



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**TÜRKİYE’DE ŞAP VİRUSLARININ
TANI VE TİPLENDİRİLMESİNDE
MULTİPLEKS RT-PCR TEKNİĞİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE
TANISAL DEĞERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Beyhan SAREYYÜPOĞLU

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim BURGU**

2009- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE’DE ŞAP VİRUSLARININ
TANI VE TİPLENDİRİLMESİNDE
MULTİPLEKS RT-PCR TEKNİĞİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE
TANISAL DEĞERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Beyhan SAREYYÜPOĞLU

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim BURGU**

2009- ANKARA

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Çizelgeler	viii
Şekiller	ix
1.GİRİŞ	
1.1. Genel Bilgiler	1
1.2. Etiyoloji	1
1.2.1. Şap Virusunun Tipleri	4
1.3. Epidemiyoloji	6
1.4. Patogenez ve Patoloji	8
1.5. Klinik Belirtiler	9
1.6. Şap Viruslarının Moleküler Epidemiyolojisi	10
1.7. Saha Suşlarının Teşhis ve Tiplendirilmesi	12
1.8. Kontrol ve Mücadele	14
1.9. Tezin Amacı	15
2. GEREÇ ve YÖNTEM	17
2.1 . Gereç	17
2.1.1. Hücre Kültürü	17
2.1.2. Tanı Materyalleri	17
2.1.3. Referans Viruslar	18
2.1.4. Primerler	19
2.1.5. Şap Virusu Tip (A, O, Asia-1) Spesifik Hiperimmün Serumlar	20
2.2. Yöntem	21
2.2.1. Indirekt Sandwich ELISA	21
2.2.2. Virus İzolasyonu	21
2.2.3. RT-PCR	22
2.2.3.1. RNA Ekstraksiyonu	22
2.2.3.2. Primer Tasarımı	23

2.2.3.3. Viral RNA'nın Reverz Transkripsiyonu (cDNA sentezi)	24
2.2.3.4. RT-PCR (Mono/Multipleks) Optimizasyonu	25
2.2.3.5. PCR Ürün Eldesi	26
2.2.3.6. Geliştirilen RT-PCR Tekniğinin Sensitivitesinin Belirlenmesi	27
2.2.3.7. Geliştirilen RT-PCR Tekniğinin Spesifitesinin Belirlenmesi	27
2.2.3.8. PCR Ürününün Görüntülenmesi	28
3. BULGULAR	29
3.1. Indirekt Sandwich ELISA	29
3.2. Virus İzolasyonu	30
3.3. RT-PCR	30
3.3.1. RNA Ekstraksiyonu	30
3.3.2. Primer Tasarımı	31
3.3.3. RT-PCR (Mono/Multipleks) Optimizasyonu	32
3.3.4. Monopleks RT-PCR Sonuçları	35
3.3.5. Multipleks RT-PCR Sonuçları	35
3.3.6. Analitik Sensitivite Sonuçları	36
3.3.6.1. RT-PCR Sensitivite Sonucu	36
3.3.6.2. ELISA Sensitivite Sonucu	38
3.3.7. Multipleks RT-PCR Spesifitesi	38
3.4. İstatistikî Analiz	38
4. TARTIŞMA	40
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
ÖZET	51
SUMMARY	52
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	66

ÖNSÖZ

Dünya Hayvan Sağlık Örgütü (WOAH) listesinde yer alan şap hastalığı, evcil ve vahşi ruminantların akut, çok bulaşıcı, verim kayıplarına neden olarak, hastalığın bulunduğu ülkelerde hayvansal ürün üretiminde ciddi ekonomik kayıplara yol açan viral bir hastalıktır. Yedi farklı antijenik tipi (A, O, C, Asia-1, SAT1, SAT2, SAT3) bulunmakta olup, dünya üzerinde en yaygın olan tipler A ve O tipleridir.

Türkiye’de şap hastalığı ile ilgili ilk bilgiler, 1914 yılında yayınlanan Tarım İstatistiklerinde yer almaktadır. Ülkemizde A ve O tipleri endemik olarak görülmektedir. Asia-1 tipi ise, 2002 yılından bu yana saptanmamıştır. Hastalığın kontrolü amacıyla ülkemizde karantina ve aşılama, Trakya bölgesinde ise ayrıca şarta bağlı kesim de uygulanmaktadır.

Bir RNA virusu olan şap virusu, yüksek mutasyon oranı, quasi-species populasyon yapısı ve hızlı replikasyon yeteneği, yeni ortamlara çabuk adapte olabilmesi gibi RNA viruslarının genel özelliklerini gösterir. Şap virusunun hızlı tiplendirilmesi, Türkiye gibi hastalığın epidemik olduğu ülkelerde kısa sürede salgın orijininin belirlenmesine ve dolayısıyla salgın yayılımının izlenmesi ve önlenmesinde; hastalığın görülmeyen ülkelerde ise hastalık çıkışı halinde salgın orijininin belirlenmesine ilave olarak özellikle acil aşılama gerektiren durumlarda önemli katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmanın her aşamasında yardım ve desteklerini gördüğüm danışman Hocam Prof. Dr. İbrahim BURGU’ya, daima pozitif yaklaşımı ve gösterdiği sabır ile yardımlarını ve desteklerini eksik etmeyen Prof. Dr. Feray ALKAN’a, yardımlarını eksik etmeyen Prof. Dr. Yılmaz AKÇA, Prof. Dr. Aykut ÖZKUL, Prof. Dr. Hakan Yardımcı ve Doç. Dr. Seval BİLGE DAĞALP’e, tüm Viroloji Anabilim Dalı personeline, çalışmalarımın yürütülmesini sağlayan Şap Enstitüsü Müdürü Dr. Recep ERGÜL’e, Şap Enstitüsü Teşhis Bölüm Başkanlığı’na, Laborant Adem Karadağ’a, katkılarından dolayı Dr. Christopher Helps, Dr. Scott Reid, Dr. Bernd Hoffman’a ve her zaman gösterdikleri sabır ve anlayışlarından dolayı Eşim ve Kızım’a teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER ve KISALTMALAR

AMV	: Avian Myeleblastosis Virus
BHK	: Baby Hamster Kidney
BHV	: Bovine Herpes Virus
BVD-MD	: Bovine Viral Diarrhea-mucosal disease
BTV	: Blue Tongue Virus
Bp	: Basepair
cDNA	: Complementary Deoxyribose Nucleic Acid
DEPC	: Di-Ethyl-Pyro-Carbonate
DKID	: Doku Kültürü İnfektif Doz
DNA	: Deoxyribose Nucleic Acid
dNTP	: Deoxy-Nucleotid Tri phosphate
DTT	: Dithiothreitol
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GMEM	: Glasgow Modifed Eagle Medium
HRPO	: Horse Radish Peroxidase
IBRS	: Swine Kidney Cell Line
LPBE	: Liquid Phase Blocking ELISA
mRNA	: Messenger Ribonucleic Acid
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
µl	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
OD	: Optikale dansite
OIE	: Office International des Epizootica
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RNA	: Ribonucleic Acid
RT	: Reverse Transcription
SWD	: Swine Vesicular Disease

Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	: Tris-Borate-EDTA
TUR	: Turkey (Türkiye)
WA	: West Africa (Batı Afrika)
WRL	: World Reference Laboratory (Dünya Referans Laboratuvarı)
WOAH	: World Organisation for Animal Health

ÇİZELGELER

Çizelge-2.1. Çalışmada kullanılan tanı materyalleri	18
Çizelge-2.2. Çalışmada kullanılan referans viruslar	19
Çizelge-2.3. Tasarımı yapılan ve RT-PCR’da kullanılan primerler	19
Çizelge-2.2.1. Spesifite analizinde kullanılan viruslar	27
Çizelge-3.1. Indirekt sandwich ELISA sonuçları	29
Çizelge-3.2. Farklı RNA ekstraksiyon metotlarında RNA saflığı ve konsantrasyonları	30
Çizelge-3.3. Multipleks RT-PCR tiplendirme sonuçları	35
Çizelge-3.4. Multipleks RT-PCR ve ELISA pozitiflik oranları (%)	39

ŞEKİLLER

Şekil-1.1. Şap virusunun genomu ve translasyon ürünlerinin şematik gösterimi	4
Şekil 2.1. Araştırmada tasarımı yapılan primerlerin genomik lokalizasyonu	20
Şekil 3.1. Tasarlanan primerlerin farklı şap virusu serotipleri ile RT-PCR sonuçları	31
Şekil 3.2. Tasarlanan primerler ile referans şap virusu serotiplerinin monopleks ve multipleks (duplex) RT-PCR sonuçları	32
Şekil 3.3. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında RT-PCR test sonuçları	33
Şekil 3.4. Farklı MgCl ₂ konsantrasyonlarında RT-PCR test sonuçları	33
Şekil 3.5. Farklı dNTP konsantrasyonlarında RT-PCR test sonuçları	34
Şekil 3.6. Farklı primer konsantrasyonlarında RT-PCR test sonuçları	34
Şekil 3.7. O tipi saha materyali multipleks RT-PCR sonuçları	36
Şekil 3.8. A tipi saha materyali multipleks RT-PCR sonuçları	36
Şekil 3.9. Şap virusu A tipi multipleks RT-PCR analitik sensitivite sonucu	37
Şekil 3.10. Şap virusu O tipi multipleks RT-PCR analitik sensitivite sonucu	37
Şekil 3.11. Şap virusu Asia-1 tipi monopleks RT-PCR analitik sensitivite sonucu	37

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Şap hastalığı evcil ve vahşi ruminantların akut, çok bulaşıcı, verim kayıplarına neden olarak hastalığın bulunduğu ülkelerde hayvansal ürün üretiminde ciddi ekonomik kayıplara yol açan viral bir hastalıktır. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (WOAH) kayıtlarında yer alan şap hastalığı ilk defa Fracastorius tarafından 1546 yılında İtalya’da sığırlarda bildirilmiştir. 1898 yılında ise Loeffler ve Frosch hayvanlarda hastalığa neden olan etkenin filtreden geçebilen ve bakterilerden küçük özellikte olduğunu tespit etmişlerdir (Sobrino ve ark., 2001; Grubman ve Baxt, 2004; Kitching ve ark., 2007).

Bir RNA virusu olan şap virusu, yüksek mutasyon oranı, quasi-species populasyon yapısı ve hızlı replikasyon yeteneği, yeni ortamlara çabuk adapte olabilmesi gibi RNA viruslarının genel özelliklerini gösterir (Murphy ve ark, 1999; Villarreal ve ark, 2000; Elena, 2002; Domingo ve ark., 2003). Yedi farklı antijenik serotipi (A, O, C, Asia 1, SAT1, SAT2, SAT3) bulunmaktadır. Dünya üzerinde en yaygın olan tipler A ve O tipleridir. C tipi Hindistan’da sınırlanmıştır. Asia-1 genelde güney Asya’da, SAT serotipleri (SAT1, SAT2 ve SAT3) ise Afrika’da bulunmaktadır (Knowles ve Samuel, 2003). Şap virusu, özellikle A tipi, doğal şartlarda yüksek mutasyon oranına sahip olduğundan çok sayıda (yaklaşık 80 kadar) alt tip ve varyantı bulunmaktadır (Steinhauer ve Holland, 1987; Domingo ve ark., 2003; Knowles ve Samuel, 2003).

1.2. Etiyoloji

Şap hastalığı virusu Picornaviridae familyası Aphtovirus altgrubu içerisinde sınıflandırılır. Picornaviridae familyası içerisinde 9 cins (Enterovirus, Rhinovirus, Cardiovirus, Aphthovirus, Hepatovirus, Parechovirus, Erbovirus, Kobuvirus ve Teschovirus) yer alır (King ve ark., 2000).

Şap virusu pH 7-9 arasında stabilitesini korur ve bu pH aralığı dışındaki değerlerde hızla inaktive olur. Çeşitli asitler (fosforik asit, sülfirik, sitrik, asetik, formik asitler) ve alkaliler (sodyum karbonat, sodyum metasilikat ve sodyum hidroksit) şap virusunu inaktive ederler. Saha şartlarında % 4' lük sodyum karbonat ve %1'lik sodyum hidroksit kullanılabilir (Shafiyi, 1968; Olechnowitz ve Engler, 1970). Virus düşük sıcaklık derecelerinde stabilitesini korurken, 50°C' nin üzerindeki sıcaklıklarda hızla inaktivasyona uğrar. Kemik iliği ve lenf bezlerinde ise uzun süre canlı kalabilir. İn vitro olarak etken dana tiroid, dana testis, dana böbrek, kuzu böbrek, domuz böbrek ve sığır dil epiteli gibi primer ve BHK-21, MVPK-1, LF-BK, IBRS ve HmLu gibi devamlı hücre kültürlerinde üretilir (Sobrin ve ark., 2001).

Tek iplikçikli, pozitif polariteli, yaklaşık 8500 nükleotid baz içeren şap virusu RNA'sı (vRNA) tek bir okunabilen baz çatısı (ORF, open reading frame) içerir ve iki ayrı kodlanmayan bölgeye (1200 nt) ayrılır. **VPg**, viral RNA'nın 5' ucunda kodlanmayan bölgesinde yer alır. Diğer bölge ise 400 nt'lik (uzunluğu izolatlara göre değişen) **PolyC** (sadece Aphtovirus ve Cardiovirus da mevcut) kısmıdır. PolyC'nin hemen altında **pseudoknot motifleri** bulunmaktadır. VPg, PolyC ve pseudoknot motifleri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Translasyon, internal ribozom giriş bölgesinde (**IRES**) bulunan 84 nükleotitten oluşan 2 AUG kodonu ile başlar. IRES, 465 bazlık bir bölgede yer alır ve bazı viruslar ile ökaryotik hücre RNA' larında bulunan cap-bağımsız translasyon fonksiyonuna sahiptir. Bu bölgede farklı RNA domainleri ve hücre proteinlerine bağlanmayı sağlayan fonksiyonel yapılar bulunmaktadır (Sobrin ve ark., 2001).

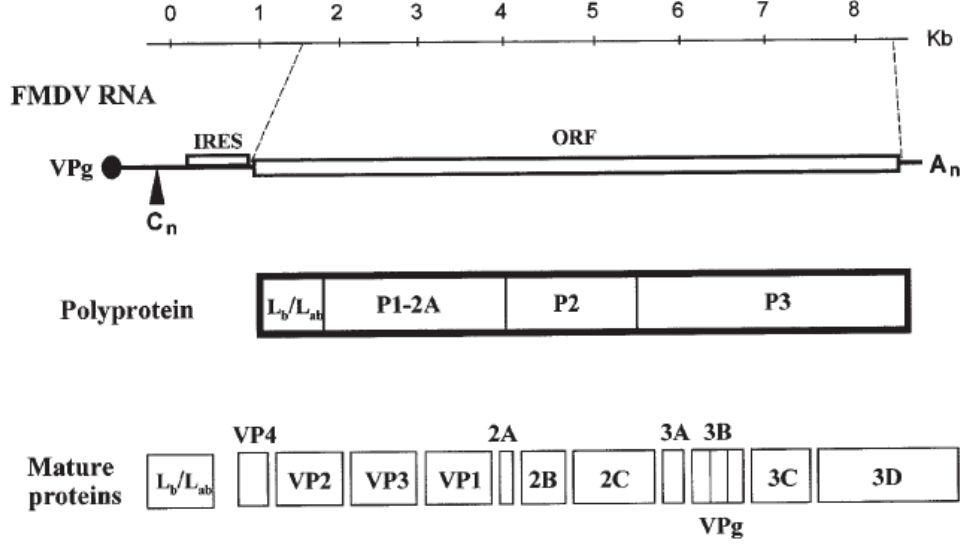
Virus replikasyonu sitoplazma içerisinde olur. Replikasyonda RNA mRNA işlevi gördüğünden infeksiyonu başlatma yeteneğindedir. Şap virusu kodlanan bölgesini içeren ORFunda (~7200nt), replikasyon sırasında öncelikle tek bir poliprotein sentezlenir. Yapısal prekursor proteini PI'nın virus proteazları tarafından parçalanmasını takiben 3 polipeptid, VPO (VP2 ve VP4'ün prekürsörü), VP1 ve VP3, asimetrik ünitelere veya protomerlere ayrılmaktadır (Şekil-1.2). Beş protomer birleşerek bir pentameri ve 12 pentamer de birleşerek kapsiti oluşturur. Kapsit, yeni sentezlenmiş bir RNA molekülü ile birlikte virus partikülünü oluşturur. VPO'nun VP2 ve VP4'e parçalanması kendiliğinden RNA'nın enkapsitasyonu sırasında

gerçekleşmektedir (Fox ve ark., 1987; Verdaguer ve ark., 1994; Sobrino ve ark., 2001; Clavijo ve ark., 2004). Sonuçta, virusun kodlanan bölgesinde (~7200nt), 12 ayrı protein sentezlenir. Bu proteinlerden 4 tanesi şap virusunun kapsitini oluşturan yapısal proteinler (1A, 1B, 1C ve 1D), 8 tanesi ise yapısal olmayan proteinlerdir (L, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C ve 3D) (Clavijo ve ark., 2004; Fry ve ark., 2005).

Şap virusu kapsiti picornavirus ailesinin klasik organizasyonuna sahip olup 28-30 nm çapında, ikozohedral simetriye sahip zarfsız bir RNA virusu özelliğindedir. Kapsit her bir yapısal proteinin 60 defa kopyalanması ile oluşmuştur. Bu yapısal proteinler; 1A (VP4), 1B (VP2), 1C (VP3) ve 1D (VP1) dir. Bunların arasında, VP1, VP2 ve VP3 virus yüzeyinde konumlanırken, VP4 ise iç kısımda yer alan bir proteindir. Dört yapısal protein içerisinde kapsitin 1D (VP1) bölgesi, özellikle de VP1' in karboksi terminal ucu virusun antijenik anlamda en değişken kısımdır. Serotip ve alt tip çeşitliliğinin bu bölgede oluşan amino asit farklılıklarından kaynaklandığı bildirilmiştir. Bu bölgeler dışındaki kısımlar çoğunlukla benzer genomlar şeklindedir (Harris ve ark., 1980; Beck ve ark., 1983; Cheung ve ark., 1983; Mason ve ark., 2003; Fry ve ark., 2005).

Picornavirus ailesi içinde yer alan virusların yapısal benzerliklerine rağmen, şap virusunun bazı ayırt edici yapısal özellikleri bulunur. Picornavirusların yüzeyinin çoğunda “kanyon” adı verilen ve konakçı hücre reseptörü ile etkileşimde görev alan geçici yapılar, şap virusu kapsitinde yer almaz (Hogle ve ark., 1985). Şap virusunun ince dış katmanı, dolayısıyla asitlere duyarlı yapısı ve çok fazla reseptör kullanımı gibi özelliklerine bağlı olarak, şap virusu diğer picornaviruslara göre konakçı hücre ile daha zayıf bir bağlantı gerçekleştirir (Acharya ve ark., 1989; Everaert ve ark., 1989) .

Şap virusu oluşan mutasyonlara bağlı olarak belirli bir sekansa sahip olmak yerine karışım/quasi-species populasyon yapısındadır (Domingo, 2002).



Şekil-1.1. Şap virusunun genomu ve translasyon ürünleri (Sobrino, 2001)

1.2.1. Şap Virusunun Tipleri

Şap virusunun yedi farklı antijenik serotipi ya da tipi (A, O, C, Asia 1, SAT1, SAT2, SAT3) bulunmaktadır. Ülkemizde 1914 yılından bu yana değişik tarihlerde A (A2, A5, A22, A96), O (O1, OPanAsia), SAT1 (1963 yılı) ve Asia- 1 (1973-2002) tipleri teşhis edilmiştir. Asia-1 tipi ilk defa 1973 yılında saptanmış olup, 1984-1999 yılları arasında sadece belli illerde sınırlı sürelerde (3 yıldan daha az) dolaşımda kalmıştır. Asia-1 tipi Türkiye’de Nisan 2002 yılından bu yana görülmemektedir. 1952 yılında ilk kez tiplendirilmiş olan A ve O serotipleri ise Türkiye’de endemik olarak gözlenmektedir (Aktaş, 1998; Tufan, 2006).

Antijenik varyasyon A tipinde oldukça fazladır (Aktaş, 1998; Marquardt ve Freiberg, 2000). O ve C tiplerinde A tipine göre daha az görülmektedir. Asia-1 suşları arasında da A ve O kadar önemli olmayan antijenik varyasyonlar tespit edilmiştir (Ansell ve ark., 1994; Knowles ve Samuel, 2003). İn vitro ortamda hücre kültürlerinde seri pasajlar sırasında ve persiste enfeksiyonlarda virusun replikasyonunda hatalar oluşabilir. Bu durum varyantların ortaya çıkması ile sonuçlanır (Carrillo ve ark., 1989). Ayrıca Türkiye’de uygulanan aşılama stratejisine bağlı olarak oluşan bağışık populasyon ve çok sayıda taşıyıcı enfekte hayvan varlığı

nedeniyle pek çok varyantın mevcut olabileceği bildirilmiştir (Gürhan ve ark., 1993).

Şap virusunun sahada aktif olarak uzun yıllar süren evrimi, varyasyon oluşumuna fırsat vererek bugün gördüğümüz 7 farklı serotipin oluşumuna yol açmıştır. Ancak serotip farklılığının moleküler anlamda açıklaması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Seleksiyon, özellikle de immün baskıya bağlı olarak viral kapsitin yapısında farklı antijenik motiflerin oluşması nedeniyle farklı tiplerin oluşumunun indüklendiği düşünülmektedir (Domingo ve ark, 2003). Şap virusunun en sık yaşadığı mutasyon tipi nokta mutasyonlardır. Buna örnek olarak A22 Irak alt tipi verilebilir. Irak'dan 1964 yılında Türkiye'ye giren A22 alt tipi, bir süre tespit edilmemiş ancak en son 2005 yılında A96 ve 98 alt tipinden farklı olarak oluşan A/O5 alt tipinin, A22 Irak ile antijenik karakterizasyon sonucunun uyumlu olduğu bildirilmiştir. Bir başka ifade ile birbirinden bağımsızmış gibi oluşan A alt tipleri köken olarak orijinal virus izolatu ile bir noktada benzerlik göstermektedir (Rweyemamu ve ark, 1984). Yapılan bir başka çalışma (Duque ve Baxt, 2003) sonucuna göre şap virusu A ve O serotiplerinin integrin kullanma etkinliğindeki farklılığın, serotiplerin oluşumunda etkisi olduğu bildirilmiştir. Şap virusu konakçı hücreye bağlanmasını sağlayan reseptörlerin serotipler arası kullanımı birbirinden farklıdır. Örneğin O tipinde glikozaminoglikan, heparan sülfat rol alırken, A tipinde heparan sülfat etkili değildir (Mason ve ark., 2003).

Yapılan bir çalışmada (Grubman ve ark, 1987), şap virusu genomunda antijenik olarak en fazla değişkenlik gösteren bölgeler PAGE ile incelenmiş, öncelikle VP1, daha az düzeyde VP3 ve yapısal olmayan bölgede 3C (viral proteaz) en çok değişkenlik gösteren bölgeler olarak bildirilmiştir. Ancak VP1'in yüzeyinde 140-160 amino asit dizisinde yer alan virusun hücre ile bağlanma bölgesini içeren oldukça korunmuş *Arg-Gly-Asp (RGD)* motifine sahip bölgenin hareketli ve çok fonksiyonlu bir yapıda olduğu bildirilmektedir. Bu özelliklere sahip RGD motifi virusun en önemli nötralizasyon bölgesini içermektedir (Pfaff ve ark., 1988; Acharya ve ark., 1990; Makoff ve ark., 1992; Mason ve ark., 2003).

Antijenik varyasyon genellikle genomun yapısal bölgesinde oluşur. Polimerazı kodlayan bölgede hemen hemen hiç varyasyon yoktur. VP1' in G-H kıvrımı dışında 41-60 ve 190-213 rezidüleri, diziliş varyasyonunun görüldüğü diğer önemli bölgelerdir (Brown, 1980; Brown, 1984). RGD (145-147 amino asit rezidüsü) bölgesinde gözlenen tek bir amino asit yer değişiminin virus-antikor etkileşiminde önemli olabileceği bildirilmiştir (Brown, 1995). 140-160 ve 200-213 amino asit rezidüleri nötralizan antikorlar ile etkileşime giren diğer önemli bölgelerdir (Thomas ve ark., 1988). Türkiye O1Manisa/69 izolatının monoklonal antikorlar ile kapsit antijenik epitoplarının araştırıldığı bir çalışmada (Aktaş ve Samuel, 2000), VP2 bölgesinde 72 ve VP1'de 149 amino asit pozisyonunda yer değiştirme (substitution) saptanmıştır.

Şap virusunun özellikle serotip ya da topotip (genetik ve coğrafik olarak farklılaşmış grup) düzeyinde konakçı spesifitesi hakkında yeterli bilgiler mevcut değilse de, konakçı spesifitesi şap virusunun yayılımı ve persistensini anlamada en önemli epidemiyolojik faktördür. Şap virusunun sahip olduğu yüksek mutasyon hızı ve quasi-species (karışım) populasyon yapısı onun hızlı evrimini bir ölçüde açıklar. Ayrıca virusun genomunda oluşan minor yapısal değişikliklerin konakçı affinitesinde değişime yol açtığı bilinmektedir. Ancak konakçı spesifitesi, Türkiye'de Asia-1 serotipinin epidemileri sonrasında neden dolaşımda kalmadığını (persistensi) ya da A serotipinin O serotipine göre daha kısa süre dolaşımda kalabildiğini tam olarak açıklayamamaktadır. Topotipin sahip olduğu virulens ve konakçı aralığına bağlı olarak dolaşımda kaldığı düşünülmektedir (Domingo, 2002; Domingo ve ark., 2003).

1.3. Epidemiyoloji

Arteriodactyla ailesi içerisinde bulunan hayvanlar, birkaç istisna dışında şap hastalığına duyarlıdır. Hastalık epidemiyolojisinde büyük öneme sahip olan sığır, domuz, koyun ve keçiler yanısıra Asya, Güney Amerika ve Afrika su bufaloları, kudu ve impalalar hastalığın doğal epidemiyolojisinde rol oynarlar. Geyik, deve, lama, Hindistan filleri ise belirli şartlar altında epidemiyolojik risk oluşturabilecek türlerdir. İnsan, şap hastalığına dirençli olan köpek ve at gibi hayvanlar, hastalığın konakçısı olmayan hayvanlar (kuşlar, fareler vs.), kontamine materyaller (yem, ot, su vs.), nakil araçları, et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri, suni tohumlama ve embryo

transferi mekanik olarak önemli diğer enfeksiyon kaynaklarıdır (Alexandersen ve Mowat., 2005).

İnkübasyon periyodu, infeksiyöz periyot sırasında dışarı saçılan virus partikül miktarı, virusun hava yolu ile de yayılma özelliği, virusun dışkı ve karkasta canlılığını sürdürebilmesi, taşıyıcılık özelliği ve duyarlı konakçı türünün fazlalığı hastalığın epidemiyolojisini belirleyen çeşitli faktörlerdir (Davies, 2002).

Viremi fazında (4-5 gün) virus tüm vücut sıvılarında bulunduğundan bu dönemde hasta hayvan, sağlıklı hayvanlar için daima enfeksiyon kaynağıdır. Hastalığın akut döneminde enfekte hayvanların vezikül sıvısı, salya gibi bazı dokularında çok yüksek miktarlarda virus tespit edilebilir. Hastalığın akut dönemi tamamlandıktan birkaç gün sonra ise, yumuşak damak ve farenks (persiste enfeksiyonun gözlendiği yer) dışındaki dokulardan, virus izolasyonu yapılabilmesi çok nadirdir. Enfekte ve duyarlı hayvanlar arasında en yaygın (%95) bulaşma formu direkt temastır. Aerosol bulaşma, direkt temasın en önemli yoludur (Donaldson ve ark., 1987). Virusun hava yolu ile çok uzak mesafelere taşınması ile hastalığın yayılması söz konusudur. Örneğin, 2001 yılında İngiltere’de görülen şap salgını hava yolu ile virus yayılmasına önemli bir örnektir.

Türkiye’deki hastalık odakları incelenmiş ve hastalığın en yaygın bulaşma yolunun direkt bulaşma olduğu bildirilmiştir. Kontrolsüz hayvan hareketleri ve hayvan pazarları Türkiye için önemli hastalık risk kaynaklarıdır (Aktaş, 1998).

Şap virusu serotipleri O, A ve Asia-1’in Türkiye’deki yayılımı ve persistensine ilişkin yapılan bir araştırmada (Gilbert ve ark., 2005), şap hastalığı görülme sıklığının duyarlı konakçı türü fazlalığı, odak bölgesi ile diğer hayvancılık ile ilgili bölgelerin birbirine çok yakın olması ve et üretimi-talebinde yaşanan karışıklıklar (et talebi nedeniyle besi hayvanlarının yasal olmayan hayvan hareketlerinin yoğun yaşandığı doğu bölgelerinden-batı bölgelerine nakli) gibi faktörlere bağlı olarak değişebileceği bildirilmiştir.

1.3. Patogenez ve Patoloji

Bütünlüğü bozulan boynuzlaşmış epitel dokusuna direkt virus girişi dışında, farengeal bölge enfeksiyonun primer bölgesidir (McVicar ve Sutmoller, 1976). Viremiden veya klinik belirtilerin görülmesinden 1-3 gün önce bu bölgede virus tespit edilebilir (Alexandersen ve ark., 2002). Yumuşak damağın dorsal yüzü ve nazofarenks birleşme bölgesi, ilk virus girişi ve replikasyonda önemli bölgelerdir (Alexandersen ve ark., 2001). Tonsilla bölgesi ise özellikle koyunlarda primer enfeksiyon bölgesi olarak önem taşır (Burrows, 1968).

Virus, hücre içine girişinde genellikle integrin grubu ($\alpha\beta6$, $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha\beta1$ gibi) olarak bilinen hedef hücre yüzeyinde bulunan reseptörleri kullanır (Duque ve Baxt, 2003). İntegrinler dışında Fc reseptörler, heparan sülfat gibi diğer reseptörleri de kullanır. Şap virusu farenksteki primer replikasyonunu takiben lenfatik sisteme geçerek, kan yoluyla doku ve organları enfekte eder. Viremi dönemi yaklaşık 4-5 gün sürer. Klinik belirtilerin görülmesinden önce sekret ve ekskretlerde bol miktarda virus bulunur ve çok küçük toz zerrecikleri içinde, alveoler bölgelere ve kan makrofajları yüzeyine direkt taşınabilir. Daha sonra hedef dokulara (ağız, deri ve dilin boynuzsu epiteli) taşınan virus burada depolanır ve ikinci replikasyona başlar (Alexandersen ve ark., 2001).

Virusa karşı konakçı reaksiyonu, klinik belirtilerin görülmesinden 3-4 gün sonra, antikor yanıtı şeklinde tespit edilir. Virusun titresi düşerken nötralizan antikorların titresi yükselir. Dolaşımdaki virusun temizlenmesinde bu bağışıklık yanıtı genellikle yeterli olmakla birlikte, taşıyıcılık durumunun oluşumunu engelleyemeyebilir (Alexandersen ve ark., 2002). Antikorlar dolaşımdaki virusu etkin bir şekilde temizler. Bununla birlikte, epitel dokusunda 10-14 gün süre ile virus tespit edilebilmektedir (Oliver ve ark., 1988).

Deri, makroskopik ve histopatolojik olarak normal görünmesine karşı yüksek miktarda virus içerebilir. İlk histopatolojik değişiklikler boynuzsu tabakalaşmış epitelde balon dejenerasyonu ve hücre içi ödem ile karakterizedir. Sonra nekroz,

mononukleer hücre ve granulosit infiltrasyonu başlar. Bu aşamadan sonra lezyonlar gözle görülebilir. Enfeksiyonun ağır seyrettiği durumlarda, veziküller genişler ve yara şeklini alır. Veziküllerin içi açık renkte seröz sıvı ile doludur. Veziküller genellikle kabuklaşır ve bu kabuklar yaklaşık 24 saat sonra düşer. Kabukların ayrılmasından sonra kırmızı renkte ülserler açığa çıkar. Birkaç gün sonra lezyonlar üzerinde nekrotik epitel parçaları meydana gelir. Özellikle ağız bölgesinde ve dil üzerinde hastalığa özgü granülasyon dokusu oluşur (Alexandersen ve ark., 2003a).

1.5. Klinik Belirtiler

Şap hastalığı alınan virus miktarı, suşu, organizmaya giriş yeri, konakçı hayvan türü ve bireysel yapısı gibi faktörlere bağlı olarak klinik veya subklinik seyir gösterir (Barnett ve Cox, 1999; Hughes ve ark., 2002). Alınan virus miktarına bağlı olarak hastalığın inkubasyon süresi 2-14 gün arasında değişmektedir (Alexandersen ve ark., 2003b).

Hastalığın ilk devresinde viremiden dolayı gözlenen ateş ($40 - 41^{\circ}\text{C}$) evresi kısa sürer ve hastalığın ateşsiz dönemi başlar. Daha sonra ağızda oluşan veziküllerden dolayı iştahsızlık ve depresyon görülür. Veziküller en çok ağız, ayak (tırnak arası korona bölgesi) ve meme epitelinde oluşur. Şiddetli ağız lezyonları sığırlarda gözlenir. Veziküllerin etkisiyle ağızdan bol miktarda hastalığın tipik klinik görünümü olan ip gibi uzayan salya akmaya başlar (Alexandersen ve Mowat, 2005).

Koyunlarda klinik belirtiler sığırlara göre daha hafif seyirlidir. Genellikle lezyonlar ayaklardadır ve buna bağlı olarak da koyunlarda klinik belirtilerin başında topallık gelir (Hughes ve ark., 2002).

1.6. Şap Viruslarının Moleküler Epidemiyolojisi

Şap viruslarının genetik farklılığını belirlemek amacıyla filogenetik haritalarının çıkarılmasında antijenik anlamda değişkenlik gösteren genomun VP1 bölgesi kullanılmaktadır (Saiz ve ark., 1993; Knowles ve Samuel, 2003).

Serotip A, Avrupa ve Asya serotipleri içerisinde antijenik olarak en değişken tip olarak düşünülmektedir (Knowles ve Samuel, 2003). 1970’li yılların başında 32 alttip bildirilmiştir (Davie, 1964). Bu alttiplerden bazılarının (A22, A24, vs.) genetik olarak farklı oldukları gösterilmesine rağmen çoğu alt tip çalışılmamıştır. Günümüze kadar 500’den fazla A tipi virus izolatının kısmi veya tüm VP1 dizileri karşılaştırılmış ve bir çok genetik grup bildirilmiştir (Aktaş, 1998; Marquardt ve Haas, 1998; Marquardt ve Freiberg, 2000). A tipi içerisinde Avrupa/Güney Amerika (Euro/SA), Asya ve Afrika olmak üzere üç tane coğrafik dağılımları farklı genotip (topotip) bildirilmiştir (Knowles ve Samuel, 2003).

Türkiye’deki A tipi şap viruslarının moleküler epidemiyolojisi üzerine yapılan bir çalışmada (Aktaş, 1998), küçük baş hayvanların şap virusu A serotipi epidemiyolojisindeki öneminin O serotipine göre çok daha az düzeyde olduğu bildirilmiştir. A serotipi şap viruslarının 1989, 1990 ve 1997 yıllarında her ne kadar aşı suşundan farklılık gösteren bazı antijenik varyantları saptanmış ise de, 1998 yılına değin A serotipleri genelde A22 Mahmatlı aşı suşu ile yakın ilişkili olarak bulunmuştur. Daha sonraki yıllarda 1998-2004 yıllarına ait şap viruslarının 1D bölgesinden yapılan sekans analizleri sonucunda gözlenen iki farklı genetik gruptan (A96 ve A99), A96’nın aşı suşu ile uyumunun iyi olduğu, A99’ un ise orta dereceli uyumlu olduğu bulunmuştur (Klein ve ark, 2006). Yine 2006 yılında tespit edilen A alt grubunun (A/O5) A22 Mahmatlı aşı suşu ile uyumlu oldukları saptanmıştır (Parlak ve ark., 2007).

Serotip O, Şap Hastalığı Dünya Referans Laboratuvarı’nda (WRL) pozitif saha tanı materyalinden en yaygın tespit edilen tiptir (Ferris ve Donaldson, 1992). Önceleri O tipi şap virusu 10 veya 11 antijenik alt tipe ayrılmıştır (Davie, 1964). Ancak günümüzde O tipinde antijenik farklılığın az olduğu kabul görmekte ve buna

bağlı olarak antijenik farklılıktan daha çok genetik ve coğrafi farklılıklara göre yapılan sınıflandırmalarda O tipinde birçok farklı topotipin varlığından söz edilmektedir (Samuel ve Knowles, 2001).

O tipi şap virusları son olarak 9 farklı topotip altında gruplandırmışlardır (Knowles ve ark., 2004). Bunlar; Cathay, (Çin, Hong Kong, Tayvan), Ortadoğu ve Güney Asya (ME/SA)(Middle East/South Asia), Güney-Doğu Asya (SEA), (South-East Asia), Avrupa-Güney Amerika (Euro/SA)(Europe/South America), Endonezya-1 (ISA-1), (Indonesia-1), Endonezya-2 (ISA-2)(Indonesia-2), Doğu Afrika (EA-1) (East Africa-1), Doğu Afrika (EA-2) (East Africa-2) ve Batı Afrika (WA) (West Africa) topotipleridir. Bu topotiplerden 2 tanesinin kaybolduğu (ISA-1 ve ISA-2) düşünülmektedir. Dünya üzerinde izole edilen O tipi izolatların çoğunun ME-SA (Ortadoğu ve Güney Asya) topotipine dahil olduğu bildirilmiştir (Samuel ve Knowles, 2001). Taiwan'da 1999 yılında farklı bir O alt tipi tespit edilmiştir. Ocak 2000'de Çin'de de saptanan bu alt tip, 1908'den beri şap hastalığı ari olan Japonya'ya ve yine 1934'den beri şap hastalığı ari olan Kore'ye ulaşmıştır. Şu an PanAsia olarak bilinen bu O alt tipi, daha sonra Türkiye ve 2001'de İngiltere'ye kadar ulaşmıştır (Mahy, 2005).

Türkiye'de 1964-1998 ve 1998-2004 yılları arasında izole edilen A ve O tipi virusların genetik ve antijenik analizleri sonucunda, A ve O tipi virusların epidemiyolojileri arasında önemli farklılıklar saptanmıştır (Aktaş, 1998). Bu çalışma sonucuna göre farklı alt gruplara ait O virusları aynı anda sirküle olabildiği ve genellikle bir alt grubun daha dominant karakterde olduğu bildirilmiştir. Ayrıca O tipi alt gruplarının belli bir bölgede sınırlı kalmadıkları ve genelde antijenik olarak sirküle olan O tipi virusların O1 Man 69 aşısı suşu ile yakın ilişki içerisinde oldukları belirlenmiştir.

Şap virusu Asia-1 serotipi, antijenik anlamda diğer tiplere göre daha az düzeyde değişkenlik göstermektedir. Asia-1 tipinin tek bir genotip içerisinde iki ayrı gruba ayrıldığı bildirilmiştir (Muthuchelvan ve ark., 2001). Buna göre prototipi

Pakistan kökenli olan bir grup ile Bangladeş, Bhutan, Hindistan, İsrail ve Nepal orijinli diğer gruptan oluşmaktadır. Daha sonra bildirilen bir başka çalışmada (Gurumurthy ve ark., 2002), 61 adet Hindistan Asia-1 sekansı karşılaştırıldığında Asia-1'in genotip I-IV olarak bilinen 4 farklı genotipe ayrıldığı bildirilmiştir.

1.7. Saha Suşlarının Teşhis ve Tiplendirilmesi

Şap enfeksiyonunun tanısı ve saha suşlarının tiplendirilmesinde önceleri komplement fikzasyon, hemaglütinasyon inhibisyon, koaglütinasyon, mikronötralizasyon gibi testler kullanılmıştır. Şap virusunun tespitinde gold standart olarak kabul edilen virus izolasyonu oldukça sensitive bir metot olsa da, ekstra iş gücü gerektirmesi, pahalı olması, örnek kontaminasyonu gibi bir takım olumsuzluklara bağlı olarak çok pratik olmamaktadır. Ayrıca herşeyden önce canlı virus ile çalışılması dolayısıyla çevrenin kontaminasyon riski, testin en önemli olumsuz yanıdır (Davie, 1964; Warrington ve Kawakami, 1972; Rweyemamu ve ark., 1978; Hamblin ve ark., 1984; Montassier ve ark., 1994; Callens ve Clercq, 1997; Kitching, 2002).

Günümüzde rutin olarak şap virusunun tanı ve tiplendirmesinde, lezyonlu epitel dokusundan hazırlanan süspansiyonda spesifik şap virusunun tespiti amacıyla İndirekt Sandwich ELISA tekniği kullanılmaktadır. Ancak ELISA'nın sensitivitesinin yeterince yüksek olmaması, doğrulanması için virus izolasyonuna gereksinim duyması, testin sonuçlanması için en az 24 saat süre gerekmesi ve kalitesi düşük (virus inaktif) tanı materyali ile çalışma güçlüğüne bulunması gibi bir takım olumsuzlukları vardır (Hamblin ve ark., 1984; Roeder ve Le Blanc Smith, 1987; Ferris ve Dawson, 1988; Kitching ve ark., 1989).

Son yıllarda şap virusu tanı ve tiplendirmesinde RT-PCR (Laor ve ark., 1992; Hofner ve ark., 1993; House ve Meyer, 1993; Moss ve Haas, 1999; Alexandersen ve ark., 2000), real time PCR (Reid ve ark., 2001a; Rasmussen, 2003; Reid ve ark., 2003; Rasmussen 2005), Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA), (Collins, 2002), microchip array (Mcgall ve Christians, 2002; Baxi ve ark., 2006) gibi

teknikler üzerinde çalışılmaktadır. Pek çok alanda yaygın olarak kullanılan PCR tekniklerinden şap virusunun tiplendirilmesi için RT-PCR (Rodriguez ve ark., 1992; Callens ve Clercq, 1997; Reid ve ark., 1999; Reid ve ark., 2000; Reid ve ark., 2001b; Saiz ve ark., 2003), Ag-RT-PCR ELISA (Suryanarayana ve ark., 1999), multipleks RT-PCR gibi (Vangrysterre ve Clercq, 1996; Callens ve Clercq, 1997; Reid ve ark., 1999; Grindharan ve ark., 2005; Bao ve ark., 2008) modifiye PCR teknikleri halen üzerinde çalışılan yöntemlerdir.

Yapılan bir çalışmada (Amaral-Doel ve ark., 1993), enfekte saha materyallerinden şap virusun tanısında RT-PCR'ın hücre kültürlerinde virus izolasyonuna göre daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Şap virusu tanı ve tiplendirilmesinde monopleks RT-PCR kullanımına ilişkin yapılan bir çalışmada (Reid ve ark., 1999), testin saha materyali ile çalışmada duyarlı olmadığı belirlenmiş olup, saha materyalinde RT-PCR etkinliğini değiştirebilecek RNA parçalayan enzimler (RNAase) varlığı, primer dizaynı, primer konsantrasyonu ve metodoloji gibi faktörlere bağlı olarak RT-PCR duyarlılığının değişebileceği bildirilmiştir. Bu konuda yapılan bir başka araştırmada (Nunez ve ark., 1998) ise RT-PCR ile tiplendirme sonucunun serolojik testlerle yapılan tiplendirilme sonucuna benzer olduğu belirlenmiştir.

Multipleks RT-PCR tekniği çok sayıda primer çifti kullanarak birden fazla hedef bölgenin aynı anda ve aynı ortamda (PCR reaksiyon karışımı) araştırıldığı ve saptandığı bir PCR tekniğidir. Teknik genlerdeki delesyon, mutasyon veya polimorfizm analizi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Tekniğin viral, bakteriyel, mantar ve paraziter enfeksiyon hastalıklarının teşhisinde oldukça değerli bir teknik olduğu bildirilmiştir (Elnifro ve ark., 1992; Edwards ve Gibbs, 1994; Henagariu, 1997; Jokela ve ark., 2005).

Şap virusu tanı ve tiplendirmesinde multipleks RT-PCR kullanımına ilişkin sınırlı sayıda araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalardan bazılarında (Vangrysterre ve Clercq, 1996; Callens ve Clercq, 1997; Reid ve ark., 1999), direkt saha

materyalinden enfeksiyon tanısında RT-PCR'ın çok başarılı bir teknik olmadığı bildirilirken, başka bir araştırmada (Grindharan ve ark., 2005) multipleks RT-PCR tekniği ile tiplendirmede direkt saha tanı materyali ile çalışıldığında ELISA'ya göre daha iyi sonuçlar alındığı belirtilmiştir. Daha sonra yapılan bir araştırmada (Mohapatra ve ark., 2006) ise ELISA, dot-hibridizasyon, oligoprobing RT-PCR ELISA birbiriyle karşılaştırılarak, bu iki metodun ELISA'dan daha sensitive olduğu bildirilmiş ve ELISA ile belirlenemeyen/ELISA negatif örneklerin değerlendirilmesinde second-round/ikincil test olarak bu testlerin kullanılabileceği bildirilmiştir. Multipleks PCR, şap hastalığı ile klinik benzerliği olan hastalıkların ayırımında, konvansiyonel multipleks PCR ve multipleks real time PCR olarak da çalışılmış (Fernandez ve ark., 2008; Hindson ve ark., 2008), tekniğin her iki şekilde de oldukça iyi sonuç verdiği bildirilmiştir.

1.8. Kontrol ve Mücadele

Hastalığın kontrolü amacıyla uygulanan programlar aşılama, karantina, kesim-imha esasına dayanmaktadır. Benimsenen metot, ülkenin sosyoekonomik yapısı dolayısıyla, izlediği hastalık kontrol stratejisi ile ilgilidir. Bulaş kaynakları çok fazla olduğundan hastalıktan korunma çok kolay olmamaktadır. Nitekim hastalıktan ari olan İngiltere' de 2007 yılında hastalığın tekrar görülmesi konunun ciddiyetini ortaya koymaktadır (Kitching ve ark., 2007; Perry ve Rich, 2007; Mort ve ark., 2008).

Hastalığın endemik olduğu ülkelerde inaktif aşılar ile yapılan düzenli aşılamalar, şap hastalığına bağışık populasyon oluşumuna yardımcı olur. Aşılama stratejisi, ülkenin daha önceden yapacağı hastalık risk haritalarına göre belirlenir. Aşı ve saha suşu arasındaki uyumun sürekli takip edilmesi, aşı hazırlanması için harcanan emek ve maliyetin tutarlı bir biçimde kullanılmasına yardımcı olur. Bu amaçla kullanılan ELISA testi (r1 ELISA) ve saha suşlarının sekans analizleri, yeni bir suşun ülkeye girişini gösteren erken uyarı sistemi niteliğindedir. Bu nedenle sürekli olarak, bu yöntemler ile şap enfeksiyonlarına yol açan suşların moleküler karakterizasyonlarının belirlenmesi gerekmektedir (Kitching, 1988; Sutmoller ve ark., 2003, Cottam ve ark., 2007).

Türkiye’de yapılan sekans analizi çalışmaları ile mevcut şap virusu suşlarının Ortadoğu orijinli olduğu bildirilmiştir (Aktaş, 1998; Parlak, 2005). Ortadoğu kaynaklı yasal olmayan hayvan hareketlerinin çeşitli nedenlerle önüne geçilememesi nedeniyle Türkiye’ye yeni virus suşlarının girişi kaçınılmazdır. Bu nedenle özellikle İran üzerinden yasal olmayan hayvan hareketlerinin yoğun olduğu doğu illerinden diğer bölge illerine hayvan hareketlerinin önlenmesi en etkili tedbirlerden biri olacaktır.

1.9. Tezin Amacı

Şap virusunun sahip olduğu özellikler (RNA virusu, quasi-species yapısı) gerek teşhisi ve gerekse uygun aşıların üretimini ve dolayısıyla hastalıkla mücadeleyi güçleştiren önemli etmenlerdir. Son yıllarda hastalıklar ile mücadelede aşılardan çok epidemiyolojik takibin yapılması ve gereken koruyucu tedbirlerin alınması önem kazanmıştır. Dolayısıyla epidemiyolojik takibi destekleyecek hastalığın hızlı teşhis olanaklarının araştırılması ve belirlenmesi yönündeki çalışmalar da oldukça önem kazanmaktadır. Hızlı teşhis ve tiplendirme, salgın orijininin belirlenmesi, yayılımının izlenmesi ve gereken koruyucu tedbirlerin alınma sürecini kısaltmış olacaktır.

Bu araştırmada, şap virusu saha izolatlarının tiplendirmesi amacıyla hızlı, ekonomik, direkt saha materyalinden tanıda başarılı bir moleküler teşhis metodu olarak multipleks RT-PCR tekniğinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Planlanan bu çalışma, öncelikle şap virusu saha izolatlarının tanı ve serotiplendirilmesinde monopleks ve/veya multipleks (en az iki hedef bölge) RT-PCR teknikleri kullanılarak, direkt saha materyallerinden çalışma kolaylığının (virus izolasyonu gerektirmeden) incelenmesi hedeflenmiştir. İkincil olarak şu an şap virusu tanı ve serotiplendirmesinde kullanılan ELISA ve bu çalışma ile geliştirilecek multipleks RT-PCR tekniklerinin sonuçları karşılaştırılarak, multipleks RT-PCR tekniğinin tanısal değerinin araştırılması amaçlanmıştır. Tanısal değerinin belirlenmesinde ayrıca testin sensitivite ve spesifite belirlenmesi ile mikş şap enfeksiyonlarının tespit edilebilirliği değerlendirilecektir. Ayrıca, ELISA ile belirlenemeyen ve/veya yanlış

negatif olarak sonuç alınan örneklerin (inaktif virus içeren marazi madde) ortaya konması çalışmanın bir diğer amacıdır.

Çalışmada öngörülen hedeflere ulaşıldığında, saha materyalinden şap virusunun tanı ve serotiplendirilmesi kısa sürede, aynı anda, daha sensitive ve spesifik olarak gerçekleştirilecektir. Böylece, hastalığın epidemiyolojisi ve mücadelesine önemli katkı sağlanabileceği düşünülmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Hücre Kültürü

Geliştirilecek multipleks RT-PCR tekniğinde incelenecek bir kısım saha materyalinin pasajlanması ve ayrıca protokolün analitik sensitivitesinin belirlenmesinde, önceden duyarlılık testleri yapıp sıvı azot tankında (-196°C) stoklanan ve monolayer üreme özelliği gösteren BHK-21 An31 hücre kültürü kullanıldı. Hücre kültürlerinin hazırlanmasında, şap virusuna karşı antikor taşımadığı, mycoplasma antijeni ve viral kontaminant içermediği önceden belirlenmiş ticari serum (Sigma, Kat. No: F-2442) ve vasat olarak BHK 21 hücre kültürlerine spesifik ticari virus üretme vasatı GMEM Glasgow MEM BHK 21 1X (Gibco, Kat. No. 21710) kullanıldı.

2.1.2. Tanı Materyalleri

Bu araştırmada, 2006-2008 yılları arasında Türkiye'nin çeşitli illerine ait klinik olarak şap hastalığı şüpheli hayvanlardan alınarak, Şap Enstitüsü'ne tanı amacıyla gönderilen 259 adet dil epiteli ile 28 adet buzağı/kuzu kalp materyali olmak üzere toplam 287 adet tanı materyali (direkt saha ve hücre kültürlerinde pasajlanmış virus pasaj sıvısı) kullanıldı. Bu tanı materyalinden 15 adedi, 1991-2001 yılları arasında Asia-1 hastalık odaklarından toplanarak Şap Enstitüsü dil epitel arşivinde muhafaza edilen 15 adet Asia-1 saha materyalidir.

Bildirilen materyallerin tümü (287 adet) indirekt ELISA'ya tabii tutuldu. Ayrıca ELISA ile negatif olduğu saptanan toplam 156 adet saha materyalinin 65 adedi BHK-21 hücre kültürlerine inokule edildi. Sağlanan pasaj sıvıları tekrar Indirekt ELISA ile test edildi.

Bu çalışmada geliştirilen multipleks RT-PCR tekniği kullanılarak, İndirekt ELISA uygulanan toplam 272 tanı materyali değerlendirildi. Bu materyallerden 65 adedini ELISA sonucunda şap virusu yönünden negatif olarak belirlenmelerini takiben BHK-21 hücre kültürlerinde yapılan hücre kültürü pasajlarına ait pasaj sıvısı oluşturdu. Ayrıca Şap Enstitüsü dil epitel arşivinden sağlanan ve Enstitü kayıtlarına göre Asia-1 yönünden pozitif olarak saptandığı bildirilen 15 adet tanı materyali monopleks RT-PCR’da kullanıldı.

Bildirilen başlangıç materyali içinden RT-PCR diagnostik sensitivite/spesifitesinin belirlenmesi amacıyla yapılacak monopleks RT-PCR’da kullanılacak 45 örnek ise indirekt ELISA test sonuçları dikkate alınarak belirlendi.

Bu araştırmada kullanılan tanı materyallerinin hazırlanışına (direkt saha materyali veya pasaj sıvısı) ve doku orijinine (dil epiteli veya kalp) göre sayıları Çizelge 2.1.’de verildi.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan tanı materyalleri (adet)

	Hazırlanış		Doku orijini	
	Direkt Saha Materyali	Pasaj	Dil epiteli	Kalp
	222	65	259	28
TOPLAM	287		287	

2.1.3. Referans Virüsler

Mono ve multipleks RT-PCR standardizasyonu ve optimizasyonu sırasında kullanılan virus izolatları WRL’den temin edildi. Bu amaçla, aynı zamanda Şap Enstitüsü’nde aşı üretiminde kullanılan virus suşları da kullanıldı (Çizelge-2.2).

Çizelge-2.2. Çalışmada kullanılan referans viruslar

Virus	Orijin	Tarih	Referans
A22/Mahmatlı	Eskişehir,Türkiye	1964	(Knowles ve ark., 1999)
A/Ayd/98	Aydın,Türkiye	21/04/1998	(Aktaş, 1998)
A22	Türkiye	2006	WRL
O/Man/TUR/69	Manisa,Türkiye	01/04/1969	(Aktaş ve Samuel, 2000)
O/TUR/12/72	Ankara,Türkiye	04/09/1972	(Aktaş, 1998)
O/JOR5/2006	Ürdün	2006	WRL
Asia 1 Shamir	İran		WRL
Asia1/HKN 5/2005	Hong Kong /Çin	2005	WRL

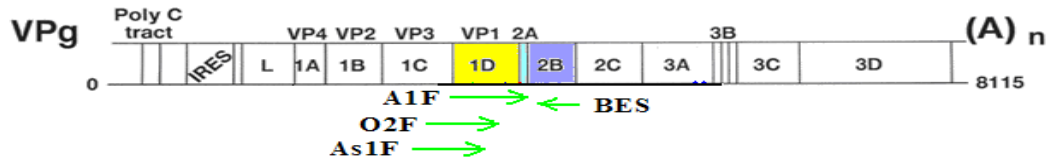
2.1.4. Primerler

Primer dizilerinin tasarımı, çeşitli web tabanlı kullanımı serbest (Primer Premier, Primer 3) ve lisanslı programlar aracılığıyla (MacVector) yapıldı ve ticari bir firmaya (Operone International, Almanya) sentezlettiler. Çalışmada kullanılan primerler ayrıntılı olarak Çizelge-2.3.'de gösterildi. Şap virusu serotiplerine spesifik primerler genomun 1D bölgesinden, şap virusu genus spesifik bir ortak reverse primer ise genomun 2AB bölgesinden tasarlandı (Şekil 2.1).

Çizelge 2.3. Tasarımı yapılan ve RT-PCR'da kullanılan primerler

Primer	Nükleotid dizisi (5'-3')	Sense	Gen	Tip	Tm	Ürün (bp) büyüklüğü
A1F	ACTCTACTGCCCCYAGRCCACTG	+	VP1	A	60°C	218
O2F	CAAGTGYTGGCCCAGAAGG	+	VP1	O	61°C	322
BES	TTGACATGTCCTCCTGCATCT	-	2AB	Genus spesifik	60°C	
As1F	ACGGCGCTGTAAAGGCT	+	VP1	Asia-1	59°C	273

IUB nükleotid simgeleri (Y: C veya T ; R: A veya G)



Şekil 2.1. Araştırmada tasarımı yapılan primerlerin genomik lokalizasyonu

2.1.5. Şap Virusu Tip (A, O, Asia-1) Spesifik Hiperimmün Serumlar

Marazi maddede antijen tespiti ve tip tayini için uygulanacak indirekt sandwich ELISA' da kullanılan, şap virusu tiplerinin (A, O, Asia-1) inaktif antijenlerine karşı hazırlanmış tavşan hiperimmün serumları ile şap virusu spesifik kobay hiperimmün serumu, WRL'den temin edildi.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. İndirekt Sandwich ELISA

Çalışmada kullanılacak saha virus suşlarının serotip identifikasyonu amacıyla indirekt sandwich ELISA kullanıldı. Test, Roeder ve Le Blanc Smith, (1987) tarafından bildirilen yöntemine göre yapıldı. Testte pozitif kontrol olarak (O1 Man 69, A22 Iraq, A96 ve Asia-1 Shamir) kullanıldı.

Bu amaçla, bir gece öncesinden tip (A, O, Asia-1) spesifik tavşan hiperimmün serumları ile kaplanmış ELISA tableti PBS ile yıkanıp kurutulduktan sonra tanı materyalleri, her bir tip için spesifik antikor ile kaplı üçer göze olacak şekilde, tabletin uygun gözlerine konuldu. Daha sonra 37°C' de 1 saat inkübasyonu takiben, tüm gözlere şap virusu spesifik poliklonal kobay hiperimmün serumu konularak, tabletler tekrar inkübasyona bırakıldı. Daha sonra tüm gözlere horse-radish peroxidase (HRPO) ile işaretli konjugat (anti kobay IgG, DAKO, P0141) titresi oranında sulandırılarak ilave edildi ve inkübasyonu takiben substrat (Orthophenilamediamine, Amresco, J348-50T) ilavesinden 15-20 dk. Sonra 1.25 M sülfirik asit ile reaksiyon durduruldu. Sonuçlar 492 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Versamax) olarak okundu. Elde edilen üç göz OD değerlerinin ortalaması 0.1 ve üzeri olanlar tip spesifik şap virusu olarak değerlendirildi.

2.2.2. Virus İzolasyonu

Multipleks RT-PCR' ın hücre kültürlerinde pasajlanmış farklı pasaj aşamasına ait pasaj sıvılarında etkinliğini araştırmak üzere, indirekt ELISA'da negatif sonuç veren tanı materyallerinin 65 adedi BHK-21 hücre kültüründe pasajlandı.

Bu amaçla, 1 gr. dil epiteli veya kalp dokusu steril bir havan içerisinde steril kum ile ezildi. 9 ml. PBS ile homojenize edildi. 3000 rpm. de 30 dk. santrifüj edildi.

Üstteki supernatant alınarak 0.45 µm ve 0.20 µm' lik filtrelerden geçirildi ve hemen kullanılmayacaksa etiketlenerek bir sonraki işleme kadar -70°C' de saklandı.

Hazırlanan izolasyon materyalleri monolayer üreme gösteren BHK-21 Ank 31 hücre kültürüne (1 ml/25 cm² hücre kültürü şişesi) inokule edilerek, 37°C' de 1 saat adsorbsiyona bırakıldı. Bu süre sonunda 5 ml G-MEM virus üretme vasatı ilave edilerek, 37°C' de inkübasyona bırakıldı. Hücre kültürleri inkübasyon süresince sitopatik etki (CPE) ve pH değişiklikleri yönünden kontrol edildi. CPE (yaklaşık %75-80) görülen hücre kültürleri -20°C' ye kaldırıldı. 1-2 saat sonra çözündürülüp, +4°C 'de 3000 rpm. de 30 dk. süreyle santrifüj edildi. Üstteki sıvı kısım alınarak hemen kullanılmayacaksa etiketlenerek bir sonraki işleme kadar -70°C' de saklandı.

2.2.3. RT-PCR

Bu çalışmada, saha materyallerinde şap virusu A, O ve Asia-1 tiplerinin tanısı ve tiplendirilmesi amacıyla tasarlanan primerler kullanılarak, monopleks RT-PCR bileşen ve ısısal döngü cihazı reaksiyon koşullarının optimizasyonu ile RT-PCR protokollerinin (45 adet saha materyali ve 15 adet şap virusu Asia-1 tipi arşiv epiteline monopleks ve tüm tanı materyallerine multipleks RT-PCR) geliştirilmesi ve mono ve multipleks RT-PCR için benzer RT-PCR protokolü koşullarının kullanılabilirliği incelendi.

2.2.3.1. RNA Ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonu iki farklı RNA ekstraksiyon metodunu (Guanidium izotiyosiyanat ve spin kolon teknolojisi) kullanan 3 farklı RNA ekstraksiyon kiti kullanılarak yapıldı. Bu amaçla kullanılan Trizol-Tritidy-G, (Applichem, Kat. No. A4051), RNaeasy mini kit-(Qiagen, Kat. No. 74104) ve Ultraclean Tissue RNA (Mobio, Kat. No. 15000-50) RNA ekstraksiyon kitleri ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçların karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesine göre, çalışma materyellerinin ekstraksiyonunda Chomczynski ve Sacchi, (1987) tarafından geliştirilen metot kullanıldı.

Bu amaçla, TRIzol (Fenol/Guanidyum İzotiyosiyanat) ve tanı materyali (saha materyali veya hücre kültürü sıvısı) 1.5 ml. lik Eppendorf tüpüne 500 µl alınarak vorteksle karıştırıldı. 10 dk. oda ısısında bekletildi. 150 µl kloroform–izoamil alkol (24/1)’ den 150 µl karışıma eklendi. Vorteksle karıştırılarak 10 dk. oda ısısında bekletildi ve 8000 rpm. de 10 dk. santrifüj edildi. Üstteki faz dikkatli bir şekilde alınarak 1.5 ml’ lik RNase içermeyen steril Eppendorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 750 µl %80 isopropil alkol (-20°C’de saklanan) eklendi ve vorteksle karıştırılarak 14.000 rpm. de 15 dk. santrifüj edildi. Üstteki kısım pelete zarar verilmeden dikkatli bir şekilde boşaltıldı. Daha sonra RNA peletine 750 µl %70 lik etil alkol (-20°C’ de saklanan) eklenerek, 14.000 rpm. de 10 dk. santrifüj edildi. Üstteki alkol fazı dikkatli bir biçimde boşaltılarak, pelet 37°C’ lik etüvde 10-15 dk. kurumaya bırakıldı. Pelet 45-50 µl RNase içermeyen su ile resüspanse edilerek, kısa süreli santrifüjden sonra üzerine RNA, virusun ismi ve tarih yazılıp kullanılıncaya kadar -70°C’ de saklandı.

2.2.3.2. Primer Tasarımı

Şap virusu kapsitinin 1D (VP1) bölgesi özellikle de VP1’ in karboksi terminal ucu virusun antijenik anlamda en değişken kısmıdır. Serotip ve alt tip farklılıklarının bu bölgede oluşan amino asit farklılıklarından kaynaklandığı bildirilmiştir (Cheung ve ark., 1983; Grubman, 1987 ve ark; Pattnaik ve ark., 1997). Bu nedenle çalışmada tiplendirme için en uygun bölgelerin VP1 bölgesinde değişken kısımlar olduğuna karar verildi. Primer tasarımı için tiplendirme amaçlı sekans veritabanı kurulurken bu bölge hedef alındı.

Primer tasarımında gerek web tabanlı ücretsiz-serbest kullanımlı (Primer Premier, Primer 3) ve gerekse lisanslı (MacVector) programlar kullanıldı. Çeşitli bilgisayar programları (ClustalW) aracılığıyla birbiriyle karşılaştırılan (alignment) sekanslar konsensus sekans verileri haline getirildi. Bu sekans verileri aracılığıyla tasarlanan primerler monopleks veya multipleks RT-PCR’da kullanım etkinlikleri (primer erime sıcaklıkları, çapraz reaksiyon oluşturma özellikleri, vb.) açısından araştırıldı. Daha sonra internet ortamında gen bankasına girilen diğer şap virusu sekansları ile karşılaştırıldı (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.2.3.3. Viral RNA' nın Reverz Transkripsiyonu (cDNA sentezi)

Çalışmanın reverse transkripsiyon aşamasında RNA'nın yapısında bulunan sekonder yapıların düzleştirilerek RNA'nın komplementlerinin oluşumunda uygun biçime getirilmesi için yüksek sıcaklıklarda stabilitesini koruyan RT enzimi olarak Avian Myeloblastosis Virus (AMV) enzimi seçildi. RT primeri olarak bu çalışmada tasarımı yapılan şap virusu genus spesifik primer kullanılmasına karar verildi. Buna göre Sambrook ve ark, (1989)' nın AMV enzimi için önerdiği metot modifiye edilerek aşağıda verilen RT protokolü kullanıldı.

Primer (BES) (10µM)	2.0 µl
RNA	5 µl

Primer ve RNA belirtilen miktarlarda PCR tüplerine alınarak kısa süreli santrifüj edildi ve ısısal döngü cihazında 65°C' de 5 dk inkübasyona bırakıldı.

Steril bir Eppendorf tüpüne aşağıda gösterilen karışım hazırlandı.

10 mM dNTPs	0.50 µl
5× RT Buffer	4 µl
DTT	0.50 µl
AMV Reverse Transcriptase (10 U)	0.50 µl
RNasin (20U)	0.50 µl
DEPC-H ₂ O	7 µl
Toplam reaksiyon hacmi	20.00 µl

Isısal döngü cihazında 50°C' de 60 dk. ve 85°C' de 5 dk. inkübasyona bırakılarak cDNA elde edildi. Ürün etiketlenerek bir sonraki işleme kadar -20°C' de saklandı.

2.2.3.4. RT- PCR (mono/multipleks) Optimizasyonu

RT-PCR reaksiyonlarının (mono/multipleks) optimizasyonu amacıyla, Henagariu, 1997; Mcpherson, 2000; Grindharan ve ark., 2005 tarafından bildirilen öneriler dikkate alınarak primer bağlanma sıcaklığı, primer, magnezyum ve dNTPs konsantrasyonları ile döngü süreleri üzerinde optimizasyon çalışmaları yapıldı.

Primer bağlanma/annealing sıcaklığı (Ta): Araştırmada tasarımı yapılan primerlerin erime sıcaklıkları dikkate alınarak dört farklı (55, 56, 59, 60°C) bağlanma sıcaklığı araştırıldı.

Primer konsantrasyonları: Belirlenen primer bağlanma sıcaklığında farklı primer konsantrasyonları incelendi. Bu amaçla farklı (50, 25 ve 10 µM) primer konsantrasyonlarının RT-PCR etkinliği araştırıldı.

Magnezyum klorür konsantrasyonu: Belirlenen annealing sıcaklığı ve primer konsantrasyonunda farklı (1.5, 2, 2.5 ve 3 mM) MgCl₂ konsantrasyonlarının etkinliği araştırıldı.

dNTP konsantrasyonu: Belirlenen annealing sıcaklığı, primer ve MgCl₂ konsantrasyonu için farklı (75, 100 ve 200 µM) dNTP konsantrasyonlarının etkinliği araştırıldı.

Isısal döngü cihazı döngü sayısı: Amplifikasyon koşullarının optimizasyonu için 30 ve 40 döngülük amplifikasyonlar denendi.

2.2.3. 5. PCR Ürün Eldesi

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda steril bir Eppendorf tüpünde aşağıda gösterilen PCR karışımı hazırlandı.

	Konsantrasyon	Miktar (μ l)
25 mM MgCl ₂	3 mM	3.00
10 mM dNTPs	200 μ M	0.50
10 X PCR Buffer	1x	2.50
primer 1 A	(10 μ M)	1.00
primer 2 O	(10 μ M)	1.00
primer 3 Ortak	(10 μ M)	2.00
Hot Start Taq DNA polymerase (5 U/ μ l)	1.25 U	0.25
cDNA		2.00
DEPC-H ₂ O		12.75
TOPLAM		25.00

Hazırlanan karışım ve cDNA aşağıda verilen ısısal döngü cihazı koşullarında PCR reaksiyonuna alındı.

1. 94 °C	15 dk	
2. 94 °C	1 dk	} 30 siklus
3. 59 °C	1 dk	
4. 72 °C	2 dk	
72 °C	5 dk	

İnkübasyonu takiben ürünler hemen kullanılmayacaksa bir sonraki işleme kadar -20°C' de saklandı.

2.2.3.6. Geliştirilen RT-PCR Tekniğinin Sensitivitesinin Belirlenmesi

Bu amaçla Grindharan ve ark (2005) önerdiği metot dikkate alınarak sensitivite denemesi yapıldı. DKID₅₀ düzeyleri belirlenen A, O ve Asia-1 tipi şap viruslarının 10 katlı dilusyonları (10^{-1} , 10^{-2} , ..., 10^{-7}) kadar hazırlanarak hem virus izolasyonu amacıyla BHK-21 hücre kültürlerinde inokule edildi; hem de ELISA ve geliştirilen RT-PCR reaksiyonlarında (monopleks ve multipleks) kullanıldı.

2.2.3.7. Geliştirilen RT-PCR Tekniğinin Spesifitesinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan primerlerin spesifikliğini kontrol etmek amacıyla (Frederick Loeffler Institute, Insel-Riems, Almanya) Dr.Bernd Hoffman'dan ve WRL'den sağlanan şap hastalığı ile karışan çeşitli hastalık etkenleri RNA'ları optimize edilen RT-PCR reaksiyonunun spesifitesinin araştırılması amacıyla kullanıldı (Çizelge. 2.2)

Çizelge. 2.2.1. Spesifite analizinde kullanılan viruslar

Virus	Coğrafik Orijin	Tarih	Referans
SAT2	Sudan	1/2007	WRL (İngiltere)
SAT1	Kenya	1/2005	WRL
SWD	İtalya	1/2006	WRL
VSV	Indiana ve New Jersey		FLI (Almanya)
BVD	Strain Moredun		FLI
BT	Serotip 4, 9, 16		FLI

2.2.3.8. PCR Ürününün Görüntülenmesi

0. 45 gr. agaroz 1X TBE ile 30 ml'ye tamamlanıp, ısı ile eritilerek % 1.5' luk agaroz jel hazırlandı. Bu işlem sonunda agaroz jel 45°C'ye kadar soğutulmaya bırakıldı ve stok ethidium bromid (5 mg/μl) her 10 ml için 1 μl ilave edilerek, final konsantrasyonu 0.5 μg/ml olacak şekilde agaroz jel hazırlandı. Hazırlanan agaroz jel elektroforez tankına döküldü ve tarak jele yerleştirilerek yüzeyin düzgün şekil alması ve jelin donması için 15 dk. beklendi. Bu işlem sonunda jel üzerine 1X TBE eklenerek tarak jelden alındı. Her tanı materyali için 1μl 6X yükleme tamponu üzerine 5 μl PCR ürünü ilave edilerek, 5'er μl oluşan gözlere aktarıldı. Daha sonra 1 μl moleküler ağırlık markerı, 1 μl yükleme tamponu ve 4 μl H₂O ile karıştırılarak jelin uygun gözüne aktarıldı. Elektroforez 20 dk. 100 volt koşullarında gerçekleştirdi ve görüntüleme cihazı (Kodak Gel Logic 1500) ile bantlar kontrol edilerek, jelin fotoğrafı çekildi.

3. BULGULAR

Bu çalışmada, Türkiye’de şap virusunun saha materyallerinde multipleks RT-PCR ile tanısı ve tip ayrımı ilk kez gerçekleştirilmiştir.

3.1. İndirekt Sandwich ELISA

Araştırmada test edilen şap enfeksiyonu yönünden şüpheli toplam 287 adet tanı materyalinin, ELISA ile 54 (%18.8) adedi O, 70 adedi (%24.3) A ve 7 adedi (%2.4) Asia-1 serotipi olarak identifiye edildi. 156 adedi ise ELISA ile negatif olarak saptandı. ELISA pozitifliğin orijinlerine göre dağılım oranları incelendiğinde, O tipinde %68.5’ inin direkt saha materyali, %31.4’ünün BHK-21 pasaj sıvısı örneği olduğu saptandı. Benzer şekilde A tipi ELISA pozitiflik dağılımlarında %57.1’ in direkt saha ve %42.8’ inin ise hücre kültürü pasaj sıvısına ait olduğu görüldü. Asia-1 tipinde saptanan %2.4 pozitiflik ise tamamen saha materyallerine ait idi. ELISA negatifliğin orijinlerine göre dağılımı ise %88.4’ ünün direkt saha materyali, %11.5’ inin BHK-21 pasaj sıvısı örneği şeklinde oldu. İndirekt Sandwich ELISA ‘ya ilişkin sonuçlar Çizelge 3.1.’de verildi.

Çizelge 3.1. İndirekt Sandwich ELISA Sonuçları

	Serotip	ELISA SONUÇ (%)	
ELISA POZİTİF		S	P
	O	37 (68.5)	17 (31.4)
	A	40 (57.1)	30 (42.8)
	Asia-1	7	-
	Toplam (131)	84 (64.1)	47 (35.8)
ELISA NEGATİF	Toplam (156)	138 (88.4)	18 (11.5)

S: Saha materyeli

P: BHK-21 hücre kültürlerinde virus izolasyonu yapılan pasaj sıvısı

3.2. Virus izolasyonu

BHK-21 hücre kültürlerinde virus izolasyon çalışmasına alınan 65 adet tanı materyalinin %67.6' sı (21/65) 1-4. pasaj aşamalarında CPE oluşturdu. İzolasyon çalışmasına alınan materyallerin tümüne ait pasaj sıvıları ELISA ve multipleks RT-PCR için kullanıldı.

3.3. RT-PCR

3.3.1. RNA Ekstraksiyonu

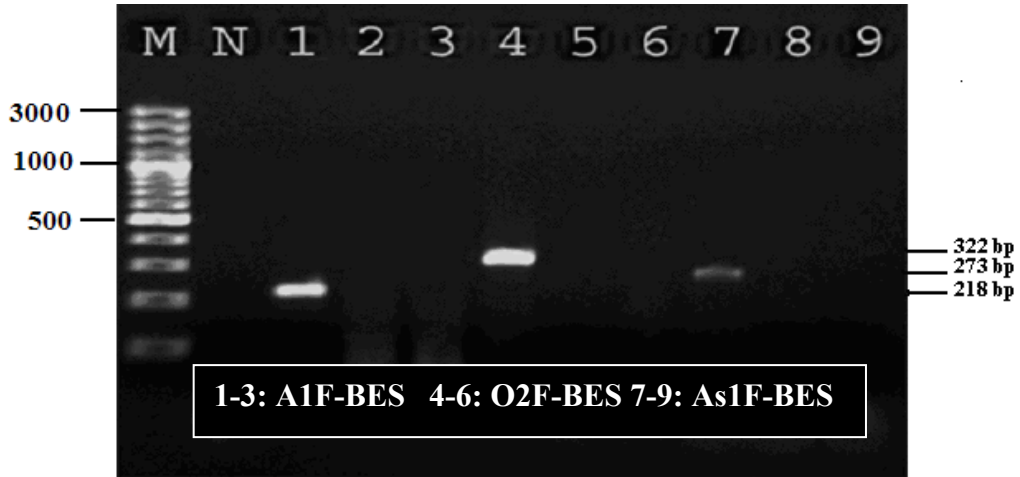
RNA ekstraksiyon aşamasına ilişkin olarak 2 farklı RNA ekstraksiyon metodunu (Guanidium izotiyosiyanat ve spin kolon teknolojisi) kullanan 3 farklı RNA ekstraksiyon kiti (Trizol-TridityG Applichem, RNaeasy mini kit-Qiagen ve Ultaclean Tissue RNA ekstraksiyon kiti-Mobio) karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmaya ilişkin RNA saflığı (260/280) ve total RNA konsantrasyon sonuçları Çizelge 3.2' de verilmiştir. Yapılan çalışma sonucuna göre klasik fenol-kloroform (Trizol) ekstraksiyonu temeline dayalı metotta, RNA saflıkları Trizol ve Qiagen metotlarında Mobio kitine göre daha yüksek bulundu. Ayrıca Trizol metodunun diğer metotlara (spin kolon teknolojisini kullanan ticari kit) göre daha ekonomik olması nedeni ile çalışmada RNA ekstraksiyonunda Trizol kullanılmasına karar verildi. Elde edilen verilere göre çalışmada Chomczynski ve Sacchi, 1987 tarafından bildirilen klasik fenol-kloroform metodu tercih edildi.

Çizelge 3.2. Farklı RNA ekstraksiyon metotlarında RNA saflığı ve konsantrasyonları

Tanı materyali	RNA konsantrasyonu (ng/μl) / RNA saflığı 260/280		
	Trizol	Mobio	Qiagen
1	172,1/ 1,98	39/ 1,97	10,7/ 1,92
2	17,2/ 1,85	8,2/ 1,57	1,5/ 1,23
3	74,2/ 1,95	9,6/ 1,88	3,2/ 1,79
4	55,8/ 1,82	11,7/ 1,73	3,4/ 2,66
5	27,8/ 1,52	19,3/ 1,79	5,5/ 1,65

3.3.2. Primer Tasarımı

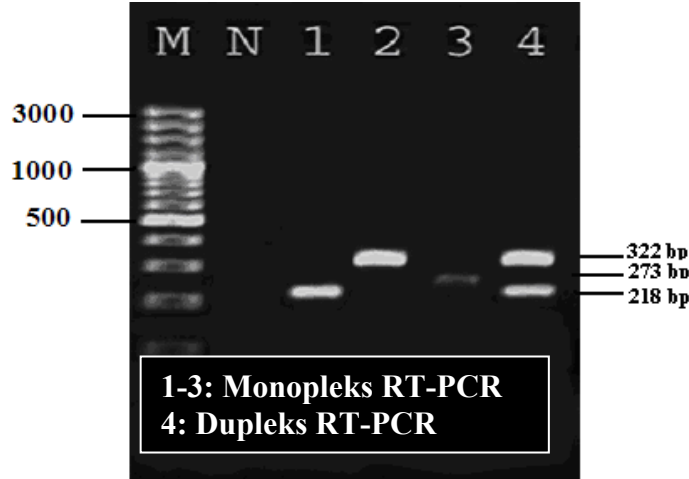
Bu araştırma kapsamında tasarımı yapılan şap virusu serotiplerine spesifik primerler genomun 1D bölgesinden, genus spesifik ortak primer ise genomun 2AB bölgesinden tasarlanarak öncelikle monopleks RT-PCR’da çalışma uyumları, tekrarlı olarak çapraz reaksiyon vermeleri ve saha materyallerindeki başarıları gibi faktörler açısından gözden geçirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda multipleks RT-PCR’a uygun olduğu saptanan sözkonusu primerler şap virusu A, O ve Asia-1 tipi idendifikasyonunda sırasıyla 218 bp, 322 bp ve 273 bp büyüklüğünde PCR ürünü elde edildi. Monopleks RT-PCR’da her bir primer A, O, Asia-1 tip referans viruslar ile çapraz reaksiyon vermeleri açısından incelendiğinde, tipler arasında bir interaksiyon gözlenmedi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Tasarlanan primerlerin farklı şap virusu serotipleri ile RT-PCR sonuçları

M. 100 bp DNA Merdiveni (Fermentas, Litvanya). N: Negatif Kontrol Hat 1-3. A primeri ve genus spesifik primer ile referans RT-PCR pozitif şap virusu A, O, Asia serotipi RNA’ları Hat 4-6: O primeri ve genus spesifik primer ile referans RT-PCR pozitif şap virusu O, A, Asia serotipi RNA’ları Hat 7-9 Asia primeri ve genus spesifik primer ile referans RT-PCR pozitif şap virusu Asia, O, A serotipi RNA’ları

Daha sonra primerler dupleks ve tripleks RT-PCR reaksiyonlarında kullanılabilirlikleri açısından incelendi. Dizayn edilen primerler ile ilgili oluşturulan RT-PCR çalışmalarına ilişkin sonuçlar Şekil 3.2.’de verilmiştir.



Şekil 3.2. Tasarlanan primerler ile referans şap virusu serotiplerinin monopleks ve multipleks (dupleks) RT-PCR sonuçları

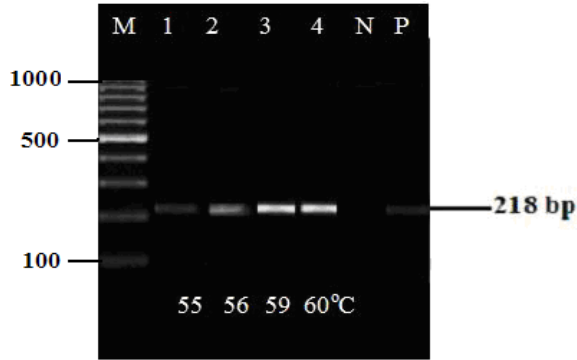
M. 1. 100 bp DNA Merdiveni (Fermentas, Litvanya). N: Negatif Kontrol, Hat 1-3: Tasarımı yapılan A, O ve Asia-1 primerleri ve genus spesifik primer ile referans RT-PCR pozitif şap virusu A, O, Asia-1 tipi RNA'ları monopleks RT-PCR test sonuçları Hat 4: Tasarlanan O, A tipi ve genus spesifik primerler ile referans RT-PCR pozitif Şap virusu O ve A serotipi RNA'ları multipleks RT-PCR test sonuçları

Bu araştırmada in siliko analizlerde RT-PCR'da Asia-1 için tasarlanan primerler multipleks (tripleks) RT-PCR'da kullanılmaya uygun bulunmasına rağmen in vitro laboratuvar çalışmaları sonucunda multipleks RT-PCR'da saha tanı materyallerinde diğer primerler ile hafif derecede önceden tahmin edilmeyen interaksyonlar oluşturdu. Gerek bu nedenle ve gerekse Türkiye'de sadece A ve O tipleri mevcut olduğu için bu araştırma kapsamına giren 272 örnek A1F (forward), O2F (forward), şap virusu spesifik ortak primer BES (reverse) primeri ile A, O multipleks RT-PCR reaksiyonuna ve 15 adet arşiv şap virusu Asia-1 tipi örneği ise dizayn edilen en uygun Asia-1 primeri (As1F) ile monopleks RT-PCR reaksiyonuna alındı.

3.3. 3. RT-PCR (mono/multipleks) Optimizasyonu

RT-PCR optimizasyonu amacıyla primer bağlanma sıcaklığı, $MgCl_2$, primer ve dNTPs konsantrasyonları, öncelikle monopleks RT-PCR için belirlendi. Daha sonra aynı optimizasyon faktörlerinin multipleks RT-PCR için de uygunluğu incelendi.

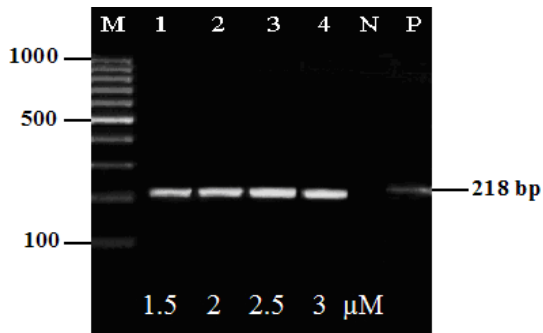
Primer Bağlanma sıcaklığı (T_a): Primer bağlanma sıcaklığının araştırıldığı çalışma sonucuna göre, incelenen tüm T_a derecelerinde (55, 56, 59 ve 60°C) spesifik bant elde edildi. Ancak en iyi bant yoğunluğu 59°C ve 60°C gözlemlendiğinden ve primerlerin spesifitesini artırmak için çalışmada 59°C primer bağlanma sıcaklığı kullanılmasına karar verildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında RT-PCR sonuçları

M. 1. 100 bp DNA Merdiveni (Fermentas, Litvanya), Hat 1-4: Çeşitli primer bağlanma sıcaklıklarında RT-PCR test sonuçları Hat N: Negatif Kontrol Hat P: A tipi Pozitif Kontrol

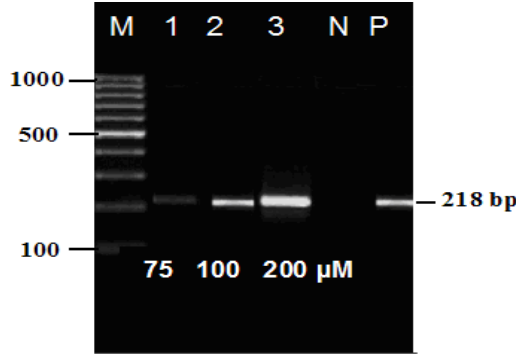
Magnezyum klorür konsantrasyonu: Belirlenen primer bağlanma sıcaklığında farklı magnezyum klorür konsantrasyonunun (1.5, 2, 2.5 ve 3mM) araştırıldığı çalışma sonucuna göre, RT-PCR sonuçları arasında belirgin bir fark gözlenmediğinden ekonomik olması açısından 1.5mM magnezyum klorür konsantrasyonu seçildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında çalışılan RT-PCR sonuçları

M. 1. 100 bp DNA Merdiveni (Fermentas, Litvanya), Hat 1-4: Çeşitli $MgCl_2$ konsantrasyonlarında RT-PCR test sonuçları Hat N: Negatif Kontrol Hat P: A tipi Pozitif Kontrol

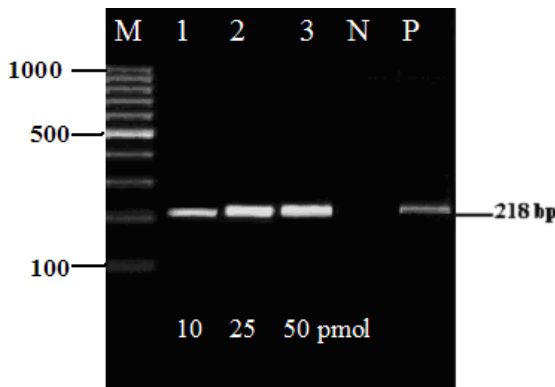
dNTP konsantrasyonu: Farklı dNTP konsantrasyonunun (75, 100 ve 200 μ M) incelendiği çalışma sonucuna göre, en iyi bant yoğunluğu 200 μ M dNTP konsantrasyonunda gözleendiğinden çalışmada 200 μ M dNTP konsantrasyonu kullanılmasına karar verildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Farklı dNTP konsantrasyonlarında çalışılan RT-PCR sonuçları

M. 1. 100 bp DNA Merdiveni (Fermentas, Litvanya), Hat 1-3: Çeşitli dNTP konsantrasyonlarında RT-PCR test sonuçları Hat N: Negatif Kontrol Hat P: A tipi Pozitif Kontrol

Primer konsantrasyonu: Farklı primer konsantrasyonlarının (10, 25 ve 50 μ M) incelendiği RT-PCR sonuçları arasında belirgin bir fark gözlenmedi. Bu nedenle, 10 μ M primer konsantrasyonu kullanılması uygun bulundu. Reverse primer her iki tipte de ortak olduğundan reverse ortak primeri 20 μ M kullanılmasına karar verildi (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Farklı primer konsantrasyonlarında çalışılan RT-PCR sonuçları

M. 1. 100 bp DNA Merdiveni (Fermentas, Litvanya), Hat 1-3: Çeşitli primer konsantrasyonlarında RT-PCR test sonuçları Hat N: Negatif Kontrol Hat P: A tipi Pozitif Kontrol

Isısal döngü cihazı döngü sayısı: İncelenen döngü sayıları (30 ve 40) arasında belirgin bir fark gözlenmedi. Ancak test süresinin kısaltılması açısından, 30 döngü kullanılmasına karar verildi.

3.3.4. Monopleks RT-PCR Sonuçları

Şap Enstitüsü dil epitel arşivinden sağlanan ve Enstitü kayıtlarına göre Asia-1 yönünden pozitif olarak saptandığı bildirilen 15 adet tanı materyalinin ELISA’da 7 adedi pozitif, monopleks RT-PCR’da ise 8 adedi pozitif olarak saptandı.

3.3.5. Multipleks RT-PCR sonuçları

272 adet şap virusu A ve O tipi örneğine ilişkin multipleks RT-PCR sonucu ELISA testi sonuçları ile karşılaştırmalı olarak Çizelge 3.3’ de verildi.

Çizelge 3.3. Multipleks RT-PCR tiplendirme sonuçları

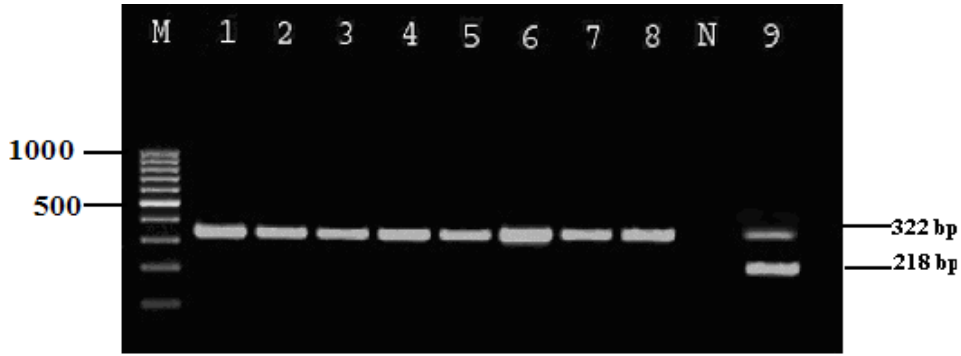
Tipi (adet)	ELISA pozitif örnek				ELISA negatif örnek			
	mRT-PCR pozitif		mRT-PCR negatif		mRT-PCR pozitif		mRT-PCR negatif	
	S	P	S	P	S	P	S	P
O (131)	32	14	5	3	38	9	28	2
A (141)	37	29	3	1	46	6	18	1
TOPLAM (272)	69	43	8	4	84	15	46	3

S: Saha materyali

P: BHK-21 hücre kültürlerinde virus izolasyonu yapılan pasaj sıvısı

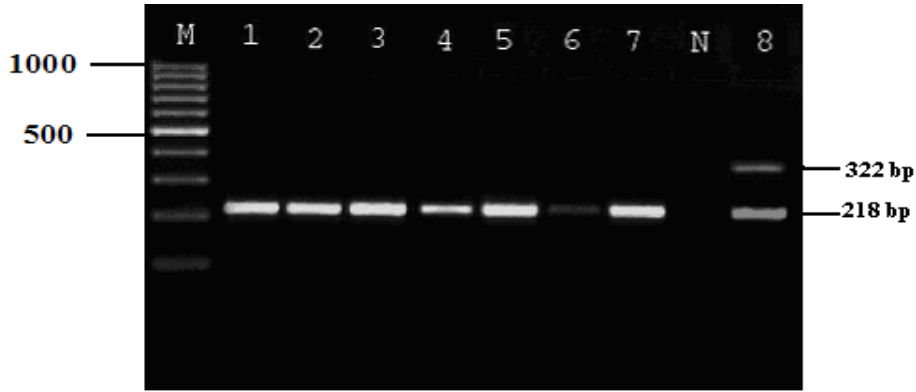
Çizelge 3.3.’de bildirilen multipleks RT-PCR ve ELISA ile ilgili pozitiflik oranları ve sonuçlarının istatistiki analizi “3.4 İstatistiki Analiz” bölümünde ayrıntılı olarak sunuldu.

Çeşitli saha materyaline ait multipleks RT-PCR ile yapılan çalışma sonuçları sırasıyla O ve A tiplerine göre Şekil 3.7 ve 3.8’ de verildi.



Şekil 3.7. O tipi saha materyali multipleks RT-PCR sonuçları

M. 1. 100 bp DNA Merdiveni (Fermentas, Litvanya), Hat 1-8: ELISA ile pozitif olarak saptanan O saha materyalleri ile multipleks RT-PCR test sonuçları Hat N: Negatif kontrol Hat 9: O ve A tipi pozitif kontrol (deneysel enfeksiyon A ve O serotipleri WRL orijinli referans viruslar ile)



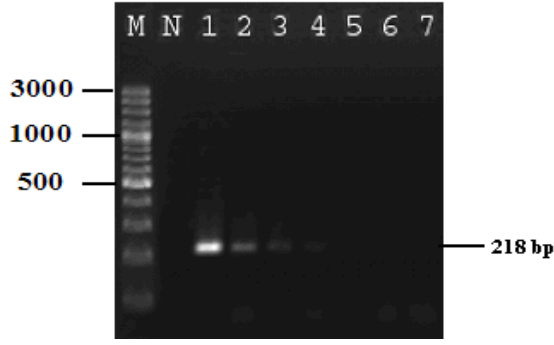
Şekil 3.8. A tipi saha materyali multipleks RT-PCR sonuçları

M. 1. 100 bp DNA Merdiveni (Fermentas, Litvanya), Hat 1-7: ELISA ile şap virusu pozitif olarak saptanan A tipi saha materyalleri ile multipleks RT-PCR test sonuçları. Hat N: Negatif kontrol Hat 8: O ve A tipi pozitif kontrol (deneysel enfeksiyon A ve O serotipleri WRL orijinli referans viruslar ile)

3.3.6. Analitik Sensitivite Sonuçları

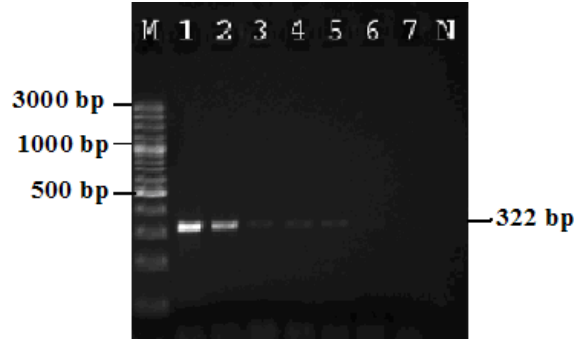
3.3.6.1. RT-PCR Sensitivite Sonucu

A tipi için 4 log₁₀, O tipi için 5 log₁₀ ve Asia-1 tipi için 2 log₁₀ basamağı sulandırılmalar boyunca spesifik DNA ürünü elde edildi. Bu çalışmaya ilgili RT-PCR sonuçları Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11’de gösterildi.



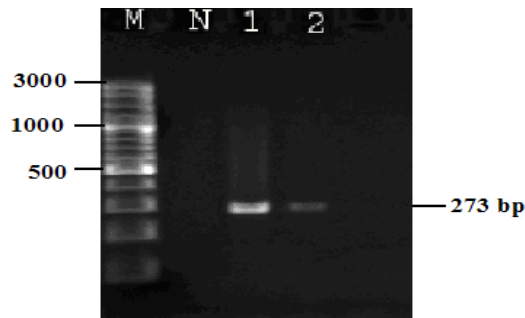
Şekil 3.9. Şap virusu A tipinde multipleks RT-PCR analitik sensitivite sonucu
(Şap virusu A tipinde $DKID_{50}$: $10^{-7.5}/ml$)

M. 1.100 bp DNA Merdiveni (Fermentas, Litvanya), Hat N: Negatif Kontrol Hat 1-6: A tipi şap virusu (A22Irak) sulandırılmaları (sırasıyla 10^{-1} , 10^{-2} , ..., 10^{-7}).



Şekil 3.10. Şap virusu O tipinde multipleks RT-PCR analitik sensitivite sonucu
(Şap Virus O tipinde $DKID_{50}$: $10^{-7.75}/ml$)

M. 1. 100 bp DNA Merdiveni (Fermentas, Litvanya), Hat N: Negatif Kontrol Hat 1-6: O tipi şap virusu (O1 Man 69) sulandırılmaları (sırasıyla 10^{-1} , 10^{-2} , ..., 10^{-7}).



Şekil 3.11. Şap virusu Asia-1 tipinde monopleks RT-PCR analitik sensitivite sonucu

(Şap Virus Asia-1 tipi $DKID_{50}$: $10^{-7.5}/ml$)

M. 1. 100 bp DNA Merdiveni (Fermentas, Litvanya), Hat N: Negatif Kontrol Hat 1-2: Asia-1 tipi şap virusu (Asia-1 Shamir) sulandırılmaları (sırasıyla 10^{-1} , 10^{-2} , ..., 10^{-7}).

3.3.6.2. ELISA Sensitivite Sonucu

Multipleks RT-PCR sensitivitesini belirlemek için dilusyonları yapılan aynı virus sulandırılmaları ELISA testine alındığında O tipinde 10^{-2} , A tipinde 10^{-2} ve Asia-1 tipinde 10^{-1} sulandırma basamaklarına kadar pozitif sonuç verdi. Bu sonuçlara göre indirekt ELISA analitik sensitive sonuçlarının RT-PCR sonuçlarına göre daha düşük düzeyde olduğu belirlendi.

3.3.7. Multipleks RT-PCR Spesifitesi

Spesifite analizinde kullanılan Çizelge 2.2.' de bildirilen virus RNA'ları da optimize edilen RT-PCR reaksiyonuna alındı. Bu çalışmada tasarımı yapılan primerler ile sözkonusu virus RNA'ları kullanılarak yapılan multipleks RT-PCR çalışmaları sonucunda, spesifik DNA ürünü tespit edilmediğinden tasarımı yapılan primerlerin şap virus serotiplerine özgül olduğu sonucuna varıldı.

3.4. İstatistik Analiz

Bu çalışmada geliştirilen multipleks RT-PCR tekniğinin diagnostik sensitivite ve spesifitesini belirlemek için öncelikle test uyumlarının saptandığı ön istatistik çalışma yapıldı. Bu çalışmaya göre, ELISA ve multipleks RT-PCR testi orta derecede (Kappa 0,20) uyumlu bulunurken, multipleks RT-PCR ve monopleks RT-PCR testi önemli derecede (Kappa 0,73) uyumlu bulundu. Bu nedenle multipleks RT-PCR tekniğinin diagnostik sensitivite/spesifitesinin belirlenmesinde karşılaştırmada monopleks RT-PCR tekniği seçildi.

Bu amaçla, bildirilen başlangıç materyali içinden RT-PCR diagnostik sensitivite/spesifitesinin belirlenmesi amacıyla yapılacak monopleks RT-PCR'da kullanılacak 45 örnek, indirekt ELISA test sonuçları dikkate alınarak belirlendi. Monopleks RT-PCR sonucunda 38 adet, multiplex RT-PCR sonucunda ise 39 adet pozitif örnek saptandı.

Bu çalışmanın sonucunda geliştirilen multipleks RT-PCR tekniğinin monopleks RT-PCR'a göre araştırma genelinde tip ayrımı olmaksızın diagnostik sensitivitesi %95 ve spesifitesi % 84 olarak tespit edildi.

Araştırmada geliştirilen multipleks RT-PCR tekniği ve ELISA pozitiflik oranları (%) Çizelge 3.4.'de verildi.

Çizelge 3.4. Multipleks RT-PCR ve ELISA pozitiflik oranları (%)

Tanı materyali	Multipleks RT-PCR % pozitiflik (pozitif/toplam)	ELISA % pozitiflik (pozitif/toplam)	İstatistiki önemlilik
Toplam	%77.5 (211/272)	% 45.6 (131/287)	p<0.05
Saha	%73.9 (153/207)	%37.8 (84/222)	p<0.05
Pasaj	% 89.2 (58/65)	%72.3 (47/65)	p<0.05
A tip saha	%79.8 (83/104)	%38.4 (40/104)	p<0.05
A tip pasaj	% 94.5 (35/37)	%81.08 (30/37)	p>0.05
O tip saha	% 67.9 (70/103)	%35.9 (37/103)	p<0.05
O tip pasaj	%82.1 (23/28)	%60.7 (17/ 28)	p<0.05

Şekil 3.4'de bildirilen sonuçlara göre ELISA ve geliştirilen multipleks RT-PCR testi arasındaki % pozitiflik sonuçları, incelenen A ve O tipleri toplam tanı materyali ve sadece saha materyali açısından istatistiki olarak araştırıldığında iki test yüzde pozitiflik sonuçları arasında elde edilen fark, istatistiki açıdan önemli olarak tespit edildi (p<0.05). Pasajlanmış tanı materyali incelendiğinde ise O tipinde iki test arasındaki fark önemli (p<0.05) iken, A serotipinde istatistiki açıdan önemli bir fark belirlenmedi (p>0.05). Multipleks ve monopleks RT-PCR % pozitiflik sonuçları irdelendiğinde ise, multipleks RT-PCR %86.6 (39/45) ve monopleks RT-PCR %84.4 (38/45) arasında istatistiki açıdan belirgin bir fark bulunamadı (p>0.05).

4.TARTIŞMA

Şap virusunun hızlı tiplendirilmesi, Türkiye gibi hastalığın epidemik olduğu ülkelerde kısa sürede salgın orijininin belirlenmesinde ve dolayısıyla salgın yayılımının izlenmesi ve önlenmesinde; hastalığın görülmediği ülkelerde ise hastalık çıkışı halinde salgın orijininin belirlenmesine ilave olarak özellikle acil aşılama gerektiren durumlarda önemli katkı sağlamaktadır. Günümüzde rutin olarak şap virusunun tanı ve tiplendirmesinde indirekt sandwich ELISA, lezyonlu dil epiteli dokusundan hazırlanan süspansiyonda spesifik şap virusunun tespiti amacıyla kullanılmaktadır. Ancak ELISA'nın sensitivitesinin yeterince yüksek olmaması, doğrulanması için hücre kültürlerinde virus izolasyonuna gereksinim duyması, testin sonuçlanması için en az 24 saat süre gerekmesi ve tanı materyalinin gerek alınış ve gerekse transferi sırasında yapılan yanlış uygulamalar nedeniyle kalitesi azalabilen (şap virusu antijen inaktif) tanı materyalinden çalışma güçlüğüne bulunması gibi bir takım olumsuzlukları bulunmaktadır (Hamblin ve ark., 1984; Roeder ve Le Blanc Smith, 1987; Ferris ve Dawson, 1988; Kitching ve ark., 1989). Günümüzde şap virusunun tiplendirilmesini hızlandırmak amacıyla moleküler teknikler üzerinde durulmaktadır. Bunlardan biri olan multipleks RT-PCR, modifiye bir PCR tekniği olup, optimizasyonu iyi yapıldığında hem zaman hem de ekonomiden kazanç sağlar. Multipleks PCR tekniğinde öncelikle uygun primer tasarımının yapılması ve daha sonra PCR reaksiyon koşullarının iyileştirilmesi şeklinde bir strateji izlenmelidir.

Bu çalışmada, Türkiye'de ilk defa çalışma kapsamında tasarlanan primerler kullanılarak, şap virusunun tanı ve tiplendirilmesi için multipleks RT-PCR tekniği geliştirilmesi gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, RNA ekstraksiyonu için, 2 farklı RNA ekstraksiyon metodu kullanan 3 farklı RNA ekstraksiyon kiti ile alınan sonuçların doğrultusunda Chomczynski ve Sacchi, (1987) tarafından önerilen metodun kullanılmasına karar verilmiştir. Bu konuda yapılan bir çalışmada (Fanson ve ark., 2000), hepatitis C virus RNA ekstraksiyonu için spin kolon temeline dayalı bir kit ile klasik fenol-kloroform

izolasyonu karşılaştırılmış, çalışma sonucunda bu araştırmada elde edilen sonuca benzer olarak klasik fenol kloroform ekstraksiyonunun spin kolon kite göre daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir. Hepatitis A virus RNA ekstraksiyonuna ilgili bir diğer çalışmada ise (Ribao ve ark., 2004), önceki çalışmadan farklı olarak, spin kolon kit temeline dayalı kit klasik Trizol ekstraksiyonuna göre daha yüksek duyarlılıkta saptanmıştır.

RT-PCR sensitivite ve spesifitesi pek çok faktörden etkilenir. Kalıp RNA'nın yapısındaki mevcut sekonder ve tersiyer yapılar reverse transkripsiyon aşamasını olumsuz etkiler. Sekonder ve tersiyer yapıları atlayan primerler, delesyonlardan kurulu bir cDNA sentezler (Witwer ve ark., 2001; Peters ve ark., 2004) ve sonuçta kötü yapılanmış bir RT-PCR ürünü oluşur. Bunu önlemek için RT aşamasında yüksek sıcaklıklara çıkılarak bu yapıların uzaklaştırılması gerekmektedir (Fuchs ve ark., 1999, Peters ve ark., 2004). Bu amaçla bu çalışmada, yüksek sıcaklıkta stabilitesini koruyan AMV enzimi seçilmiştir. Sensitive artırmak için, yine şap virusu spesifik tüm tiplere ortak primer (genus spesifik) dizayn edilmiş ve kullanılmıştır (Rashtchian, 1994). Reverse transkripsiyon reaksiyonu ile elde edilen cDNA tek iplikçikli olduğundan çift iplikçikli bir DNA'ya göre non-spesifik primer bağlanmasına daha duyarlıdır (Missel ve ark., 2003). Bunun için çalışmada yüksek sıcaklıkta aktive olan hot start enzim kullanılmasına karar verilmiştir. Böylece ısısal döngü cihazının ilk ısınma evresi sırasında primerin yanlış hedefe bağlanması önlenerek nonspesifik reaksiyonların bir ölçüde engellenmesi sağlanmıştır.

Bu çalışmada, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde oluşan şap hastalık odaklarından Şap Enstitüsü'ne tanı amacıyla gönderilen enfekte sığır dil epitel tanı materyallerinden hazırlanan virus süspansiyonunun ELISA ile incelenmesi sonucunda toplam 287 adet örneğin 131'i (%45.6) FMDV 146S antijeni yönünden pozitif bulunmuştur. Grindharan ve ark (2005), yaptıkları çalışmada ELISA ile 181 adet örneğin 143 adedini (%79) FMDV yönünden pozitif bulmuşlardır. Reid ve ark (1998), ise %49.6 düzeyinde pozitiflik (80/161) tespit etmişlerdir. Reid ve ark'nın 2000 yılında yaptıkları bir başka çalışmada ise, sadece enfekte saha materyalini incelediklerinde %62' sinde ELISA ile pozitiflik tespit etmişlerdir. Bu araştırmada

ise ELISA ile incelenen toplam 222 adet saha materyali içerisinde 84 adedi (%37.8) pozitif tespit edilmiştir. ELISA negatif olduğu belirlenen ve değişik hücre kültürü pasaj aşaması sonrası test edilen 65 adet hücre kültürü pasaj materyalinden ise 47 adedi (%72.3) pozitif olarak saptanmıştır. Tez kapsamında sunulan bu çalışmada, ELISA test bulguları diğer araştırmacıların bulgularıyla farklılık göstermektedir. Bu çalışmada, ELISA ile diğer araştırmacıların bulgularına göre özellikle saha materyellerinde daha düşük düzeyde pozitiflik elde edilmiştir. Şap virusunun sahada klinik semptomlara göre tanısı laboratuvar testleriyle genelde uyumlu çıkmaktadır. Ancak klinik olarak şap enfekte olan hayvandan alınan tanı materyalinin çeşitli nedenlerle (yüksek çevre sıcaklığı, uygun transfer buffer kullanılmaması vs.) uygun alınmaması veya uygun olmayan koşullarda transferi, tanı materyalinin kalitesini düşürerek laboratuvarda uygulanan testlerin tanısız değerine etki etmektedir. Ayrıca testte kullanılan kimyasal ve biyolojik maddelerin niteliği, laboratuvar koşulları vb. nedenler de test sonuçlarını etkileyen muhtemel diğer önemli faktörlerdendir.

Multipleks RT-PCR testi Sambrook ve ark (1989), belirlediği yöntem modifiye edilerek gerçekleştirildi. Şap hastalığı odaklarından Şap Enstitüsü'ne gliserin isobuffer içerisinde gönderilen dil epitel örneklerinden izole edilen RNA' lara uygulanan multipleks RT-PCR testi sonucunda, incelemeye alınan toplam 272 (O ve A serotipleri) adet materyalin 211' ünde (%77.5) viral genetik materyal saptandı. Grindharan ve ark (2005) yaptıkları çalışmada klinik olarak şap hastalığı şüphesi gösteren hayvanlardan sağlanan 181 adet örneğin 165'inde (%91.1) multipleks RT-PCR testi ile FMDV RNA'sı saptamışlardır. Reid ve ark (2000) yaptıkları çalışmada direkt saha materyalinde %85 düzeyinde pozitiflik saptamışlardır. Bu çalışmada ise, incelenen toplam 207 adet direkt saha materyalinin multipleks RT-PCR'ı sonucunda 153 adedi (%73.9) A ya da O serotipi yönünden pozitif olarak saptanmıştır. Çalışma kapsamında incelenen 65 adet pasajlanmış tanı materyalinin ise, 58 (%89.2) adedi A ya da O serotipi yönünden multipleks RT-PCR ile pozitif olarak bulunmuştur.

Saha örnekleri ve pasaj sıvıları kullanılarak gerçekleştirilen multipleks RT-PCR ve ELISA tekniklerinin sonuçları karşılaştırıldığında, multipleks RT-PCR'da tespit edilen pozitiflik oranlarının ELISA'da tespit edilenden belirgin şekilde yüksek

olduğu saptanmıştır. Direkt saha materyallerinde ELISA ile %45.6 düzeyinde pozitif saptanmasına karşın multipleks RT-PCR’da bu oran %77.5 düzeyinde, pasaj örneklerinde ise ELISA pozitiflik oranı %72.3 iken multipleks RT-PCR’da %89.2 olarak bulunmuştur. Ayrıca ELISA ile A ya da O serotip için viral antijen saptanmayan 130 saha materyalinin 84 adedi (%64.6), multipleks RT-PCR ile pozitif bulunmuştur. Pasaj sıvılarından ise ELISA ile negatif olarak saptanan 18 adet tanı materyalinin 15 adedi (%83.3), multipleks RT-PCR ile pozitif olarak belirlenmiştir. Böylece toplamda ELISA negatif olan 148 adet örnek, %66.8 (99/148) düzeyinde multipleks RT-PCR ile pozitif olarak saptanmıştır..

Daha önce yapılan çalışmalar ve bu araştırmada VP1 geni hedef alınmasına karşın, tanımlanan primerlerinin ve RT-PCR protokollerinin farklılığı nedeniyle sonuçların karşılaştırmalı değerlendirilmesi güç olmaktadır. Genel olarak, ELISA ve PCR pozitiflik oranları (%) karşılaştırıldığında bu araştırmada ve daha önce bildirilen çalışmalarda (Reid ve ark., 2000; Grindharan ve ark., 2005) multipleks RT-PCR ile ELISA’ya göre daha yüksek pozitiflik saptanmıştır.

Bu çalışmada RT-PCR testinin tekrarlanabilirliğini doğrulamak için her bir örnek iki kez teste tabi tutuldu ve her iki testte de aynı sonuçlar alınmıştır.

RT-PCR testini etkileyen birden çok faktör (bazı dokularda RT-PCR’ı inhibe eden faktörlerin olması, RNA izolasyon yönteminin etkinliği, kullanılan enzimler, primerler, örnek kontaminasyonu vb.) bulunmaktadır. RNA, DNA’ya göre daha kırılgan yapıdadır. PCR reaksiyonuna alınacak RNA tanı materyallerinde risk teşkil eden en önemli faktör, RNA’yı parçalayan enzimlerin (RNase) varlığıdır. İyi kurulmamış laboratuvar ortamı, manipulasyon hataları veya saha materyalinin doğal yapısında bulunabilecek RNase enzimleri, RNA’yı parçalayarak RT-PCR ile teşhisi güçleştirmektedir (Mcpherson, 2000; Dieffenbach ve Dweksler, 2003). Şap virusunun RT-PCR ile başarılı bir şekilde teşhisinin, laboratuvara gönderilen örneklerin kalitesine bağlı olduğu bildirilmiştir (Reid ve ark., 1998). Bu çalışmada, Çizelge 3.2.’de bildirilen 12 adet (4 pasaj, 8 saha) tanı materyalinin ELISA pozitif sonuç verip, multipleks RT-PCR’da negatif sonuç vermesi, muhtemelen RNase

enzimleri nedeniyle yapısı bozulan RNA'nın, multipleks RT-PCR ile tespit edilememesinden kaynaklanmaktadır.

Şap virusunun multipleks RT-PCR ile tanısına yönelik birçok çalışma bulunmaktadır (Rasmussen, 2003; Jokela ve ark., 2005; Bao ve ark., 2008). Ancak tiplendirilmesine yönelik çalışmalar çok sınırlıdır. Şap virusu genomu üzerinde pek çok benzer bölge mevcut olduğundan, virusun tanısı amacıyla RT-PCR primeri tasarlamak, şap virusu serotiplerine spesifik primer tasarımıyla daha kolay olmaktadır. Çünkü tiplendirme amacıyla şap virusunun her üç tipinde farklılık gösteren bölgeler, yapısal proteinler bölgesinde olduğundan daha sınırlı bir alanda (yaklaşık 700 bp) uygun primeri aramak zorlaşmaktadır.

VP1 bölgesinin şap virusu suşları arasında görülen varyasyonların çoğundan sorumlu olduğu bilinmektedir (Cheung ve ark., 1983). Bu nedenle bu araştırmada daha çok VP1 üzerinden primer tasarımı yapılmıştır. Ortak primer tasarımı için ise, her 3 şap virusu tipi için benzer bir bölge olan 2AB seçilmiştir. Bu araştırmada, in siliko analizlerde Asia-1 tipi için tasarlanan primerler multipleks RT-PCR'da kullanılmaya uygun bulunmasına rağmen in vitro laboratuvar çalışmaları sonucunda multipleks RT-PCR'da diğer primerler ile hafif derecede önceden tahmin edilmeyen interaksiyonlar oluşturmuştur. Türkiye'de saptanan Asia-1 tipi için web tabanlı gen bankalarına gönderilen nükleotid dizi verilerinin yeterli olmamasının, bu sonucun muhtemel nedenlerinden olduğu düşünülmektedir. Callens ve Clercq (1997)'de yaptıkları çalışmada Asia-1 tipinin O ile interaksiyonlar verdiğini tespit etmişlerdir.

Bu araştırmada, multipleks RT-PCR optimizasyonu amacıyla primer bağlanma sıcaklığı, MgCl₂, dNTPs ve primer konsantrasyonları üzerinde çalışmalar yapılmıştır. İncelenen tüm primer bağlanma sıcaklıklarında spesifik bant elde edilmiştir. Ancak en iyi bant yoğunluğu 59 ve 60°C gözlemlendiğinden ve primerlerin T_mleri dikkate alınarak primer spesifikitesini arttırmak için çalışmada 59°C primer bağlanma sıcaklığı kullanılmasına karar verilmiştir. Tasarlanan primerlerin farklı olmasının doğal olarak belirlenecek primer bağlanma sıcaklığını değiştireceği bilinmektedir. Bununla birlikte Grindharan ve arkadaşları (2005), Reid ve arkadaşları (1999), tasarladıkları

primerleri kullanarak yaptıkları çalışmalarda A, O ve Asia-1 tipleri için benzer şekilde 58 ve 59°C'lerin uygun primer bağlanma sıcaklıkları olduklarını bulmuşlardır. Bu çalışmada belirlenen Ta derecesinde 1.5, 2, 2.5 ve 3mM MgCl₂ konsantrasyonlarının etkilerine bakıldığında, RT-PCR sonuçları arasında belirgin bir fark saptanmıştır. Bu nedenle, çalışmada ekonomik olması açısından 1.5mM MgCl₂ konsantrasyonu seçilmiştir (Resim 3.5). Bu araştırmada kullanılması önerilen MgCl₂, dNTPs ve primer konsantrasyonları ve döngü sayısı sonuçları değerlendirildiğinde, farklı primerler kullanılmasına karşın Grindharan ve arkadaşları (2005)'nin sonuçları ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Bu araştırmada tasarımı yapılan primerler multipleks RT-PCR tekniği için dikkatlice hazırlanmış, bu amaçla primerlerin in siliko olarak erime sıcaklıkları, her bir primerin kendi içinde ve tip spesifik primerler arasındaki tüm primer interaksyonları araştırılmıştır. Her bir tip için tasarlanan primerin diğer tip ile reaksiyon vermediği, dolayısıyla söz konusu serotipe özgün olduğu belirlenmiştir. Primerler in vitro olarak laboratuvar, gerek saha ve gerekse hücre kültürlerinde pasajlanmış tanı materyallerindeki etkinlikleri açısından incelenmiştir. Primerler ayrıca şap hastalığı ile karışan diğer viral hastalık etkenleri SWD, BVD-MD, BHV, BTV ile etkileşimi açısından incelenmiş ve tasarlanan primerlerin sadece şap virusu spesifik olduğu belirlenmiştir.

Bu araştırmada 272 adet saha materyalinin multipleks RT-PCR ve ELISA sonuçları istatistiki olarak karşılaştırıldığında, araştırma kapsamında incelenen tüm tanı materyali için RT-PCR ile dil epitellerinde şap virusuna ait viral genetik materyalin saptanma yüzdesi (77.5%) ELISA sonuçlarına (%45.6) göre yüksek düzeyde bulunmuştur. ELISA testinde araştırılan şap virusu 146S antijeninin, örneklerin alınma ve laboratuvara gönderilme şeklinin uygun olmaması nedeniyle zarar görmüş olması bu sonucun muhtemel nedenlerindendir. Hastalık odaklarından gönderilmesine rağmen ELISA negatif sonuç veren saha materyalinin RT-PCR için hala aktif genetik materyali taşıyor olabilmesi RT-PCR'da pozitif sonucu ortaya koymaktadır.

Veteriner alanında kullanılacak diagnostik testlerin validasyonu için WOAHA bir standart yayınlamıştır (OIE, Hahn ve ark., 1998; Jacobson, 1998; Belak, 2003). Bu standartta göre tam anlamıyla validasyon uzun süren ve maliyetli bir süreçtir. En az 5 aşamayı kapsayan bu süreçte sırasıyla,

- Fizibilite çalışması (metot belirleme),
- Kullanılacak kimyasal ve protokollerin seçimi, optimizasyon ve standardizasyonu,
- Testin performans kriterlerinin araştırılması (analitik sensitivite ve spesifite ile diagnostik sensitivite ve spesifite),
- Test performansının sürekli gözden geçirilmesi,
- Testin rutin tanıda kullanılması ve sürekli gözden geçirilmesi gerekliliği bulunmaktadır.

Analitik sensitivite; geliştirilen testin saptadığı en düşük düzeydeki virus miktarını belirler. *Analitik spesifite* ise testin sadece araştırılan virus için spesifik olup olmadığını irdeler. Diagnostik sensitivite ve spesifite ise daha özel kavramlardır. *Diagnostik sensitivite*; gerçekten infekte olan hayvanları testin pozitif olarak saptama yeteneğidir. *Diagnostik spesifite* ise gerçekten hasta olmayan/sağlıklı hayvanları testin negatif olarak saptama yeteneğidir.

Bu araştırmada analitik anlamda sensitivite ve spesifite kriterleri tam anlamıyla yerine getirilmiştir. Çünkü diagnostik sensitivite ve spesifitenin araştırılmasında hastalık odaklarından gönderilen klinik anlamda şap enfekte hayvan grubu üzerinden yapılan diagnostik spesifite hesabı çok gerçekçi değildir. Bu nedenle, bu araştırmada gerçek diagnostik spesifiteyi belirlemek amacıyla WRL'den sağlanan şap virusu yönünden negatif hayvanlara ait virus süspansiyonları ile geliştirilen multipleks RT-PCR testinin spesifitesi incelenmiş, buna göre incelenen 7 adet negatif virus multipleks RT-PCR' da da negatif olarak saptanmıştır.

Yeni geliştirilen bir testin bir başka testle karşılaştırılabilmesi için birbiriyle uyumu saptanmış iki test gerekmektedir. Bu araştırmada ELISA ve multipleks RT-PCR arasındaki uyum orta derecede (Kappa, 0.2) olarak belirlenmiştir. Bu

araştırmada geliştirilen multipleks RT-PCR'ın sensitivitesini araştırmak için multipleks RT-PCR ile uyumu iyi (Kappa, 0.70) olarak saptanmış olan monopleks RT-PCR testi seçilmiştir. Bu amaçla 45 adet tanı materyalinden alınan monopleks RT-PCR sonuçları aynı örneklerin multipleks RT-PCR sonuçları ile istatistiki olarak karşılaştırılmış ve yeni geliştirilen multipleks RT-PCR'ın tip ayrımı olmaksızın araştırma genelinde incelenen tüm tanı materyallerinde monopleks RT-PCR'a göre sensitivitesi % 95 ve spesifitesi %84 düzeyinde bulunmuştur.

İncelenen tanı materyallerinde şap virusunun saptanmasında farklı viral komponentlerin (kapsit antijeni 146S/viral genetik materyal) saptanması temeline dayalı 2 farklı yöntem olan ELISA ve multipleks RT-PCR testleri kullanıldığından bu çalışmada incelenen örneklerle ait ELISA ve RT-PCR tiplendirme test sonuçları sadece pozitiflik oranları açısından istatistiki olarak karşılaştırılmıştır. ELISA ve multipleks RT-PCR testi arasındaki pozitiflik oranları (%), araştırmada incelenen toplam tanı materyali ve sadece direkt saha materyali açısından istatistiki olarak araştırıldığında, iki test arasındaki farklılık istatistiki açıdan önemli olarak saptanmıştır ($p<0.05$). Pasajlanmış tanı materyallerine ilgili sonuçlar incelendiğinde ise O tipinde iki test arasındaki fark önemli ($p<0.05$) iken, A serotipinde önemli bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Geliştirilen multipleks RT-PCR ile monopleks RT-PCR analitik sensitivite sonuçlarının birbirine benzer bulunması (örneğin, O tipinde 10^{-5}) analitik sensitivite açısından multipleks RT-PCR'ın monopleks RT-PCR'a üstünlüğü olmadığını göstermektedir. Şap virusu tipleri arasında multipleks RT-PCR analitik sensitivite sonuçları arasında A ve O tipleri arasında belirgin bir fark (sadece O tipinde bir dilüsyon daha hassas) bulunmamıştır. Bu çalışmada, A ve O tiplerinde tespit edilen multipleks RT-PCR sensitivite sonuçları Grindharan ve ark (2005)'ının bildirdiklerine benzer bulunmuştur. ELISA ile multipleks RT-PCR ve monopleks RT-PCR (Asia-1 tipi için) sensitivite sonuçları karşılaştırıldığında ise incelenen tüm şap virusu tiplerinde RT-PCR sensitivitesinin ELISA'ya göre daha yüksek olduğu kanaatine varılmıştır. Rodriguez ve ark (1992) ve Grindharan ve ark (2005), Mohapatra ve ark (2006)' da yaptıkları çalışmalarında benzer sonuca ulaşmışlardır.

Bu çalışmada geliştirilen multipleks RT-PCR ile elde edilen sonuçlarda, incelenen saha materyalleri içinde herhangi bir miks enfeksiyon varlığının saptanmamış olması nedeniyle bu yönde tartışılabilir bir veri bulunmamaktadır.

RT-PCR ile teşhisin en önemli problemi PCR inhibitörleri (saha materyalinin kendisinden kaynaklanan, manipulasyon hatalarından doğan) nedeniyle yanlış negatif sonuç varlığıdır (Aygan, 2006). Günümüzde bu amaçla RT-PCR reaksiyonunu başlangıç aşamasından son aşamaya (RNA ekstraksiyon, RT ve PCR aşamaları) kadar takip eden internal kontrol sistemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır (Dingle ve ark., 2004; King ve ark., 2007). RT-PCR sensitivitesi, kullanılan RNA ekstraksiyon metoduna ve saha materyalinde bütünlüğü bozulmadan kalmış şap virusu RNA miktarına bağlıdır. RT-PCR spesifitesi ise kullanılan primerlerin ne ölçüde doğru dizayn edildiğine göre değişir. PCR teorik olarak ELISA testine göre daha yüksek hassasiyete sahiptir. Doğal olarak, sahadan laboratuvara gönderilme koşullarının kontrol edilemediği durumlarda, sahadan gelen tanı materyalinin kapsadığı bütünlüğü bozulmamış sağlam RNA miktarı farklı olacağından RT-PCR hassasiyetini değiştirecektir. Bu nedenle, laboratuvarı optimize edilen testin hassasiyeti ne kadar önemliyse, sahadan gelen tanı materyalinin kalitesi de o ölçüde önemlidir.

Sonuç olarak bu çalışmada, Türkiye'nin çeşitli bölgelerine ait şap hastalığı şüpheli hastalık odaklarından gönderilen tanı materyallerinde, tasarlanan primerler kullanılarak yeni geliştirilen multipleks RT-PCR tekniğinin sensitivitesi ve spesifitesinin oldukça yüksek olduğu, tanı materyalinin örneklenmesi ve laboratuvara ulaştırılmasına ilişkin sahanın sınırlandırıcı koşullarıyla ilgili tedbirler alınarak tekniğin rutin tanı faaliyetleri için kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada 2006-2008 yıllarında Türkiye'nin çeşitli illerinde ortaya çıkan şap hastalığı odaklarından toplam 272 adet tanı materyali ile Şap Enstitüsü dil epitel arşivinden sağlanan ve Enstitü kayıtlarına göre Asia-1 yönünden pozitif olarak saptandığı bildirilen 15 adet tanı materyali olmak üzere 287 adet tanı materyali kullanıldı. Sözkonusu tanı materyallerinin 222 adedi, direkt saha materyali, 65 adedi ise tanı materyallerinin BHK-21 hücre kültürlerinden elde edilen pasaj sıvısı olarak çalışmada kullanıldı.

Şap virusunun moleküler tiplendirmesi için Türkiye'de ilk defa orijinal olarak primer tasarımı yapıldı ve sözkonusu primerler kullanılarak monopleks ve multipleks RT-PCR protokolü oluşturuldu. Bu çalışmada elde edilen verilere göre; A ve O serotipleri için geliştirilen multipleks RT-PCR testinin monopleks RT-PCR'a göre diagnostik sensitivitesi %95 ve spesifitesi %84 olarak tespit edildi. Bu sonuçlar ışığında, bu çalışmada geliştirilen multipleks RT-PCR tekniğinin şap virusunun tanı ve tiplerinin saptanmasında hızlı, güvenilir, tekrar edilebilir bir tanı yöntemi olduğu kanaatine varıldı.

Oluşturulan protokol ile uygulanan multipleks RT-PCR ve ELISA sonuçları karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, direkt saha materyallerine uygulanan ELISA testi A ve O serotipleri pozitiflik oranları sırasıyla %38.4 (40/104), % 35.9 (37/103) olmasına karşın, multipleks RT-PCR ile belirlenen pozitiflik oranları sırasıyla %79.8 (83/104) ve %67.9 (70/103) olduğu görüldü ve iki test arasında pozitiflik oranları arasındaki fark istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) bulundu. Pasaj sıvılarında ise multipleks RT-PCR ve ELISA sonuçları karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, A serotip için pozitiflik oranı her iki test sonuçları için istatistiki açıdan önemsiz ($p>0.05$) olmasına karşın, O serotip için farklılığın önemli ($p<0.05$) olduğu belirlendi.

Şap virusunun tanı ve tiplendirilmesinde birçok tanı laboratuvarında halen kullanılmakta olan ELISA, WOAİ tarafından kabul gören bir testtir. Ancak bu çalışmada da belirlendiği üzere ELISA'nın virus izolasyonu ile birlikte %70-80 düzeyinde sensitivitesi olduğu bildirilmiştir. Bu durum, gerçekte şap virusu içerebilecek %20 oranındaki saha materyalinin yanlış negatif olarak belirlenme sorununu ortaya çıkarmaktadır. Bu araştırmada, Asia-1 tipi hariç ELISA ile saptanamayan %51.5 düzeyinde (148/287) örnek mevcuttur ve bu negatif tanı materyalinin %66.8'i (99/148) şap virusu A ve O serotiplerine yönelik geliştirilen multipleks (dupleks) RT-PCR ile pozitif olarak saptanmıştır. Bu bilgilere dayanarak geliştirilen multipleks RT-PCR uygulamasının, ELISA uygulaması ile saptanamayan gerçekte pozitif örneklerin saptanması ve şap virusu tiplendirilmesi için second round/ikincil bir test olarak kullanımı önerilmektedir.

RT-PCR ile teşhisin en önemli problemi, PCR inhibitörleri, saha materyalinden kaynaklanan problemler, manipulasyon hataları, vb. nedenlerle oluşabilecek, yanlış negatif sonuç varlığıdır. PCR ile tanı, örneklerin sahada toplanması ve laboratuvara gönderilmesinden PCR ürününün laboratuvarında görüntülenmesine değin uzun, bazı noktalarda kontrol edilemeyen bir süreç izlemektedir. Son yıllarda bu amaçla RT-PCR reaksiyonunu başlangıç aşamasından son aşamaya (RNA ekstraksiyon, RT, PCR) kadar takip eden internal kontrol sistemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen verilerin, primer tasarımı, RT-PCR ve multipleks RT-PCR tekniklerinin geliştirilmesi, şap virus serotiplerinin moleküler tanısı, tiplendirmesi konularında çalışmalar yapacak diğer araştırmacılara ışık tutacak nitelikte olduğu düşünülmektedir.

ÖZET

Türkiye’de Şap viruslarının Tanı ve Tiplendirilmesinde Multipleks RT-PCR Tekniği Geliştirilmesi ve Tanısal Değerinin Araştırılması

Bu çalışmada, Türkiye’de şap virusu saha izolatlarının moleküler tanısı ve tiplendirilmesi için multipleks RT-PCR tekniği geliştirilmesi amaçlandı. Bu amaçla, 2006-2008 yıllarına ait toplam 272 adet şap virusu enfekte tanı materyali ile 1999-2001 yıllarında şap hastalığı odaklarından gönderilerek, Şap Enstitüsü rutin tanı faaliyetleri sonucunda Asia-1 yönünden pozitif olarak saptanan ve Enstitü dil epitel arşivinde stoklanan 15 adet tanı materyali kullanıldı. Şap virusu genomunda VP1 ve 2AB bölgeleri hedef alınarak biri ortak (reverz primer) 3’ü şap virus serotip spesifik primerlerden oluşan multipleks PCR stratejisine yönelik primer tasarımı gerçekleştirilerek bu primerlerin kullanıldığı multipleks RT-PCR tekniği geliştirildi ve optimize edildi.

Araştırmada kullanılan 272 adet saha materyali ve 15 adet Asia-1 arşiv saha materyali olmak üzere toplam 287 adet tanı materyalinin ELISA ile 131 adedi (%45.6) düzeyinde şap virusu (A,O ya da Asia-1) yönünden pozitif bulunurken, söz konusu tanı materyalinin (272 adet) geliştirilen RT-PCR protokolü ile 211 adedi (%77.5) şap virusu A, O serotipleri yönünden pozitif olarak saptandı. Elde edilen verilerin istatistik analizi sonucunda, direkt saha materyallerine uygulanan ELISA ve multipleks RT-PCR sonuçlarının arasındaki farklılık ile şap virusu O serotipi pasaj sıvılarına uygulanan ELISA ve multipleks RT-PCR sonuçlarının arasındaki farklılık önemli ($p<0.05$) olarak saptandı.

Sonuç olarak, bu çalışmada tasarımı yapılan primerler kullanılarak uygulanan multipleks RT-PCR tekniğinin WOAHA tarafından referans test olarak önerilen ELISA yöntemine göre önemli bir avantaj oluşturduğu, hızlı, güvenilir bir yöntem olduğu belirlendi. Bununla birlikte, ELISA’nın WOAHA’nın kabul ettiği referans test olması göz önüne alınarak, diagnostik başarının artırılması için ELISA ile negatif olarak saptanan tanı materyaline multipleks RT-PCR uygulanması önerildi.

Anahtar Sözcükler: Şap virusu, multipleks RT-PCR, tanı, tiplendirme

SUMMARY

Development of Multiplex RT-PCR Technique for Diagnosis and Typing of FMDV in Turkey.

In this study, development of multiplex RT-PCR technique for differentiation of FMDV field isolates in Turkey was aimed. Two hundred and eighty seven FMDV infected samples collected between years, 2006-2008 and 15 archive epithelium of FMDV Asia-1 collected between years 1999-2001 and determined positive following routine diagnosis at FMD Institute constituted the material of the study. Primers (one common reverse and 3 FMDV type specific forward primers) were designed from the gene sequences VP1 and 2AB region of FMDV genome. The most appropriate primer sets were determined following *in-silico* (computer-based analysis) and *in-vitro* (laboratory PCR assays) analyses. Multiplex RT-PCR technique was developed and optimized using these novel primers.

A total of 287 FMDV samples; 272 field samples (tongue epithelium) of FMDV A and O serotypes, and 15 archived field samples of FMDV Asia -1 serotype were used in the study. Of the 287 diagnostic samples, a total of 131 (45.6%) were found to be positive in ELISA tests against the virus serotypes A, O, and Asia-1, while 211 (77.5%) out of 272 samples were positive in the novel multiplex RT-PCR protocol developed to detect A and O serotypes. Following the statistical analysis of the obtained results, significant difference ($p<0.05$) was detected in the results of ELISA and multiplex-PCR assays applied to direct field samples, and also to FMDV serotype O virus passage fluids.

As a conclusion, multiplex RT-PCR technique performed with the originally designed primers were determined as a rapid, reliable method, and providing a significant advantage over to the ELISA method suggested as a reference test by the WOAHA in the present study. Nevertheless, with the consideration of ELISA as a reference assay suggested by WOAHA, investigation of ELISA negative samples with multiplex RT-PCR is suggested for the improvement of diagnostic success.

Key words: FMDV, development, multiplex RT-PCR, detection, typing

KAYNAKLAR

- ACHARYA, R., FRY, E., STUART, D. FOX, G. ROWLANDS, D. BROWN, F. (1989) . The three dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature.*, **337**: 709-716.
- ACHARYA, R., FRY, E., STUART, D. FOX, G. ROWLANDS, D. BROWN, F. (1990). The structure of foot-and-mouth disease virus: implications for its physical and biological properties. *Vet Microbiol.*, **23**: 21-34.
- AKTAŞ, S. (1998). Molecular Epidemiology of foot and mouth disease types O and A in Turkey. Doktora Tezi. University of Reading, UK.
- AKTAŞ, S. SAMUEL, A. R. (2000). Identification of antigenic epitopes on the foot and mouth disease virus isolate O1/Manisa/Turkey/69 using monoclonal antibodies. *Rev Sci Tech.*, **19**: 744-753.
- ALEXANDERSEN, S., FORSYTH, M. A., REID, S. M. BELSHAM, G. J. (2000). Development of reverse transcription-PCR (oligonucleotide probing) enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis and preliminary typing of foot-and-mouth disease: a new system using simple and aqueous-phase hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, **38**: 4604-4613.
- ALEXANDERSEN, S., OLEKSIEWICZ, M. B. DONALDSON, A. I. (2001). The early pathogenesis of foot-and-mouth disease in pigs infected by contact: a quantitative time-course study using TaqMan RT-PCR. *J. Gen. Virol.*, **82**: 747-755.
- ALEXANDERSEN, S., ZHANG, Z., DONALDSON, A. I. (2002). Aspects of the persistence of foot-and-mouth disease virus in animals--the carrier problem. *Microbes Infect.*, **4**: 1099-1110.
- ALEXANDERSEN, S., ZHANG, Z., DONALDSON, A. I. GARLAND, A. J. (2003a). The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Pathol.*, **129**: 1-36.
- ALEXANDERSEN, S., QUAN, M., MURPHY, C., KNIGHT, J. ZHANG, Z. (2003b). Studies of quantitative parameters of virus excretion and transmission in pigs and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus. *J. Comp. Pathol.*, **129**: 268-282.
- ALEXANDERSEN, S. MOWAT, N. (2005). Foot-and-mouth disease: host range and pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **288**: 9-42.

- AMARAL- DOEL, M.F. OWEN, N.E., FERRIS, N.P., KITCHING, R.P. (1993). Detection of FMD viral sequences by PCR. *Vaccine.*, **11**: 415-421.
- ANSELL, D. M., SAMUEL, A. R., CARPENTER, W. C.KNOWLES, N. J. (1994). Genetic relationships between foot-and-mouth disease type Asia 1 viruses. *Epidemiol. Infect.*, **112**: 213-224.
- AYGAN, A. (2006). Nucleic acid extraction from clinical specimens for PCR applications. *Turk J. Biol.*, **30**: 107-120.
- BAO, H.F., LI, D., GUO, Z.J., LU, Z.J., CHEN, Y.L., LIU, T.X., XIE, Q.G. (2008). A highly sensitive and spesific multiplex RT-PCR to detect foot-and-mouth disease virus in tissue and food samples. *Arch. Virol.*, **153**(1):205-9
- BARNETT, P. V.COX, S. J. (1999). The role of small ruminants in the epidemiology and transmission of foot-and-mouth disease. *Vet. J.*, **158**: 6-13.
- BAXI, M. K., BAXI, S. CLAVIJO, A., BURTON, K.M., DEREGT, D. (2006). Microarray-based detection and typing of foot-and-mouth disease virus. *Vet. J.*, **172**(3):473-81
- BECK, I., FEIL, G., STROHMAIER, K. (1983). The moleculer basis of the antigenic variation of foot-and-mouth disease virus. *The EMBO Journal.*, **2**: 555-559.
- BELAK, S., THOREN, M., HAKHVERDYAN, M. (2003). Advances in diagnostic techniques. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Rome June 29th- July^{2nd}.
- BROWN, F. (1980). Moleculer basis of antigenic variation in the picornaviruses. *Analysis of the New York Academy of Sciences*, **354**: 202-218.
- BROWN, F. (1984). Chemical basis of antigenic variation in foot-and-mouth-disease virus. *Biochem. Soc. Trans.*, **12**: 705-708.
- BROWN, F. (1995): Antibody recognition and neutralization of FMDV. *Seminars in Virology*, **6**: 243-248
- BURROWS, R. (1968). The persistence of foot-and mouth disease virus in sheep. *J Hyg (Lond)* **66**: 633-640.

- CALLENS, M., CLERCQ, K.D. (1997). Differentiation of the seven serotypes of foot-and-mouth disease virus by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.*, **67**: 35-44.
- CARRILLO, E. C., ROJAS, E. R., CAVALLARO, L., SCHIAPPACASSI, M., CAMPOS, R. (1989). Modification of foot-and-mouth disease virus after serial passages in the presence of antiviral polyclonal sera. *Virology*, **171**: 599-601.
- CHEUNG, A., DELAMARTER, J., WEISS, S., KÜPPER, H. (1983). Comparison of the major antigenic determinants of different serotypes of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, **48**(2): 451-459.
- CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol –chloroform extraction. *Anal.Chem.*, **162**: 156-159.
- CLAVIJO, A., WRIGHT, P., KITCHING, P. (2004). Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. *Vet. J.*, **167**(1): 9-22.
- COLLINS, R.A., KO, L.S., FUNG, K.Y., LAU, L.T., XING, J., YU, A.C.H., (2002). A method to detect major serotypes of foot-and-mouth disease virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **297**(2): 267-274.
- COTTAM, WADSWORTH, J., SHAW, A.E., ROWLANDS, R.J., GOATLEY, L., MAAN, S., MAAN, N.S., MERTENS, P.P., EBERT, K., LI, Y., RYAN, E.D., JULEFF, N., FERRIS, N.P., WILESMITH, J.W., HAYDON, D.T., KING, D.P., PATON, D.J., KNOWLES, N.J. (2007). Transmission pathways of FMDV in the UK. *Plos Pathog.*, **18** (4): 1-8.
- DAVIE, J. (1964). A Complement Fixation Technique for the Quantitative Measurement of Antigenic Differences between Strains of the Virus of Foot-and-Mouth Disease. *J. Hyg. (Lond.)*, **62**: 401-11.
- DAVIES, G. (2002). Foot and mouth disease. *Research in Vet.Sci.*, **73**: 195-199.
- DIEFFENBACH, C.W., DVEKSLER, S. (2003). PCR Primer a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- DINGLE, K.E., CROOK, D., JEFFERY, K. (2004). Stable and noncompetative RNA internal control for routine clinical diagnostic reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **42**: 1003-1011.

- DOMINGO, E. (2002). Quacispesies theory in virology. *J. Virol.*, **76**: 463-465.
- DOMINGO, E., ESCARMIS, C., BARANOWSKI, E., RUIZ-JAROBO, C., CARRILLO, E., NUNEZ, J. I., SOBRINO, F. (2003). Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.*, **91**: 47-63.
- DONALDSON, A. I., GIBSON, C. F., OLIVER, R., HAMBLIN, C. KITCHING, R. P. (1987). Infection of cattle by airborne foot-and-mouth disease virus: minimal doses with O1 and SAT 2 strains. *Res. Vet. Sci.*, **43**: 339-346.
- DUQUE, H., BAXT, B. (2003). Foot-and-mouth disease virus receptors: comparison of bovine αV integrin utilization type A and O viruses. *J. Virol.*, **77**: 2500-2511.
- EDWARDS, M.C., GIBBS, R.A. (1994). Multiplex PCR: advantages, development and applications. *PCR Methods Appl.*, **3**: 65-75.
- ELENA, S.F. (2002). Restriction to RNA virus adaptation: an experimental approach. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **81**: 135-142.
- ELNIFRO, M. E., ASHSHI, A.M., COOPER, R.J., KLAPPER, P. (1992). Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. *Clin. Microbiol. Rev.*, **13**: 559-570.
- EVARAERT, L., VRIJSEN, R., BOEYE, A., (1989). Eclipse products of poiovirus after cold-synchrozed infection of HeLa cells. *Virology*, **171**: 76-82.
- FANSON, B.G., OSMACK, P., BISCEGLIE, A.M.D. (2000). A comparison between the phenol-chloroform method of RNA extraction and the QIAamp viral RNA kit in the extraction of hepatitis C and GB virus-C/hepatitis G viral RNA from serum. *J. Virol. Methods.*, **89**: 23-27.
- FERNANDEZ, J., AGUERO, M., ROMERO, L.J., VAZGUEZ, B., BELAK, S., ARIAS, M., and SANCHEZ-VISCAZIO, J.M. (2008). Rapid and differential diagnosis of foot-and-mouth disease, swine vesicular disease, and vesicular stomatitis by a new multiplex RT-PCR assay. *J. Virol. Methods.*, **147**: 301-311.
- FERRIS, N. P. DAWSON, M. (1988). Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth and swine vesicular diseases. *Vet. Microbiol.*, **16**: 201-209.

- FERRIS, N. P. DONALDSON, A. I. (1992). The World Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease: a review of thirty-three years of activity (1958-1991). *Rev. Sci. Tech.*, **11**: 657-684.
- FOX, G., STUART, D., ACHARYA, K. R., FRY, E., ROWLANDS, D.BROWN, F. (1987). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of foot-and-mouth disease virus. *J Mol. Biol.*, **196**: 591-597.
- FRY, E. E., STUART, D. I., ROWLANDS, D.J. (2005). The structure of foot-and-mouth disease virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **288**: 71-101.
- FUCHS, B., ZHANG, K., ROCK, MG., BOLONDER, M.E. (1999). High temperature cDNA synthesis by AMV reverse Transcriptase improves the specificity of PCR. *Molec. Biotech.*, **12**: 237-240.
- GILBERT, M., AKTAŞ, S., MOHAMMED, H., ROEDER, P., SUMPTION, K., TUFAN, M., SLINGERBERGH, J. (2005). Patterns of spread and persistence of foot-and-mouth disease types A,O and Asia-1 in Turkey: a meta- population approach. *Epidemiol. Infect.*, **133**: 537-545.
- GRINDHARAN, P., HEMADRI, D., TOSH, C., SANYAN, A., BONDYOPADHYAY, S.K. (2005). Development and evaluation of MULTIPLEKS PCR for differentiation of foot-and-mouth disease virus strains native to India.. *J. Virol. Methods.*, **126**:1-11.
- GRUBMAN, M.J., ZELLNER, M., WAGNER, J. (1987). Antigenic comparison of the polypeptides of foot-and-mouth disease virus serotypes and other picornaviruses. *Virology*, **158**: 133-140.
- GRUBMAN, M. J., BAXT, B. (2004). Foot-and-mouth disease *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**(2): 465-469.
- GURUMURTHY, C.B., SANYAL, A., VENKATAMARAN, R., TOSH, C., GEORGE, M., HEMADRI, D. (2002). Genetic diversity in the VP1 gene of foot-and-mouth disease virus serotype Asia1. *Arch. Virol.*, **147**: 85-102.
- GÜRHAN, S.I., GÜRHAN, B., ÖZTÜRKMEN, A., CANDAŞ,A., AYNAGÖZ, G., KIZIL, S. (1993). Anadolu'da şap ile persiste enfekte sığır ve koyunlarda taşıyıcılık oranları. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 7:52-59.
- HAHN, C.M., BERDIRG, C., KUHN, C. (1998). Critical level and detection limit:performance measures for PCR based assays. *J.Virol. Methods.*, **74**: 139-148.

- HAMBLIN, C., ARMSTRONG, R.M. HEDGER, R.S. (1984). A rapid enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of foot-and-mouth disease virus in epithelial tissues. *Vet. Microbiol.*, **9**: 435-443.
- HARRIS, T.J.R., ROBSON, K.J.H., BROWN, F. (1980). A study the level of nucleotide sequence conservation between the RNAs of two serotypes of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.*, **50**:403-418.
- HENAGARIU, O. (1997). Multiplex PCR: Critical Parameters and step by step protocol, *Biotechniques*, **23**: 504-511.
- HINDSON, B.J., REID, S.M., BAKER, B.R., EBERT, K., FERRIS, N.P., TAMMERO, L.F.B., LENHOFF, R.J., ARANI, P.N., VITALIS, E.A., SLEZAK, T.R., HULLINGER, P.J., AND KING, D.P. (2008). Diagnostic evaluation of multiplexed reverse transcription PCR microsphere array assay for detection of foot-and-mouth and look-alike disease virus. *J. Clin. Microbiol.*, **46**: 1081-1089.
- HOFNER, M.C., CARPENTER, W.C., DONOLDSON, A.I. (1993). Detection of foot-and-mouth disease virus RNA in clinical samples and cell culture isolates by amplification of the capsid coding region. *J. Virol. Methods.*, **42**: 53-62
- HOGLE, J. M., CHOW, M.FILMAN, D. J. (1985). Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, **229**: 1358-1365.
- HOUSE, C. MEYER, R. F. (1993). The detection of foot-and-mouth disease virus in oesophageal-pharyngeal samples by a polymerase chain reaction technique. *J. Virol. Methods.*, **43**: 1-6.
- HUGHES, G. J., MIOULET, V., HAYDON, D. T., KITCHING, R. P., DONALDSON, A. I.WOOLHOUSE, M. E. (2002). Serial passage of foot-and-mouth disease virus in sheep reveals declining levels of viraemia over time. *J. Gen. Virol.*, **83**: 1907-1914.
- JACOBSON, R.H. (1998). Validation of serologic assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. Sci.Tech. Off. Int. Epiz.*, **17**: 469-486.
- JOKELA ,P., KORPELA, P.J., MAARONEN, M., GLUMOFF, V., HPPIA, T. (2005). Detection of human picornaviruses by multiplex reverse transcription-PCR and liquid hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, **43**: 1239-1245.

- KING, A. M., KING, A.M.Q. , BROWN, F., CHRISTIAN, P., HOVI, T., HYYPIA, T. , KNOWLES, N.J., LEMON, S.M., MINOR, P.D., PALMENBERG, A.C., SKERN, T. STANWAY, G. (2000). Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses". Picornaviridae. New-York, San Diego, R.B. Academic Press: 657-673.
- KING, D.P., MONTAGUE, N., EBERT, K., REID, S.M., DUKES, J.P., SCHADLICH, L., BELSHAM, G., LOMONOSSOFF, G.P. (2007). Development of a novel recombinant encapsidated RNA particle: Evaluation as an internal control for diagnostic RT-PCR. *J. Virol. Methods.*, **146**: 218-225.
- KITCHING, R.P. (1988). A recent history of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Path.*, **118**: 89-108.
- KITCHING, R.P., KNOWLES, N.J., SAMUEL, A.R., DONALDSON, A.I., (1989). Development of FMDV strain characterization –a review: *Tropical. Anim. Hlth. Prod.*, **21**:153-166.
- KITCHING, R.P. (2002). Identification of foot-and-mouth disease virus carrier and subclinically infected animals and differentiation from vaccinated animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **21**:531-538.
- KITCHING, R.P., HAMMOND, J., JEGGO, M., CHARLESTON, B., PATON, D., RODRIGUEZ, L., HECKERT, R. (2007). Global FMD control-Is it an option? *Vaccine*, **26** : 5660-5664.
- KLEIN, J., PARLAK, U., ÖZYORÜK, F., CHRISTENSEN, L.S. (2006). The molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus serotypes A and O from 1998 to 2004 in Turkey, *BMC Vet. Res.*, **2**:35-48.
- KNOWLES, N.J., SAMUEL, A.R. (2003). Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.*, **91**: 65-80.
- KNOWLES, N.J., DAVIES, P.R., REBECCA, J. M.VALARCHER, J.F. (2004). Identification of a ninth foot-and-mouth disease virus type O topotype and evidence for a recombination event in its evolution. Report of the session of the Research Group of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease. Chania, Crete, Greece 12-15 October 2004. Rome: FAO, Appendix **24**: 163-172.
- LAOR, O., TORGENSEN, H., YADIN, H., BECKER, Y. (1992). Detection of FMDV RNA amplified by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Virol. Methods.*, **36**: 197-208.

- MAHY, B.W.J. (2005). Introduction and history of foot-and-mouth disease virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **288**: 1-8.
- MAKOFF, A.J., PAYNTER, C.A., ROWLANDS, D.J., BOOTHROYD, J.C. (1992). Comparison of amino acid sequence of the major immunogen from three serotypes of foot and mouth disease virus. *Nuc. Acid. Res.*, **10**: 8285-8295.
- MASON, P.W., GRUBMAN, M.J., BAXT, B. (2003). Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res.*, **91**(1):9-32.
- MARQUARDT, O., HAAS, B. (1998). VP1-coding sequences of recent isolates of foot-and-mouth disease virus types A, O and Asia1. *Virus Genes*, **16**: 185-193.
- MARQUARDT, O., FREIBERG, B. (2000). Antigenic variation among foot-and-mouth disease virus type A field isolates of 1997-1999 from Iran. *Vet. Microbiol.*, **74**: 377-386.
- MCPHERSON, M.J., MOLLER, S.G. (2000). PCR, The Basics From Background to Bench. UK: Cromwell Press.
- MCGALL, G.H., CHRISTIANS, F.C. (2002). High density genechip oligonucleotide probe arrays. *Adv Biochem. Eng. Biotechnol.*, **77**: 22-41.
- MCVICAR, J. W. SUTMOLLER, P. (1976). Growth of foot-and-mouth disease virus in the upper respiratory tract of non-immunized, vaccinated, and recovered cattle after intranasal inoculation. *J. Hyg (Lond)*, **76**: 467-481.
- MISSEL, A., KORFHAGE, C., MULLER, S., DECKER, K., DWYER, K., KONG, J., LOFFERT, D. (2003). Improvements in RT PCR specificity and sensitivity. 10 January 2008. Erişim: [http://www1.qiagen.com/literature/Posters/PDF/PCR-RTPCR_RNAamp/1013676_RT_PCR.pdf]
- MOHAPATRA, J.K., SANYAL, A., HEMADRI, D., TOSH, C., PALANI, G., RASOOL, T.J., BANDHOPADHYAY, S.K. (2006). Development and comparison of genome detection assays for the diagnosis of foot-and-mouth disease suspected clinical samples. *J. Virol. Methods.*, **137**: 14-20.
- MONTASSIER, H.J., ARAUJO J, J.PINTO, A.A. (1994). Rapid coagglutination test for the detection and typing of foot and mouth disease virus. *J. Virol. Methods.*, **50** (1-3): 29-41.

- MORT, M., BAXTER, J., BAILEY, C., CONVERY, I. (2008). Animal disease and human trauma: the physiological implications of the 2001 UK FMD disaster, *J. Appl. Anim. Welf. Sci.*, **11**(2): 133-148.
- MOSS, A., HAAS, B. (1999). Comparison of the plague test and reverse transcription nested PCR for the detection of FMDV nasal swabs and probang samples. *J. Virol. Methods.*, **80**: 59-41.
- MURPHY, F.A., GIBBS, P.E., HORZINEK, M.C., STUDDERT, M.J. (1999). *Veterinary Virology*. Academy Press. USA.
- MUTHUCHELVAN, D., VENKATARAMANAN, R., HEMADRI, D., SANYAL, A.TOSH, C. (2001). Sequence analysis of recent Indian isolates of foot-and-mouth disease virus serotypes O, A and Asia 1 from clinical materials. *Acta Virol.*, **45**: 159-167.
- NUNEZ, J.I., BLANCO, E., HERNANDEZ, T., DOPAZO, J., SOBRINO, F. (1998). RT-PCR in foot and Mouth Disease diagnosis. *The Vet. Q.* **20** (Suppl.2): 34-36.
- OIE (Office International des Epizooties/World organization for Animal Health). 2004. Foot and Mouth Disease, In: OIE Standarts Commission, Ed: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.
- OLECHNOWITZ, A.F., ENGLER, E. (1970). [pH inactivation of the foot-and-mouth disease virus]. *Arch. Exp. Veterinarmed.*, **24**: 461-471.
- OLIVER, R. E., DONALDSON, A. I., GIBSON, C. F., ROEDER, P. L., LE BLANC SMITH, P. M.HAMBLIN, C. (1988). Detection of foot-and-mouth disease antigen in bovine epithelial samples: comparison of sites of sample collection by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and complement fixation test. *Res. Vet. Sci.*, **44**: 315-319.
- PARLAK, Ü. (2005). Türkiye’den izole edilen şap viruslarının genetik ve antijenik karakterizasyonu. Doktora Tezi. Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- PARLAK, Ü., ÖZYÖRÜK, F., KNOWLES, N.J., ARMSTRONG, R.M., AKTAS, S., ALKAN, F., COKCALISKAN, C., CHRISTENSEN, L.S. (2007). Characterisation of foot-and-mouth disease virus strains circulating in Turkey during 1996-2004. *Arch. Virol.*, **152**(6):1175-85
- PATTHAIK, B., SANYAL, M., GEORGE, M., TOSH, C., HEMADRI, R., VENKATARAMANAN, R. (1997). Evaluation of primers for PCR amplification of RNA polymerease gene sequences of foot-and-mouth diasease virus. *Acta Virologica*, **41**: 333- 336.

- PERRY, B.D., RICH, K.M. (2007). Poverty impacts of foot-and-mouth disease and the poverty reduction implications of its control. *Vet. Rec.*, **160**: 238-241.
- PETERS, I.R., HELPS, C.R., HALL, E.J., DAY, M.J. (2004). Real Time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. *J. Immunol. Methods.*, **286** : 203-217.
- PFAFF, E., THIEL, H.J., BECK, E., STROHMAIER, K., SCHALLER, H. (1988). Analysis of neutralizing epitopes on foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, **62**: 2033-2040.
- RASMUSSEN, T.B. (2003). Development of a novel quantitative real time RT-PCR assay for the simultaneous detection of all serotypes of Foot-and-Mouth Disease virus. *Arch.Virol.*, **148**: 2005-2021.
- RASMUSSEN, T.B. (2005). Molecular detection of exotic viral infections in animals using quantitative real time RT-PCR. PhD Thesis. Danish Institute for Food and Veterinary Research Institute, Denmark.
- RASHTCHIAN, A. (1994). Amplification of RNA. *PCR Methods Appl.*, **4**: 83-91.
- REID, S.M., FORSYTH, M.A., HUTCHINGS, G.H., FERRIS, N. (1998). Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, enzyme linked immunoabsorbent assay and virus isolation for the routine diagnosis of foot-and-mouth disease. *J.Virol. Methods.*, **70**: 213-217.
- REID, S.M., HUTCHINGS, G.H., FERRIS, N., CLERCG, K.D. (1999). Diagnosis of foot and mouth disease by RT-PCR: Evaluation of primers for serotypic characterization of viral RNA in clinical samples. *J. Virol. Methods.*, **83**: 113-123.
- REID, S.M., FERRIS, N., HUTCHINGS, G.H., SAMUEL, A.R., KNOWLES, N.J. (2000). Primary Diagnosis of FMD by Reverse transcription PCR. *J. Virol. Methods.*, **89**: 167-176.
- REID, S.M., FERRIS, N., HUTCHINGS, G.H., ZHANG, Z., BELSHAM, G.J., ALEXENDERSEN, S. (2001a). Diagnosis of foot-and-mouth disease by real time fluorogenic PCR assay. *Vet. Rec.*, **149**: 621-623.
- REID, S.M., FERRIS, N., HUTCHINGS, G.H., CLERCG, K.D., NEWMAN, B.J., KNOWLES, N.J., SAMUEL, A.R. (2001b). Diagnosis of FMD by RT-PCR: Use of phylogenetic data to evaluate primers for the typing of viral RNA in clinical samples. *Arch. Virol.*, **146**: 2421-2434.

- REID, S. M., GRIERSON, S. S., FERRIS, N. P., HUTCHINGS, G. H. ALEXANDERSEN, S. (2003). Evaluation of automated RT-PCR to accelerate the laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Methods.*, **107**: 129-139.
- RIBAO, C., TORRADO, I., VILARINO, M.L., ROMALDE, J.L. (2004). Assessment of different commercial RNA extraction and RT-PCR kits for detection of hepatitis A virus i mussel tissues, *J.Virol. Methods.*, **115 (2)**:177-182.
- RODRIGUEZ, A., MARTINEZ-SALAS,E., DOPAZO, J., DAVILA, M., SAIZ, J.C., SOBRINO, F. (1992). Primer design for specific diagnosis by PCR of highly variable RNA viruses: typing of foot-and-mouth disease virus. *Virology*, **189(1)**: 363-370.
- ROEDER, P.L., LE BLANC SMITH, P.M. (1987). Detection and typing of foot-and-mouth disease virus by enzyme linked immunosorbent assay: a sensitive,rapid and reliable technique for primary diagnosis. *Research in Vet. Sci.*, **43**:225-232.
- RWEYEMAMU, M. M., BOOTH, J. C., HAD, M., PAY, TW. (1978). Microneutralization tests for serological typing and subtyping of foot-and-mouth disease virus strains. *J. Hyg (Lond)*, **81(1)**: 107-123.
- RWEYEMAMU, M. M., OULDRIDGE, E.J., HEAD, M., PURSE, F. (1984). Evaluation of antigenic variation within type A foot and mouth disease virus isolates from Asia. *J. Of. Biol. Stand.*, **12**: 191-194.
- SAIZ, C.J., SOBRINO, F., DOPAZO, J. (1993). Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus type O. *J.Gen. Virol.*, **74**: 2281- 2285.
- SAIZ, M., MORENA, D.B., BLANCO, E., NUNEZ, J., FERNANADEZ, R., SANCHEZ-VIZCAINO, J. M. (2003). Detection of foot-and-mouth disease virus from culture and clinical samples by reverse transcription-PCR coupled to restriction enzyme and sequence analysis. *Vet. Res.*, **34**: 105-117.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SAMUEL, A. R. KNOWLES, N. J. (2001). Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes). *J. Gen. Virol.*, **82**: 609-621.

- SHAFYI, A. (1968). pH resistance of foot-and-mouth disease virus and its complement-fixing antigen. *Am. J. Vet. Res.*, **29**: 1469-1478.
- SOBRINO, F., M. SAIZ, M., JIMENEZ-CLAVERO, M., NUNEZ, J.I., ROSAS, M., BARANOWSKI, E., LEY, V. (2001). Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet. Res.*, **32(1)**: 1-30.
- STEINHAEUER, D. A. HOLLAND, J. J. (1987). Rapid evolution of RNA viruses. *Annu. Rev. Microbiol.*, **41**: 409-433.
- SURYANARAYANA, V., MADANAMOHAN, B., BIST, P., NATARAJAN, C., TRATSCHIN, J.D. (1999). Serotyping of FMDV by Ag-capture RT-PCR. *J. Virol. Methods.*, **80**: 45-52.
- SUTMOLLER, P., BARTELING, S. S., OLASCOAGA, R. C. SUMPTION, K. J. (2003). Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus Res.*, **91**: 101-144.
- THOMAS, A.A.M., WOORTMEIJER, R.J., BARTELING, S.J., MELOEN, R.H.E (1988). Evidence for more than one important, neutralizing site on foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.*, **99**: 237-242.
- TUFAN, M. (2006). Animal health authorities and transboundary animal diseases in Turkey. *J. Vet. Med.*, **53**: 35-37.
- VANGRYSPERRE, W., CLERCQ, K.D. (1996). Rapid and sensitive polymerase chain reaction based detection and typing of FMDV in clinical samples and cell culture isolates, combined with a simultaneous differentiation with other genomically and /or symptomatically related virus. *Arch. Virol.*, **141**: 331-344.
- VERDAGUER, N., MATEU, M. G., BRAVO, J., TORMO, J., GIRALT, E., ANDREU, D., DOMINGO, E. FITA, I. (1994). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a monoclonal antibody Fab fragment against foot-and-mouth disease virus and of its complex with the main antigenic site peptide. *Proteins*, **18**: 201-203.
- VILLARREAL, L.P., DEFILIPPIS, V.R., GOTTLIEB, K.A. (2000). Acute and persistence viral life strategies and their relationship to emerging diseases. *Virology*, **272**: 1-6.
- WARRINGTON, R.E. AND KAWAKAMI, Y. (1972). Passive hemagglutination-inhibition test for typing foot-and-mouth disease virus. *Appl. Microbiol.*, **23(1)**: 98-103.

WITWER, C., RAUSCHER, S., HOFACKER, L. I., STADLER, P.F. (2001). Conserved RNA secondary structures in Picornaviridae genomes. *Nuc. Acid. Res.*, **29**: 5079-5089.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı : Beyhan
 Soyadı : SAREYYÜPOĞLU
 Doğum Yeri ve Tarihi : İzmir-1975
 Uyruğu : T.C.
 Medeni durumu : Evli
 İletişim adresi ve telefonu : Tarım Bakanlığı Şap Ens. Md.lüğü PK. 744 06044
 Eskişehir Yolu 7. km ANKARA-0 312 287 36 00

II. Eğitimi

1993-1998 : Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
 1990-1992 : İzmir Namık Kemal Lisesi
 1987-1990 : İzmir Turgutreis Ortaokulu
 1982-1987 : İzmir Mustafa Kemal İlkokulu

Yabancı dili: İngilizce

III. Ünvanları

1998 : Veteriner Hekim

IV. Mesleki deneyimi

1998-2002: Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
 2002- : Şap Enstitüsü

V. Üye olduğu bilimsel kuruluşlar

Veteriner Mikrobiyoloji Derneği

VI. Bilimsel ilgi alanları

Moleküler Viroloji, Aşılar, Biyoinformatik, Virolojik Teşhis Metotları

Yayınları:

1. Sareyyüpoğlu, B., Burgu, İ., Şap virusunun Tanı ve Tiplendirilmesinde Multipleks RT-PCR Stratejisi Geliştirilmesi., Sözlü sunum, Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 6-10 Ekim, Van, Türkiye.

VII. Bilimsel Etkinlikleri

Şap virusunun filogenetik haritalarının oluşturulmasında kapillar dizi analizi, 5-28 Ağustos 2006, Danish Institute for Food and Veterinary Research, Lindholm, Denmark (Burslu, DPT Ulusal Ajans Leonardo da Vinci Bursu)

Şap virusunun tanı ve tiplendirilmesinde primer ve probe dizaynı, 28 Aralık-30 Ocak 2008, Langford Veterinary School, Bristol, UK (Burslu, T. C. Başbakanlık Bursu).

Bulut A.N., Sareyyupoglu, B., Parlak, U., and Cokcaliskan C.. A serosurveillance to measure antibody level to FMDV and trace antibodies to FMDV NSPs following Spring 2004 FMD vaccination campaign in Turkish Thrace Region. 2004 Report of Session of the Research group of the Standing Technical Committee European Commission for the Control of Foot and Mouth Disease Crete /Greece.

Christiensen, L.S., Parlak, U., Özcan, C., Çokçalışkan, C., Sareyyupoğlu, B., Hansen, L.G., Tezel, A., Ozyoruk, F., Characterization including VP1 and full-length sequencing of type A and O strains collected from FMDV outbreaks since 1996 in Turkey. 2006 Report of Session of the Research group of the Standing Technical Committee European Commission for the Control of Foot and Mouth Disease Paphos /Cyprus.

VIII. Diğer Bilgiler