and Dubovi, E.J., 2011, Fenner's Veterinary Virology, 4th, *Elsevier Academic Press*, 299-325.
- Mc Ilhatton, M. A., Curran, M. D. and Rima, B. K., 1997, Nucleotide sequence analysis of the large (L) genes of phocine distemper virus and canine distemper virus (corrected sequence), *Journal of General Virology*, 78 (3), 571-576.
- Moll, M., Klenk, H. D. and Maisner, A., 2002, Importance of the cytoplasmic tails of the measles virus glycoproteins for fusogenic activity and the generation of recombinant measles viruses, *Journal of Virology*, 76 (14), 7174-7186.
- Monis, P.T., Giglio, S. and Saint, C.P., 2005, Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis, *Analytical Biochemistry*, 340 (1), 2434.
- Montgomery, J., Wittwer, J.T., Palais, R., and Zhou, R., 2007, Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis, *Nature Protocols*, 2 (1), 59-66.
- Montgomery, J. L., Sanford, L. N. and Wittwer, C. T., 2010, High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 10(2), 219-240.

- Munir, M., Zohari, S., Suluku, R., LeBlanc, N., Kanu, S., Sankoh, F. A., Berg, M., Barrie, M.L. and Stahl, K., 2012a, Genetic characterization of peste des petits ruminants virus, sierra leone, *Emerging Infectious Diseases* 18 (1), 193-195.
- Munir, M., Zohari, S. and Berg, M., 2012b, Molecular biology and pathogenesis of peste des petits ruminants virus, *Springer*, Berlin – Heidelberg, 49-68.
- Muniraju, M., El Harrak, M., Bao, J., Parthiban, A. B. R., Banyard, A. C., Batten, C. and Parida, S., 2013, Complete genome sequence of a peste des petits ruminants virus recovered from an alpine goat during an outbreak in Morocco in 2008, *Genome Announcements*, 1 (3), e00096-13.
- Murphy, F.A, Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Maetelli, G.P., Mayo, M.A. and Summers, M.D., 1995, Paramyxoviridae in virus taxonomy classification and nomenclature, *Springer Verlag*, Newyork, 268-274.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C. and Studdert, M.J., 1999, Veterinary virology, *Academic Press*, San Diego-Calif., 3, 411- 428.
- Nguyen-Dumont, T., Calvez-Kelm, F. L., Forey, N., McKay-Chopin, S., Garritano, S., Gioia-Patricola, L. and Tavgian, S. V., 2009, Description and validation of high-throughput simultaneous genotyping and mutation scanning by high-resolution melting curve analysis, *Human Mutation*, 30(6), 884-890.
- Nygren, J., Svanvik, N. and Kubista, M., 1998, The interaction between the fluorescent dye thiazole orange and DNA, *Biopolymers*, 46, 39-51.
- Office International des Epizooties (OIE), 1999, *OIE Disease Information*, 12,137.
- OIE, 2004, Peste des petits ruminants manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals - part 2 - section 2.1 - chapter 2.1.5. [online], Paris-France, http://web.oie.int/fr/normes/mmanual/A_00028.htm, [Ziyaret Tarihi: 2 Şubat 2016].
- OIE, 2009, Peste des petits ruminants [online], Paris-France, http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/animal_health_in_the_world/docs/pdf/peste_des_petits_ruminants_final.pdf, [Ziyaret Tarihi: 2 Şubat 2016].
- OIE, 2012, Diagnosis of rinderpest virus and peste des petits ruminant virus OIE terres manuel may 2012 chapter 2.7.11 [online], Paris-France, <http://www.oie.int/doc/ged/D12009.PDF>, [Ziyaret Tarihi: 14 Şubat 2016].
- OIE, 2013, peste des petits ruminants [online], Paris-France, http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.07.11_PPR.pdf, [Ziyaret Tarihi: 14 Şubat 2016].
- OIE, 2015, peste des petits ruminants [online], Paris-France, <http://www.oie.int/doc/ged/D13983.PDF>, [Ziyaret Tarihi: 16 Şubat 2016].

- Özkul, A., Akca, Y., Alkan, F., Barrett, T., Karaoglu, T., Dagalp, S. B., Anderson, J., Yesilbag, K., Çokçalıskan, C., Gencay, A. and Burgu, I., 2002, Prevalence, distribution and host range of peste des petits ruminants virus Turkey, *Emerging Infectious Diseases*, 8 (7), 708-712.
- Payment P. and Trudel M., 1993, *Methods and Techniques in Virology*, pp. 336.
- Parida, S., Muniraju, M., Mahaptara, M., Muthuchelvan, D., Buczhowski, H. and Banyard, A.C., 2015, Peste des petits ruminants, *Veterinary Microbiology*, 181, 90-106.
- Polci, A., Cosseddu, G. M., Ancora, M., Pinoni, C., El Harrak, M., Sebhatu, T. T. and Monaco, F., 2015, Development and preliminary evaluation of a new real-time RT-PCR assay for detection of peste des petits ruminants virus genome, *Transboundary and Emerging Diseases*, 62 (3), 332-338.
- Polinski, M., Hamilton, D. B., Nowak, B. and Bridle, A., 2013, SYBR, TaqMan, or both: Highly sensitive, non-invasive detection of *Cardicola* blood fluke species in Southern Bluefin Tuna (*Thunnus maccoyii*), *Molecular and Biochemical Parasitology*, 191(1), 7-15.
- Price, E. P., Smith, H., Huygens, F. and Giffard, P. M., 2007, High-resolution DNA melt curve analysis of the clustered, regularly interspaced short-palindromic-repeat locus of *Campylobacter jejuni*, *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3431-3436.
- Rajak, KK., Sreenivasa, BP., Hosamani, M., Singh, RP., Singh, SK., Singh, RK. and Bandyopadhyay, SK., 2005, Experimental studies on immunosuppressive effects of peste des petits ruminants (PPR) virus in goats, *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 28, 287-296.
- Reed, G. H., Kent, J. O. and Wittwer, C. T., 2007, High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics, *Pharmacogenomics*, 8(6), 597-608.
- Resmi gazete, 1997, Tarım ve Köyişleri Bakanlığının 1997/10 no'lu tebliği [online], Ankara, <http://www.resmigazete.gov.tr/main.aspx?home=http://www.resmigazete.gov.tr/arsiv/23147.pdf&main=http://www.resmigazete.gov.tr/arsiv/23147.pdf>, [Ziyaret Tarihi: 28 Aralık 2015].
- Resmi gazete, 2012, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının yönetmeliği [online], Ankara, <http://www.resmigazete.gov.tr/main.aspx?home=http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2012/01/20120104.htm&main=http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2012/01/20120104.htm>, [Ziyaret Tarihi: 20 Ocak 2016].
- Rima, B.K., 1983, The proteins of morbilliviruses, *Journal of General Virology*, 64 (6), 1205-1219.

- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P. and Wittwer, C.T., 1997, Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction, *Analytical Biochemistry*, 245, 154-160.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E. and Sanchez-Gracia, A., 2017, DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets, *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299-3302.
- Santa Lucia, J. Jr. and Hicks, D., 2004, The thermodynamics of DNA structural motifs, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33, 415-440.
- Santhosh, A. K., Gomes, A. R., Hegde, R., Rathnamma, D., Veeregowda, B. M., Byregowda, S. M. and Isloor, S., 2013, Comparative immunogenicity of two peste des petits ruminants (PPR) vaccines in South Indian sheep and goats under field conditions, *Indian Journal of Virology*, 24(3), 373-379.
- Sen, A., Saravanan, P., Balamurugan, V., Rajak, K. K., Sudhakar, S.B., Bhanuprakash, V. and Singh, R. K., 2010, Vaccines against peste des petits ruminants virus, *Expert Review of Vaccines*, 9(7), 785-796.
- Seth, S. and Shaila, M.S., 2001, The hemagglutinin-neuraminidase protein of peste des petits ruminants virus is biologically active when transiently expressed in mammalian cells, *Virus Research*, 75 (2), 169-177.
- Simons, K. and Garoff, H., 1980, The budding mechanisms of enveloped animal viruses, *Journal of General Virology*, 50 (1), 1-21.
- Singh, R. P., Sreenivasa, B. P., Dhar, P., Shah, L. C. and Bandyopadhyay, S. K., 2004, Development of a monoclonal antibody based competitive-ELISA for detection and titration of antibodies to peste des petits ruminants (PPR) virus, *Veterinary Microbiology*, 98 (1), 3-15.
- Sun, W., Li, J. J., Xiong, C., Zhao, B. and Chen, S. L., 2016, The potential power of Bar-HRM technology in herbal medicine identification, *Frontiers in plant science*, 7, 367.
- Tajiri-Utagawa, E., Hara, M., Takahashi, K., Watanabe, M. and Wakita, T., 2009, Development of a rapid high-throughput method for high-resolution melting analysis for routine detection and genotyping of noroviruses, *Journal of Clinical Microbiology*, 47(2), 435-440.
- Taqman Probes [online], <http://www.e-oligos.com/eoweb/products/eo-taqman.asp>, [Ziyaret Tarihi: 12 Nisan 2016].
- Tarakcı, A. E., 2014, Koyunlarda ve sığırlarda küçük ruminant vebası virusunun virolojik, serolojik ve moleküler yönden araştırılması ve soyağacı oluşturulması, Doktora Tezi, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 83.

- Tatar, N., 1998, Koyun ve keçilerde küçük ruminantların vebası ve sığır vebası enfeksiyonlarının serolojik ve virolojik olarak araştırılması, *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*.
- Tatar, N. ve Alkan, F., 1999, Koyun ve keçilerde küçük ruminantların vebası (peste des petits ruminants) ve sığır vebası enfeksiyonlarının serolojik ve virolojik olarak araştırılması, *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 10, 35-60.
- Tatar, N., Ertürk, A., Kabaklı, Ö., Akkoca, N., İnçoğlu, Ş., Ülker, U. ve Dakman, A., 2002, Türkiye’de küçük ruminantların vebasının (peste des petits ruminants) serolojik olarak prevalansının belirlenmesi, *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 13, 15-31.
- Taylor, W. P., 1979, Protection of goats against peste-des-petits-ruminants with attenuated rinderpest virus, *Research in Veterinary Science*, 27 (3), 321-324.
- Taylor, WP., Barrett, T., Pastoret, P-P., 2005, Rinderpest and peste des petits ruminants, virus plagues of large and small ruminants, *Academic Press, Elsevier*, Amsterdam, 13–67.
- Temizkan, G. ve Arda, N., 2008, Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler, *Nobel Tıp Kitabevleri*, 62.
- Thomsen, N., Ali, R. G., Ahmed, J. N. and Arkell, R. M., 2012, High resolution melt analysis (HRMA); a viable alternative to agarose gel electrophoresis for mouse genotyping, *PloS one*, 7(9), e45252.
- Toplu, N., 2004, Characteristic and non-characteristic pathological findings in peste des petits ruminants (PPR) of sheep in the Ege district of Turkey, *Journal of comparative Pathology*, 131 (2), 135-141.
- Tsai, Y. L., Wang, H. T. T., Chang, H. F. G., Tsai, C. F., Lin, C. K., Teng, P. H. and Lee, P. Y., 2012, Development of TaqMan probe-based insulated isothermal PCR (iiPCR) for sensitive and specific on-site pathogen detection, *PloS one*, 7(9), e45278.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. and Rosen S. G., 2012, Primer3-new capabilities and interfaces, *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115.
- van der Stoep, N., van Paridon, C. D., Janssens, T., Krenkova, P., Stambergova, A., Macek, M. and Bakker, E., 2009, Diagnostic guidelines for high-resolution melting curve (HRM) analysis: An interlaboratory validation of BRCA1 mutation scanning using the 96-well LightScanner™, *Human Mutation*, 30(6), 899-909.
- Varillas, D., Bermejo-Martin, J. F., Almansa, R., Rojo, S., Nogueira, B., Eiros, J. M., and de Lejarazu, R. O., 2011, A new method for detection of pandemic influenza virus using High Resolution Melting analysis of the neuraminidase gene, *Journal of Virological Methods*, 171(1), 284-286.

- Villinger, J., Mbaya, M. K., Ouso, D., Kipanga, P. N., Lutomiah, J. and Masiga, D. K., 2017, Arbovirus and insect-specific virus discovery in Kenya by novel six genera multiplex high-resolution melting analysis, *Molecular Ecology Resources*, 17(3), 466-480.
- Vossen, R. H., Aten, E., Roos, A. ve den Dunnen, J. T., 2009, High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More than just sequence variant screening, *Human Mutation*, 30(6), 860-866.
- Wada, A., Yabuki, S. and Husimi, Y., 1980, Fine structure in the thermal denaturation of DNA: High temperature-resolution spectrophotometric studies, *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 9, 87-144.
- Wang, Z., Bao, J., Wu, X., Liu, Y., Li, L., Liu, C. and Yang, N., 2009, Peste des petits ruminants virus in Tibet, China, *Emerging Infectious Diseases*, 15(2), 299.
- White, H. and Potts, G., 2006, Mutation scanning by high resolution melt analysis, *Evaluation of Rotor Gene 6000*, 1-26.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Gundry, C.N. and Elenitoba-Johnson K.S.J., 2001, Real-time multiplex PCR assays, *Methods*, 25, 430-442.
- Wittwer, C.T., Reed, G.H., Gundry, C.N., Vandersteen, J.G. and Pryor, R.J., 2003, High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen, *Clinical Chemistry*, 49, 853-860.
- Wittwer C.T. and Kusukawa, N., 2004, Real-time PCR, *Diagnostic Molecular Microbiology*, 71-84.
- Wittwer C.T., Kusukawa, N., Burtis, C., Ashwood, D. and Bruns, D. E., 2005, Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, *Elsevier Health Sciences*, New York, 1407-1449.
- Worm J., Aggerholm A. and Guldberg, P., 2001, In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis, *Clinical Chemistry*, 47(7), 1183-1189.
- Xu, A., Lv, T., Zhang, B., Zhang, W., Ou, X., and Huang, J., 2016, Development and evaluation of an unlabeled probe high-resolution melting assay for detection of ATP7B mutations in Wilson's disease, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 31(4), DOI: 10.1002/jcla.22064.
- Yesilbag, K., Yilmaz, Z., Golcu, E. and Ozkul, A., 2005, Peste des petits ruminants outbreak in western Turkey, *Veterinary Record*, 157 (9), 260-261.
- Zahorakova, D., Lelkova, P., Gregor, V., Magner, M., Zeman, J., and Martasek, P., 2016, MECP2 mutations in Czech patients with Rett syndrome and Rett-like phenotypes: novel mutations, genotype–phenotype correlations and validation of high-resolution melting analysis for mutation scanning, *Journal of Human Genetics*, 61(7):617-625.

- Zakian, A., Nouri, M., Kahroba, H., Mohammadian, B. and Mokhber-Dezfouli, M. R., 2016, The first report of peste des petits ruminants (PPR) in camels (*Camelus dromedarius*), *Tropical Animal Health and Production*, 48(6), 1215-1219.
- Zhou, L., Errigo, R. J., Lu, H., Poritz, M. A., Seipp, M. T. and Wittwer, C. T., 2008, Snapback primer genotyping with saturating DNA dye and melting analysis, *Clinical Chemistry*, 54(10), 1648-1656.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mustafa Emin ÖZ
Uyruğu : T. C.
Doğum Yeri ve Tarihi : KONYA / 1983
Telefon : 0507 361 88 38
e-mail : oz.mustafaemin@gmail.com mustafaemin.oz@tarim.gov.tr

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Veteriner Sağlık Meslek Lisesi KONYA	2000
Üniversite	: Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi/ Biyoloji Bölümü, Konya	2007
Yüksek Lisans	: Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Ens./ Moleküler Biyoloji ve Genetik AD, Konya	--

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2004 – 2011	İlçe Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü Devrek / Zonguldak	Vet. Sağ.Tek
2012 - 2013	İlçe Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü Hadim / Konya	Biyolog
2014 – 2015	İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü/ Konya	Biyolog
2015 – Halen	Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü / Moleküler Mik.Lab.	Biyolog

YABANCI DİL

İngilizce: İntermediate

YAYINLAR

1- ÖZ, M.E. ve TORLAK, E., Doğal enfekte koyunlarda Peste des Petits Ruminants Virusunun tespitinde Nucleocapsid gen bazlı iki real-time RT-PCR metodunun karşılaştırılması (Poster), 2016, *5.Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, Konya.