



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KÖPEKLERDE CANİNE DİSTEMPER VİRUS ENFEKSİYONUNUN
ARAŞTIRILMASI, VİRUSA KARŞI MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİ VE
ANTİJEN ELISA GELİŞTİRİLMESİ**

**Hazırlayan
Serkan KÖKKAYA**

**Danışman
Doç. Dr. Ayşe GENÇAY GÖKSU**

Doktora Tezi

**Kasım 2024
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KÖPEKLERDE CANİNE DİSTEMPER VİRUS
ENFEKSİYONUNUN ARAŞTIRILMASI, VİRUSA KARŞI
MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİ VE ANTİJEN ELISA
GELİŞTİRİLMESİ**

Doktora Tezi

**Hazırlayan
Serkan KÖKKAYA**

**Danışman
Doç. Dr. Ayşe GENÇAY GÖKSU**

**Bu tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi TDK-
2022-12061 kodlu proje ve TÜBİTAK 1002-B tarafından 12O061
kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Kasım 2024
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı Soyadı: Serkan KÖKKAYA

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

‘‘Köpeklerde Canine Distemper Virus Enfeksiyonunun Araştırılması, Virusa Karşı Monoklonal Antikor Üretimi ve Antijen ELISA Geliştirilmesi’’ adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanılmıştır.

Tezi Hazırlayan

Araş. Gör. Serkan KÖKKAYA

Danışman

Doç. Dr. Ayşe GENÇAY GÖKSU

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Fuat AYDIN

KABUL VE ONAY

Doç. Dr. Ayşe GENÇAY GÖKSU danışmanlığında **Araş. Gör. Serkan KÖKKAYA** tarafından hazırlanılan “**Köpeklerde Canine Distemper Virus Enfeksiyonunun Araştırılması, Virusa Karşı Monoklonal Antikor Üretimi ve Antijen ELISA Geliştirilmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

.../.../.....

JÜRİ

İMZA

Danışman: Doç. Dr. Ayşe GENÇAY GÖKSU

.....

Üye: Prof. Dr. Hakan BULUT

.....

Üye: Prof. Dr. Kezban CAN ŞAHNA

.....

Üye: Prof. Dr. Önder DÜZLÜ

.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi İbrahim SÖZDUTMAZ

.....

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarihi ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.../.../.....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmasının tamamında bana destek olan, fikir veren ve karşılaştığım problemlerin çözülmesinde yardımcı olan danışmanım **Doç. Dr. Ayşe GENÇAY GÖKSU** hocama,

Eğitimim süresince destek olan **Dr. Öğr. Üyesi İbrahim SÖZDUTMAZ** hocama,

Ayrıca doktora eğitimine başladığım yalnızca ilk yılda beraber çalışabilmemize rağmen daha sonra da her zaman destek olup yanımda olan **Dr. Engin BERBER** hocama,

Tez çalışmaları süresince desteklerini esirgemeyen Tez İzleme Komitesi üyesi Sayın **Prof. Dr. Önder DÜZLÜ** hocama,

Saha örneklerin toplanmasında desten olan **Dr. Öğr. Üyesi Gencay EKİNCİ** ve **Dr. Öğr. Üyesi Emre TÜFEKÇİ** başta olmak üzere tüm İç Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve öğrencilerine,

Çalışmalarımda destek olan Viroloji Anabilim Dalı doktora öğrencisi **Muhammed Arif TOY** 'a, lisans öğrencisi **Hatice Eylül AKKUBAK** 'a

Bu doktora tez çalışmasının temeli Monoklonal antikor 'un kaşifleri olan Nobel ödüllü **César MILSTEIN** ve **Georges J. F. KOHLER** ' e,

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) TDK-2022-12061 kodlu proje ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 124O061 numaralı proje ile desteklenmiştir. Projeye verdiği destekten ötürü **ERÜ BAP** ve **TÜBİTAK** ' a,

Eğitim hayatım boyunca fedakârlık gösteren, desteklerini hiçbir zaman eksiltmeyen **anneme ve kardeşlerime**,

Kendisini tanıdığım günden itibaren her koşul ve şartta yanımda olan eşim **Şeyma KÖKKAYA** ' ya,

teşekkür ederim.

**KÖPEKLERDE CANİNE DİSTEMPER VİRUS ENFEKSİYONUNUN
ARAŞTIRILMASI, VİRUSA KARŞI MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİ VE
ANTİJEN ELISA GELİŞTİRİLMESİ**
Serkan KÖKKAYA

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Kasım 2024
Danışman: Doç. Dr. Ayşe GENÇAY GÖKSU**

ÖZET

Köpek gençlik hastalığı *Canidae* ailesi (köpek, çakal, kurt) olmak üzere *Ursidae* (dev panda), *Ailuroidae* (kırmızı panda), *Mustelidae* (ferret, mink), *Felidae* (aslan, leopar) gibi birçok aileyi etkileyen tüm dünyada oldukça yaygın viral bir hastalıktır. Yavru köpekler başta olmak üzere tüm yaş gruplarında görülebilmektedir. Solunum başta olmak üzere karışık bir klinik belirti gösterir. Hastalık etkeni *Canine distempervirus* (CDV) olup *Paramyxoviridae* ailesinden *Morbillivirus* genusu içerisindedir.

Bu çalışmada CDV şüpheli köpeklerden örnekler alınarak virusun varlığının araştırılması, hücre kültüründe virusun izolasyonu, virusa karşı monoklonal-poliklonal antikor üreterek antijen-ELISA geliştirilmesi amaçlanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim ve Araştırma ve Uygulama Hastanesi'ne getirilen CDV şüpheli 40 farklı köpekten kan ve swab örneği alınmıştır. RT-PCR ile doğrulanan örnekler MDCK hücre kültüründe ekim yapılarak virus izole edilmiştir. Daha sonra BALB/c dişi fareler inaktif viruslar ile immunize edilerek hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikorlar üretilmiştir. Aynı zamanda Yeni Zelanda ırkı tavşanlar yine inaktif virus ile immunize edilerek poliklonal antikorlar üretilmiştir. Üretilen monoklonal antikor HRP enzimi ile işaretlenerek geliştiren ELISA testinde konjugat olarak kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında köpek gençlik hastalığı şüpheli köpeklerden örnekler toplanılarak RT-PCR yöntemi ile doğrulama yapılmıştır. 40 farklı köpekten örnek toplanılarak 29 (%72.5) adedi pozitif olarak doğrulanmıştır. Örneklerin klinik bulgusuna göre genel tablosuna bakıldığında; hayvanların 25'i (%62.5) solunum yolu belirtili, 6'sı (%15) sinirsel belirtili, 9'u (%22.5) ise karışık (solunum+sinirsel) belirtili olarak bulunmuştur. RT-PCR sonucuna göre ise; solunum problemi olan 20 (%68.96), sinirsel problemi olan 3 (%10.34), karışık klinik tablo gösteren 6 (%20.68) olarak elde edilmiştir. Yine RT-PCR ile, yüksek ateş belirtileri (>38.5°C) gösteren 7 köpeğin 6'sı pozitif çıkarken, ateşi normal olan 33 köpeğin 23'ü pozitif olarak değerlendirilmiştir. Örneklerin alındığı 40 köpeğin yaşı 15'i (%37.5) 0-6 aylık, 11'i (%27.5), 8'i (%20) 12-24 aylık ve 6'sı (%15) >24 ay olarak kaydedilmiştir. RT-PCR testine göre bu yaş aralıklarında pozitif köpek sayısı sırasıyla; 14 (%48.27), 7 (%24.13), 5 (%17.24) ve 3 (%10.34) olarak bulunmuştur.

Pozitif örnekler MDCK hücresine adsorpsiyonlu yöntemle ekim yapılarak CPE (sitopatik etki, cytopathic effect) yönünden günlük olarak ters mikroskop altında incelenilmiş ve 8. günden itibaren yuvarlaklaşma ve vakuol şeklinde CPE'ler görülmüştür. RT-PCR ile doğrulanan örnek tekrarlı ekimlerle MDCK34388 izolatu olarak çoğaltılmıştır ve monoklonal-poliklonal antikor üretimi için kullanılmıştır. Fare izolasyonu sonrası füzyona girilmiş ve alt dilüsyon ve pasajlamalar sonucunda 1G10-

1A monoklonal antikorunu elde edilerek Protein A ile saflaştırılmıştır ve Western blot yöntemi ile CDV F proteinine karşı monoklonal antikor olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra HRP enzimi ile işaretlenerek geliştirilen Antijen ELISA testinde konjugat olarak kullanılmıştır. Antijen ELISA testi sandviç ELISA test yöntemi şeklinde tasarlanarak poliklonal ve monoklonal antikorların ayrı ayrı optimizasyonları yapılmıştır. Antijen ELISA optimizasyon sonucunda 1/200 ve 1/400 oranında konjugat; 1/1000, 1/2000 ve 1/3000 oranlarında poliklonal antikor pozitiflik görülmüştür.

Sahadan toplanan örnekler ve farklı zamanlarda izole edilen 11 farklı izolat pozitif olarak, ayrıca 40 farklı örnekte negatif olarak geliştirilen antijen ELISA testi ile araştırılmış ve geliştirilen ELISA testinin spesifite ve sensitivitesi hesaplanılmıştır. Bu sonuca göre; 36 gerçek pozitif, 5 yanlış negatif, 4 yanlış pozitif, 35 gerçek negatif tespit edilmiştir ve sensitivitesi %90, spesifitesi %87.5 belirlenilmiştir. Ayrıca yapılan istatistiksel analiz sonucu pozitif tahmin değeri %87.8, negatif tahmin değeri ise %89.74 olarak belirlenilmiştir. Fisher's Exact test yöntemine göre ise *p değeri* anlamlı ($p<0.05$) çıkmıştır.

Bu sonuçlar bölgemizde yaygın olan köpek gençlik hastalığının hazır test kitleri ve RT-PCR yöntemleri ile birlikte geliştirilen antijen ELISA testinin CDV' nin tespitinde kullanılabileceğini göstermiştir.

Anhtar kelimeler: Canine distempervirus; Monoklonal antikor; Hibridoma teknolojisi; ELISA; Poliklonal antikor

INVESTIGATION OF CANINE DISTEMPER VIRUS INFECTION IN DOGS, PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST THE VIRUS, AND DEVELOPMENT OF ANTIGEN ELISA

Serkan KÖKKAYA

Erciyes University, Institute of Health Sciences
Department of Veterinary Microbiology
PhD Thesis, November 2024
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe GENÇAY GÖKSU

ABSTRACT

Canine Distemper is a widespread viral disease affecting various animal families, including *Canidae* (dogs, jackals, wolves), *Ursidae* (giant pandas), *Ailuridae* (red pandas), *Mustelidae* (ferrets, minks), and *Felidae* (lions, leopards). While it can affect animals of all ages, puppies are particularly susceptible. The disease primarily manifests with respiratory symptoms, though it can present a mix of clinical signs. The disease agent is *Canine distempervirus* (CDV) and is in the *Morbillivirus* genus of the *Paramyxoviridae* family.

This study aimed to investigate the presence of CDV in suspected dogs, isolate the virus in cell culture, and develop an antigen-ELISA using monoclonal and polyclonal antibodies. Blood and swab samples were collected from 40 dogs with suspected CDV at Erciyes University's Veterinary Medicine Faculty Hospital. RT-PCR-confirmed samples were cultured in MDCK cells for virus isolation. BALB/c female mice and New Zealand rabbits were immunized with inactivated viruses to produce monoclonal and polyclonal antibodies, respectively. The monoclonal antibody was labelled with HRP enzyme for use in the ELISA test.

Of the 40 sampled dogs, 29 (72.5%) tested positive for CDV. Clinical findings showed 62.5% with respiratory symptoms, 15% with nervous symptoms, and 22.5% with mixed symptoms. RT-PCR results revealed that 68.96% had respiratory issues, 10.34% had neurological problems, and 20.68% presented mixed clinical pictures. Most positive cases were found in dogs aged 0-6 months (48.27%).

Positive samples were cultured on MDCK cells with the adsorption method and examined daily under an inverted microscope for CPE. CPEs in the form of rounding and vacuoles were observed starting from the 8th day. The MDCK34388 isolate was used for monoclonal-polyclonal antibody production. The 1G10-1A monoclonal antibody was developed and confirmed with Western blot to target the CDV F protein. An antigen ELISA test was optimized using both monoclonal and polyclonal antibodies. Samples collected from the field and 11 isolates isolated at different times were screened as positive, and 40 different samples as negative with the antigen ELISA test developed. According to this result, 36 true positives, four false negatives, five false positives, and 35 true negatives were detected. The sensitivity of the developed antigen ELISA test was determined as 90% and the specificity as 87.5%. In addition, the positive predictive value was determined as 87.8% and the negative predictive value as 89.74% as a result of the statistical analysis. According to Fisher's Exact test method, the *p-value* was found to be significant.

These findings suggest that the developed antigen ELISA test, alongside existing test kits and RT-PCR methods, can be effectively used for CDV detection in our region.

Key Words: Canine distempervirus; Monoclonal antibody; Hybridoma technology; ELISA; Polyclonal antibody



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL VE ONAY	iii
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Köpek Gençlik Hastalığı	2
2.1.1. Etiyoloji.....	2
2.1.2. Virion Özellikleri	3
2.1.3. Hücre Kültürü ve Virusun Kullandığı Reseptörler	9
2.1.4. Replikasyon Stratejisi	10
2.1.5. Epidemiyoloji.....	11
2.1.6. Patogenez	13
2.1.7. Klinik Bulgular	13
2.1.8. Teşhis Yöntemleri	15
2.1.9. Kontrol ve Korunma, Kimyasal ve Fiziksel Ajanlara Duyarlılık	16
2.1.10. Türkiye’de CDV Çalışmaları	16
2.2. İmmun Sistem ve Monoklonal Antikorlar.....	17
2.3. Enzim Bağlı İmmunosorbent Testi (ELISA).....	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1. Çalışma İzni.....	23
3.2. Kullanılan Hayvanlar ve Örneklerin İşlenmesi	23
3.3. Virolojik Çalışma	24
3.3.1. Kullanılan Hücreler ve Vasatlar.....	24
3.3.2. Hücre Kültürü Üretimi	24
3.3.3. Virus İzolasyonu	25

3.3.4.	Virus İdentifikasyonu.....	25
3.3.5.	Virus İzolatının Moleküler Karakterizasyonu ve Biyoinformatik Analiz.....	28
3.3.6.	Polietilen Glikol 8000 ile Virus Konsantre Edilmesi.....	29
3.3.7.	Konsantre Protein Miktarının Ölçülmesi	30
3.3.8.	Virus İnaktivasyonu	30
3.4.	Monoklonal Antikor Üretimi.....	31
3.4.1.	Fare İmmünizasyonu	31
3.4.2.	Miyeloma Hücrelerinin Hazırlanması.....	34
3.4.3.	Makrofaj Hücrelerinin Hazırlanılması	35
3.4.4.	Füzyon.....	37
3.4.5.	Pozitif Klonların Belirlenmesi ve Çoğaltılması	40
3.4.6.	Antikor Saflaştırılması	41
3.4.7.	SDS ve Western Blot Yöntemi	43
3.5.	Poliklonal Antikor Üretimi.....	48
3.5.1.	Tavşan İmmünizasyonu	48
3.5.2.	Tavşan Poliklonal Antikorların Titrelerinin Belirlenmesi	48
3.5.3.	Tavşan Poliklonal Antikorumun Saflaştırılması	50
3.6.	Saflaştırılmış Monoklonal Antikorların HRP Enzimi ile İşaretlenmesi.....	51
3.7.	Antijen ELISA Testinin Geliştirilmesi.....	52
3.8.	Antijen ELISA ile Örneklerin Taranması.....	54
3.9.	Antijen ELISA Testinin İstatistiksel Sonuçları	55
4.	BULGULAR.....	56
4.1.	Köpeklerden Elde Edilen Örnekler ve PCR ile Doğrulanması	56
4.2.	Virus İzolasyonu ve İdentifikasyonu.....	59
4.3.	Virus İzolatının Moleküler Karakterizasyonu ve Biyoinformatik Analiz.....	61
4.4.	Polietilen Glikol ile Virus Konsantrasyonu ve Bradford Protein Testi ile Virus Miktarının Ölçülmesi	62
4.5.	Virus İnaktivasyonu	63
4.6.	Monoklonal Antikor Üretimi.....	64
4.6.1.	Fare İmmünizasyonları.....	64
4.6.2.	Füzyon.....	67
4.6.3.	Pozitif Klonların Belirlenmesi ve Çoğaltılması	72

4.6.4.	Monoklonal Antikor Saflaştırılması ve Protein Ölçümü	74
4.6.5.	Western Blot ile Monoklonal Antikor Tıp Tayini.....	77
4.7.	Poliklonal Antikor Üretimi.....	78
4.7.1.	Tavşan İmmunizasyonları	78
4.7.2.	ELISA ile Tavşan Poliklonal Antikor Titresi Belirleme.....	78
4.7.3.	Poliklonal Antikor Saflaştırma.....	80
4.8.	Konjugat Optimizasyonu ve Antijen ELISA Geliştirilmesi.....	81
4.9.	Antijen ELISA ile Örneklerin Taranması.....	84
4.10.	Antijen ELISA' nın İstatistiksel Sonuçları	87
5.	TARTIşMA	89
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	97
7.	KAYNAKLAR	99
	ÖZGEÇMİş	114

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. <i>Canine distempervirus'</i> un taksonomik sınıflandırılması.....	3
Tablo 2.2. CDV protein ve genlerinin özellikleri.....	5
Tablo 2.3. HAT ortamındaki hücrelerin durumu.	20
Tablo 3.1. cDNA karışımı.	27
Tablo 3.2. RT-PCR için primerler.	27
Tablo 3.3. PCR karışımı.	27
Tablo 3.4. Makrofaj hücreleri için hazırlanılan vasat.	36
Tablo 3.5. HAT besiyeri için hazırlanılan karışım ve oranları.....	39
Tablo 3.6. HT medyumun hazırlanılması ve oranları.	41
Tablo 3.7. Resolving jel hazırlama.....	44
Tablo 3.8. Stacking jel hazırlama.	44
Tablo 4.1. Örnek alınan köpeklerin genel klinik bilgileri.	56
Tablo 4.1. Devam	57
Tablo 4.1. Devam	58
Tablo 4.2. HAT besiyeri için hazırlanılan karışım ve oranları.....	70
Tablo 4.3. HT besi yeri.....	73
Tablo 4.4. Saflaştırma sonrası ürünlerin Bradford testi sonucu.	76
Tablo 4.5. Antijen ELISA testi optimizasyonu sonucu cut-off değerleri.....	84
Tablo 4.6. RT-PCR ve Geliştirilen Antijen ELISA sonuçlarının karşılaştırılması.	88
Tablo 4.7. Graphpad Prism 10 programında RT-PCR ve geliştirilen Antijen ELISA testine göre istatistiksel sonuçlar	88

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: <i>Morbillivirus canis</i> ’ in şematik gösterimi.	4
Şekil 2.2. CDV proteinleri.	4
Şekil 2.3. Morbillivirusların replikasyon stratejisinin şematik gösterimi	11
Şekil 2.4. <i>Morbillivirus</i> genusunda bulunan virus türleri ve konakçıları	12
Şekil 2.5. CDV ile enfekte olmuş köpekten enfeksiyon modeli.	15
Şekil 2.6. CDV test yöntemleri tarihsel süreci	16
Şekil 2.7. Antikorların yapısı; salgılanan IgG (A) ve membrana bağlı IgM (B)'nin şematik gösterimi	19
Şekil 2.8. ELISA yöntemlerinin şematik gösterimi.	22
Şekil 3.1. CDV ile fare immunizasyondan füzyon işlemine kadar sürecin şeması.	31
Şekil 3.2. İmmunizasyon şeması.....	32
Şekil 3.3 İmmunize farelerin antikor titrelerini belirlemek için dilüsyon oranları	33
Şekil 3.4. Fareden makrofaj eldesi için periton içi RPM1640 vasatından enjekte edilmesi.	36
Şekil 3.5. Fare sakrifikasyonu sonrası elde M1 vasatı içerisindeki dalak.	37
Şekil 3.6. SDS PAGE için hazırlanılan Biorad sistem.	45
Şekil 3.7. Camlar Western blot sistemine yerleştirip örnekler eklenildikten sonra.	45
Şekil 3.8. Western blot transfer aşaması şeması.	47
Şekil 3.9. Tavşan immunizasyon şeması.	48
Şekil 3.10. Tavşan immunizasyonları sonrası antikor titreleri için serumların sulandırılması ve örneklerin ELISA pleytine eklenilme şeması	49
Şekil 3.11. Geliştirilen Antijen ELISA testi şeması.	53
Şekil 3.12. Antijen ELISA testi için optimizasyon şeması.	53
Şekil 3.13. Antijen ELISA için pleytletlere örneklerin yüklenmesi.	54
Şekil 4.1. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi’ne gelen CDV pozitif köpekler.	56

Şekil 4.2. Örnek toplanan köpeklerin genel özellikleri.	58
Şekil 4.3. (a) RT-PCR yapılan bazı örnekler.	59
Şekil 4.3.(b). RT-PCR yapılan bazı örnekler.....	59
Şekil 4.4. RT-PCR sonuçları.....	60
Şekil 4.5. MDCK hücrelerine ekilen virusun 8. günde görüntüsü..	61
Şekil 4.6. Filogenetik ağaç ve suşlara göre renklendirme.	62
Şekil 4.7. PEG 8000 ile konsantre edilen MDCK34388 izolatı Bradford protein testi ile sonucu.....	62
Şekil 4.8 İnaktivasyon sonrası hücre kontrolü.....	63
Şekil 4.9. İnaktivasyon sonrası farklı günlerde RT-PCR sonucu agaroz jel görüntüsü..	63
Şekil 4.10. Fare immunizasyonları.	64
Şekil 4.11. Fare immunizasyonları sonrası Antikor ELISA sonuçları..	65
Şekil 4.12. MDCK-34388 ile immunize edilen farelerin antikor titreleri.....	66
Şekil 4.13. Tripan mavisi içerisinde hücre sayımı.	67
Şekil 4.14. Makrofajların 10x büyümede ters mikroskoptaki görüntüsü.	67
Şekil 4.15. F0 miyeloma hücrelerinin Füzyon günü görüntüsü.	68
Şekil 4.16. Füzyon işlemi için fare dalak hücrelerinin çıkarılması.....	69
Şekil 4.17. Makrofaj hücrelerinin üzerlerine füzyon sonrası F0: splenosit hücrelerin eklendikten sonraki görüntü.	70
Şekil 4.18. Füzyon işlemi sonrası HAT ortamında klonların oluşması.	71
Şekil 4.19. Pozitif klonların ELISA testi..	72
Şekil 4.20. Pozitif klonların alt dilüsyonları ELISA testi.	73
Şekil 4.21. Amonyum sülfat ile antikor konsantrasyonundan Protein G ile antikor saflaştırmasına kadar geçen işlemler.	75
Şekil 4.22. Saflaştırma sonrası Bradford protein testi.	76
Şekil 4.23. SDS-PAGE görüntüsü..	77
Şekil 4.24. Kemilüminesans görüntüleme sonrası.....	77

Şekil 4.25. Tavşan immunizasyonlarının kas içi uygulaması.	78
Şekil 4.26. İmmunizasyon sonrası tavşan poliklonal antikor dilüsyonlarının ELISA sonucu.....	79
Şekil 4.27. İmmunizasyon sonrası pAb dilüsyonları.	80
Şekil 4.28. Protein G kolonu ile pAb saflaştırma.	80
Şekil 4.29. pAb saflaştırma sonrası protein miktar analizi.	81
Şekil 4.30. Antijen ELISA testi optimizasyonu.....	83
Şekil 4.31.b. Örneklerin geliştirilen Antijen ELISA yöntemi ile taranması.....	86
Şekil 4.32. ELISA sonuçlarına göre pozitif ve negatif örnekler.....	87

KISALTMALAR

μm	: Mikro Molar
APS	: Amonyum Persülfat
BALB/C	: Bagg Albino Fare
BSA	: Sığır Serum Albümini
CD	: Cluster Of Differentiation (Farklılaşma Kümesi)
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
CDV	: Canine Distemper Virus
Cm	: Santimetre
CO_2	: Karbondioksit
CPE	: Sitopatik Etki
Da	: Dalton
ddH ₂ O	: Otoklav Edilmiş Distile Su
dH ₂ O	: Distile Su
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoxynucleotide Triphosphate
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA	: Enzim Bağlı İmmunosorbent Testi
FBS	: Fetal Sığır Serum
FCA	: Freund's Complete Adjuvant
HAT	: Hipoaksantin-Aminopterin-Timidin
HeLa	: Henrietta Lacks Hücre Hattı
HGPRT	: Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase

HRP	: Horseradish Peroksidaz Enzimi
HT	: Hipoaksantin-Timidin
ICTV	: Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi
IFA	: Freund's Incomplete Adjuvant
Kda	: Kilo Dalton
KGH	: Köpek Gençlik Hastalığı
LRP-6	: Lipoprotein Receptor-Related Protein 6
mAb	: Monoklonal Antikor
MDCK	: Madin Darby Canine Kidney Hücre Hattı
ml	: Mililitre
mM	: Mili Molar
NaCl	: Sodyum klorür
nm	: Nano Metre
OD	: Optik Dansidite
pAb	: Poliklonal Antikor
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	: Polietilen Glikol
PVDF	: Polivinil Diflorür
RIA	: Radyo Immunoassay
RNA	: Ribonükleik Asit
Rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute Mediumu
RT-PCR	: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel

SLAM	: Signaling Lymphocyte Activation Molecule
TEN	: Tris-EDTA-NaCl Solüsyonu
TMB	: Tetramethylbenzidine
UV	: Ultra Violet Işın



*Başta **Şehitler** ve **Gaziler** olmak üzere;
varlığını armağan ettiğim Yüce **Türk** milletine...*

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Köpek gençlik hastalığı (Canine distemper, CD), köpeklerde oldukça yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan, tüm dünyada yaygın olarak görülen viral bir hastalıktır. Özellikle aşılanmamış yavru köpeklerde solunum, sindirim ve sinir sistemlerini multisistemik olarak etkileyebilmektedir. Aşılar ile kontrol önemli olmasına rağmen coğrafi bölgelere göre değişen H genine bağlı gerçekleşen mutasyonlardan kaynaklı suşları bulunmaktadır. Bu durum sonucunda köpeklerde Kuduz hastalığından sonra en yaygın görülen ikinci hastalık özelliği taşımaktadır (Deem ve ark., 2000). Bu bağlamda, köpek gençlik hastalığına karşı yeni ve etkili teşhis ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Monoklonal antikorlar (mAb) hedeflenen antijenin epitop bölgesine yüksek özgüllük ile bağlanabilen, laboratuvar ortamında üretilmesi mümkün olan spesifik antikorlardır. 1970'lerde (Köhler ve Milstein, 1975) geliştirilen ilk mAb' lardan sonra günümüze kadar kanser, bakteriyel ve viral hastalıklar olmak üzere birçok alanda teşhis ve tedavi yöntemleri olarak kullanılmaktadır.

ELISA antijen-antikor reaksiyonuna dayanan mAb'lar ile aynı tarihlerde geliştirilmiş olan bir laboratuvar teşhis yöntemidir. Hastalıkların teşhislerinin yanı sıra, antikor taramaları ile aşıların etkinliği, hastalığın yaygınlığı gibi birçok epidemiyolojik alanda kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı; köpeklerde CDV' nin varlığını araştırmak, sahadan elde edilen örnekleri hücre kültüründe çoğaltıp izolata karşı mAb üretmek ve virusa karşı antijen ELISA geliştirmektir. Bu bağlamda, mAb üretilen at turpu peroksidaz (Horse radish peroksidaz; HRP) enzimi ile işaretlemek, pAb üretilen yakalayıcı antikor olarak kullanmak, istatistiksel hesaplamalar ile çalışmayı sonlandırmak hedeflenilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Köpek Gençlik Hastalığı

Köpek gençlik hastalığı (KGH) başta köpekler olmak üzere yaklaşık 20 alt türü etkileyen bir hastalıktır. 1700' lü yıllara kadar varlığı bilinmekle birlikte hastalığın ilk bildirisi 1746 yılında İspanya'da olmuştur (Blancou, 2004). İlk defa Carre tarafından etkenin virus olduğu bildirilmesine rağmen hastalık etkeninin virus olduğu 1926 yılında ispatlanmıştır (Laidlaw ve Dunkin, 1926). Köpek gençlik hastalığının Kuduzdan sonra köpekler için ikinci ölümcül hastalık olduğu düşünülmektedir (Deem ve ark., 2000). Distemper kelime anlamı olarak İngilizcede ruh halinin (mizahın) dengesinin bozulması anlamına gelen “*distemperen*” kelimesinden ve ayrıca Latince “*dis*” ve “*temperare*” kelimelerinden oluşmuş “düzgün karışmamak” anlamında da türetilmiştir (Nandita, 2016). Ayrıca hastalık hardpad disease olarak da bilinmektedir (Terio ve Craft, 2013).

2.1.1. Etiyoloji

KGH etkeni, *Morbillivirus canis*'tir. Uzun yıllardır Canine distempervirus olarak adlandırılan hastalık etkeni 2016 yılında *Canis morbillivirus*, 2022 yılında ise *Morbillivirus canis* olarak yeniden adlandırılmıştır (ICTV, 2024). CDV, *Paramyxoviridae* ailesinde bulunup bu ailede *Avulavirinae*, *Metaparamyxovirinae* *Orthoparamyxovirinae* ve *Rubulavirinae* alt aileleri bulunmaktadır. CDV *Orthoparamyxovirinae* alt ailesinde bulunup bu alt ailede *Aquaparamyxovirus*, *Ferlavirus*, *Henipavirus*, *Jeilong virus*, *Morbillivirus*, *Narmovirus*, *Respirovirus*, ve *Salemvirus* olmak üzere 8 adet genus bulunmaktadır.

Morbilliviruslar hem insanlar için hem de hayvanlar için oldukça önemli virus gruplarını içermektedir; *Kızamık virusu (Morbillivirus hominis)*, *Sığır vebası virusu (Morbillivirus pecoris)*, *Küçük ruminant vebası virusu (Morbillivirus caprinae)*, *Kedi morbillivirusu (Morbillivirus felis)*, *Fokgillerin morbillivirusu (Morbillivirus phocae)*

ve *Deniz memelilerinin morbillivirusu (Morbillivirus ceti)* bu genusun diğer üyeleridir (ICTV, 2024). *Canine distempervirus'* un taksonomik sınıflandırılması (ICTV, 2024) Tablo 2.1. de bildirilmiştir.

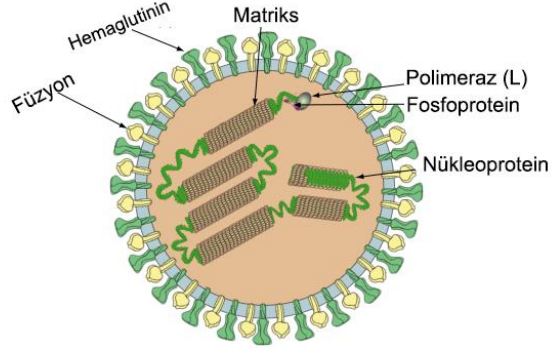
Tablo 2.1. *Canine distempervirus'* un taksonomik sınıflandırılması (ICTV, 2024).

Taksonomik Sınıf	Taksonomik İsim
Alem	<i>Riboviria</i>
Krallık	<i>Orthornavirae</i>
Şube	<i>Negarnaviricota</i>
Alt Şube	<i>Haploviricotina</i>
Sınıf	<i>Monjiviricetes</i>
Dizi	<i>Mononegavirales</i>
Aile	<i>Paramyxoviridae</i>
Alt Aile	<i>Orthoparamyxovirinae</i>
Genus	<i>Morbillivirus</i>
Tür	<i>Morbillivirus canis (Canine distempervirus)</i>

2.1.2. Virion Özellikleri

Morfoloji

Morbilliviruslar genetik olarak birbirlerine benzerler. Morfolojisi, genleri ve transkribe ettikleri proteinleri benzerdir. Virus çapı 150-300 nm arasında değişmekte olup, helikal bir nükleokapsid ve onu çevreleyen bir zarf morfolojisine sahiptir (Pardo ve ark., 2005; Rendon-Marin ve ark., 2019). Bu nedenle de deterjanlara, UV ışınlarına ve çevre koşullarına karşı oldukça hassastır ve hızlıca inaktif olurlar (Yeşilbağ, 2017). Şekil 2.1. de virionun morfolojisi verilmiştir.



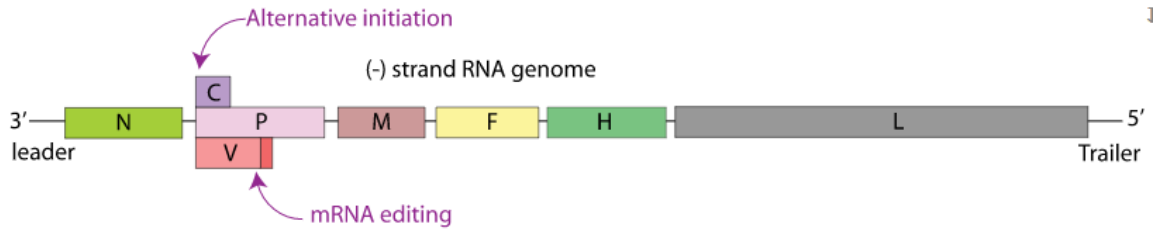
Şekil 2.1. *Morbillivirus canis* ' in şematik gösterimi. (Viralzone, 2024)

Nükleik asit

CDV genomu 15690 baz nükleik asite sahiptir. Nükleik asiti tek iplikçikli (single strand, ss) RNA olup, negatif polariteli ve segmentsizdir (MacLachlan ve ark., 2016)

Proteinler

Morbillivirus canis, 6 yapısal ve 2 yapısal olmayan protein olmak üzere toplam 8 proteine sahiptir. Yapısal proteinler; hemagglutinin (H), füzyon (F), Nükleokapsid (N), Matrix (M), Polimeraz (L) ve Fosfoprotein (P)'dir. Yapısal olmayan proteinler ise P proteini geni tarafından kodlanan C ve V proteinleridir (Şekil 2.2.) Her bir proteinin kendine özgü moleküler ağırlığı, amino asit sayısı bulunmaktadır (Tablo 2.2.).



Şekil 2.2. CDV proteinleri. (ViralZone, 2024)

Tablo 2.2. CDV protein ve genlerinin özellikleri. Kullanılan gen özellikleri GenBankID: NC_001921.1 referans suşundan alınmıştır.

Protein	Nükleotit Sırası	Aminoasit Sayısı	Moleküler Ağırlığı (Da)	UniProt tabanı Numarası	Veri Protein
N protein	108-1679	523	58139	P04865	
P protein	1801-3324	507	54349	A0A6B7FIL1	
M protein	3432-4439	335	37774	P06943	
F protein	4935-6923	662	72971	P12569	
H protein	7079-8893	604	67988	P24306	
L protein	9030-15584	2184	248190	P24658	

Nükleokapsid Protein (N)

Paramyxovirusların RNA'sı çıplak değildir ve N proteini ile kaplanmıştır (Gassen ve ark., 2000). N protein geni 15690 bazlık virusun 108-1679 nükleotitleri arasında bulunur (GenBankID: NC_001921.1 referans suş). Ayrıca protein 523 aminoasitten oluşup moleküler ağırlığı ise 58139 Dalton (Da)'dur (UniProt, P04865). N proteini replikasyon sırasında ilk transkribe edilen proteindir. Paramyxoviruslarda N proteini temelde katlanmış bir yapı N_{core} ve düz bir kuyruk olan N_{tail} olmak üzere iki yapıdan oluşur. N_{core} daha çok RNA'nın oligomerizasyonundan ve nükleokapsidin ana gövdesinden sorumlu iken, N_{tail} polimeraz kompleksinden sorumludur (Bloyet, 2021). Bunun yanı sıra N_{tail} nükleokapsidden çıkıntı yaparak hücrel proteinlerle etkileşime girebilir (Iwasaki ve ark., 2009).

N proteininin RNA'ya sarmal bir şekilde bağlanması, viral mRNA'nın komplementer genomik RNA'ya bağlanmasını en aza indirme ve nükleazların etkisinden korunmasını sağlaması gibi birçok etkisi bulunmaktadır. Ayrıca yeni oluşan nükleokapsidlerin tomurcuklanan virionların içerisine assembly'sinde rol aldığı düşünülmektedir (Liu, 2014). Bunların dışında ise diğer viral yapıların eksikliğinde N proteini kendi kendine birleşme özelliğinden dolayı nükleokapsid benzeri yapı oluşturabilir (Bloyet, 2021; Liu, 2014).

CDV' nin otofaji üzerine yapılan bir çalışmada ise UV ile inaktive edilen virusta N proteininin mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*)'a bağlı bir şekilde otofajiyi indüklediği görülmüştür. Böylece viral replikasyonu kolaylaştırdığı kanıtlanmıştır (Chen ve ark., 2023).

Fosfoprotein (P)

P proteini, N proteini ile birlikte RNA'nın kapsüllenmesi için gereklidir ve RNA polimeraz enziminin önemli bir bileşenidir (Devaux ve Cattaneo, 2004; Horikami ve ark., 1992). P protein geni 1801-3324 nükleotitleri arasında bulunur (GenBankID: NC_001921.1 referans suş). Ayrıca 507 aminoasitten oluşup moleküler ağırlığı ise 54349 Da' dır (UniProt A0A6B7FIL1). P proteinin C terminal ucu L proteini ve N proteini ile bağlıdır. Bu üç protein eşsiz bir RNA kompleksi oluşturur (Ribonucleoprotein, RNP) ve mRNA transkripsiyonu için önemlidir (MacLachlan ve ark., 2016).

P proteini replikasyondan sorumlu olmayan ama konakçı immun sisteminden kaçmada etkili olan ve yapısal olmayan C ve V protein genlerini sentezler (Tao ve ark., 2020). V protein RNA editlemede birlikte transkribe ederken, açık okuma çerçevesi (open reading frame, ORF) üzerinde sunulur (Gassen ve ark., 2000). Yapılan bir çalışmada V proteininin virusun lenfositlerin etkinliğini azaltarak replikasyonunu desteklediği, C proteinin ise enfeksiyonun daha sonraki aşamalarında görev aldığı gösterilmiştir (Messling ve ark., 2006). V proteini nükleer faktör kappa B' yi (NF- κ B) aktive ederek ve tip 1 ve 2 interferonları inhibe ederek doğuştan gelen bağışıklık sisteminin tepkisini de bastırmaktadır (Chinnakannan ve ark., 2013; Schuhmann ve ark., 2011) . Ayrıca Devaux ve Cattaneo ise C proteininin assembly işleminde ve infektivitede rol aldığını göstermişlerdir (Devaux ve Cattaneo, 2004).

Matriks Protein (M)

Paramyxoviruslarda M proteini oldukça bol bulunur ve plazma membranı ile ilişkilidir. M protein geni 3432-4439 nükleotitleri arasındadır (GenBankID: NC_001921.1 referans suş). Ayrıca 335 aminoasitten oluşup moleküler ağırlığı ise 37774 Da'dır (UniProt P06943).

M proteini sitoplazmada sentez edildikten sonra viral replikasyon da görev alır. Aynı zamanda assembly'de de önemli rol oynamaktadır. (Bringolf ve ark., 2017; Iwasaki ve ark., 2009). M proteini RNP ile ilişkili olup onu viral zarfa bağlayarak virus partiküllerinin saçılmasında önemlidir (Tao ve ark., 2020).

Kızamık virusu üzerine yapılan bir çalışmada M proteininin inaktivasyonu sonucu virusun persiste olabileceği düşünülmektedir (Liu, 2014).

Füzyon Protein (F)

F protein viral zarfın yüzeyinde bulunup füzyonda görev almaktadır. Bu füzyon sayesinde de replikasyon sonrası genelde dev hücreler (sinsityumlar) oluşur (Martella ve ark., 2008). F proteini geni 4935-6923 nükleotitleri arasında bulunur (GenBankID: NC_001921.1 referans suş). Ayrıca 662 aminoasitten oluşup moleküler ağırlığı ise 72971 Da'dır (UniProt P12569).

Füzyon proteini çoğu Paramyxoviruslarda sınıf 1 glikoprotein yapısındadır ve bu sınıfta retroviruslar, filoviruslar, orthomyxoviruslar ve coronaviruslar bulunmaktadır (Colman ve Lawrence, 2003).

Morbillivirusların F proteini yüksek oranda benzerlik göstermektedir. F proteini F1 ve F2 olarak alt ünitelere ayrılmış olup, ayrılma bölgesi tüm Morbilliviruslarda aynı amino asit dizilimine (R-R-H-K-R) sahiptir (Lee ve ark., 2010; Morrison, 2003). F protomerleri başlangıçta uzun ve inaktif öncüler olarak sentezlenir. Trimerik füzyona uygun disülfür bağları içeren F1 ve F2 alt birimlerini elde etmek için, Golgi aygıtındaki furin proteazları tarafından bölünmeleri gerekir. Trimerik F kompleksleri, genellikle yarı kararlı olan prefüzyon konformasyonu olarak adlandırılır. İyi karakterize edilmiş F protomerleri, (i) bir N-terminal sinyal peptidi, (ii) N- ve C-terminal yedili tekrar (HRA ve HRB) alanları, (iii) bir transmembran bölgesi ve (iv) bir C-terminal sitozolik kuyruktan oluşan fonksiyonel alanlar içerir. Bunların dışında proteolitik bölünme sonucunda, füzyon peptidi (FP) olarak da bilinen yeni bir N-terminal hidrofobik bölge üretilir (Lozada ve ark., 2021; Plattet ve ark., 2016).

Hemagglutinin Protein (H)

H proteini F proteini ile birlikte kapsid yüzeyinde bulunur ve glikoprotein yapısındadır. *Paramyxoviridae* ailesinin bazılarında (*Respirovirus*) H proteininin Nörominidaz (N)

aktivitesi bulunmaktadır ve protein HN şeklindedir. *Henipavirus*, *Jeilongvirus* ve *Narmovirus* genusunun bazılarında ise H veya HN şeklinde değil sadece bir glikoprotein (G) yapısındadır. Ancak *Morbillivirus* ve *Narmovirus* genusunun bazılarında N aktivitesi bulunmayıp yalnızca H şeklindedir (Rima ve ark., 2019).

H proteini kanı aglutine etme özelliğine sahiptir. N aktivitesi ise yeni virionların hücreden ayrılmasını sağlar (karbonhidratlardan sialik asit reseptörlerini ayırarak). G proteininin ise hemaglutinin özelliği ve nörominidaz aktivitesi bulunmayıp yalnızca reseptöre bağlanma özelliğine sahiptir (El Najjar ve ark., 2014).

H proteini geni 7079-8893 nükleotitleri arasında bulunur (GenBankID: NC_001921.1 referans suş). Ayrıca 604 amino asitten oluşup moleküler ağırlığı ise 67988 Da'dır (UniProt P24306).

CDV H geni, tüm Morbilliviruslar içerisinde en yüksek değişkenliğe sahip gendir (Pomeroy ve ark., 2008). CDV' nin birçok filogenetik analizi H geni ile yapılmıştır. Becker ve ark. eğer tam sekanslama yapılamayacaksa filogenetik analizinde en uygun genin H geni olduğunu in siliko analizlerle belirlemişlerdir (Becker ve ark., 2023). von Messling ve ark. tarafından füzyon reaksiyonu için F proteininin yanında H proteininin de majör belirleyici olduğunu gösterilmiştir (von Messling ve ark., 2001).

Large Polimeraz Protein (L)

Paramyxoviridae ailesinde L protein en büyük protein olma özelliğine sahiptir. RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) alanı, poliribonükleotid-transferaz alanı (PRNT veya capping alanı) ve metiltransferaz (MTase) alanı olmak üzere üç farklı korunmuş enzimatik alan barındırır (Valle ve ark., 2020). L proteini 3' ucuna poli-A kuyruğunun eklenmesini ve metilasyonunu sağlar (Green ve Luo, 2009; Liu, 2014). Large protein viral RNA bağımlı RNA transkriptaz aktivitesi (vRNAP) ile ilişkilidir. N ve P proteinleri ile birlikte RNP kompleksini oluştururlar (von Messling ve ark., 2001). N proteini RNA'ya bağlı olduğu halde L proteini N-RNA kompleksine kofaktör rolü gören P proteini olmadan bağlanamaz (Green ve Luo, 2009). RNP' nin özelliği ise kompleks oluşup sitoplazmaya geçiş yaptıktan sonra viral enfeksiyon başlatmasıdır (Liang ve ark., 2015). L proteini geni 9030-15584 nükleotitleri arasında bulunur (GenBankID: NC_001921.1 referans suş). Ayrıca 2184 aminoasitten oluşup moleküler ağırlığı ise 248190 Da' dır (UniProt P24658).

Bunun yanı sıra L proteinin C proteini ile bağlandığı görülmüştür. Bu bağlanma, RNA sentezinin inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir (Liu, 2014).

2.1.3. Hücre Kültürü ve Virusun Kullandığı Reseptörler

Morbillivirusların reseptör çalışmaları ilk defa 1993 yılında yapılmıştır (Naniche ve ark., 1993). Bu çalışmada Human membran kofaktör proteine (CD46) karşı geliştirilmiş olan monoklonal antikorun *Kızamık virusu*' nun enfeksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiş olup virusun CD46'yı kullandığı belirtilmiştir. Ancak bu reseptörü virusun Edmonston suşunun kullandığı, vahşi tip virusların kullanmadığı gözlemlenmiştir (Romanets-Korbut ve ark., 2016).

CDV, replikasyon mekanizması için temelde iki hücre reseptörü kullanır; *Signaling Lymphocyte Activation Molecule* (SLAM, CD150) reseptörü ve *Nectin-4* reseptörü (CD46, *poliovirus receptor-like protein 4* (PVRL4)) (von Messling ve ark., 2005; Pratakipiriya ve ark., 2012). SLAM reseptörü genelde aktif T ve B lenfositleri, makrofajlar ve dentritik hücrelerin yüzeylerinde bulunurken epitelyal hücrelerde bulunmaz (Rendon-Marin ve ark., 2019). Nectin-4 ise polarize endotelial hücrelerin apikal- bazolateral yüzeylerinde ve merkezi sinir sisteminde bulunur (Mühlebach ve ark., 2011; Noyce ve ark., 2011). Merkezi sinir sisteminde Nectin-4'ün varlığı özellikle koroid pleksusun epitelyal hücrelerinde, meningeal hücrelerde, nöronlarda, granüler hücrelerde ve purkinje hücrelerinde bildirilmiştir. Morbilliviruslar genelde öncelikle SLAM reseptörünü kullanarak hematopoetik hücrelerini, daha sonra ise Nectin 4 reseptörü kullanarak üst solunum yollarını ve diğer hücreleri enfekte ederler (Siering ve ark., 2021) .

Lan ve ark. Onderstepoort suşunu SLAM veya Nectin-4 reseptörleri olmaksızın Vero hücresine adapte etmeyi başarmışlardır (Lan ve ark., 2005). Bunun yanı sıra, atenüe CDV'lerde lipoprotein reseptör ilişkili proteinin (*lipoprotein receptor-related protein 6*, LRP6) SLAM veya Nectin-4 reseptörü dışında fonksiyonel bir reseptör olduğu gösterilmiştir (Gradauskaite ve ark., 2023).

Virusun üretilmesi için genelde Vero ve MDCK hücreleri kullanılmıştır. Ancak bu hücrelere virusu adapte etmek genelde zor olduğu için rekombinant teknoloji kullanılarak SLAM ve Nectin-4 reseptörleri birçok hücre hattına transfekte edilerek hücre kültür çalışmaları yapılabilmektedir. Bunun için bu hücre kültürlerinin yanı sıra

HeLa gibi insan hücre kültürlerinde de rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak SLAM reseptörü eklenilip virus üretilmesi gerçekleştirilmiştir (Siering ve ark., 2021; Sultan ve ark., 2009) .

2.1.4. Replikasyon Stratejisi

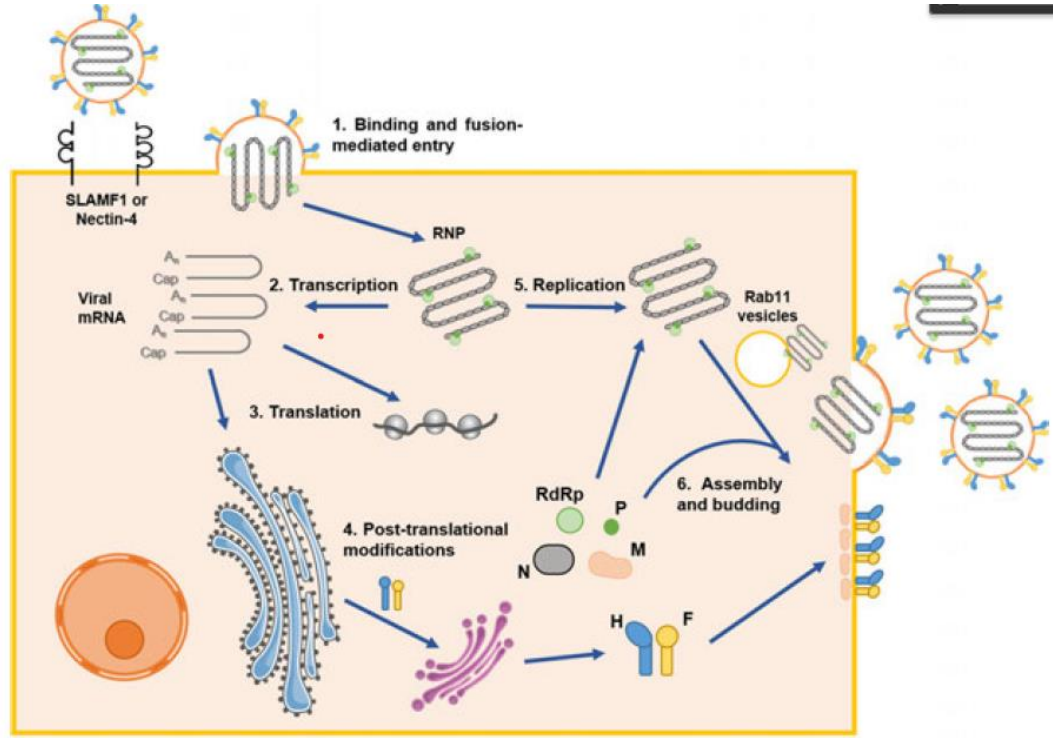
Tüm *Paramyxoviridae* ailesi RNA genomuna sahip olduğu için viral replikasyon hücre sitoplazmasında gerçekleşir.

CDV, öncelikle lenfoid dokuda ve üst solunum yollarında replike olur. Daha sonra 1-2 hafta boyunca immün-sistem ilişkili bir şekilde hastalık ilerler (Kapil ve Yeary, 2011).

Paramyxoviruslar genelde litik enfeksiyona neden olurlar. Virus, H proteini ile SLAM reseptörüne tutunduktan sonra hücreye girer (MacLachlan ve ark., 2016). H-SLAM etkileşiminden sonra F proteini ile de Nectin 4 reseptörüne tutunur ve sinsityum oluşmasına neden olur. Virus hücre içine girdikten sonra negatif polariteli RNA aracılığı ile mRNA sentez edilir ve ilgili proteinler üretilir. N, M, P ve L proteinleri sitoplazmada üretilirken H ve F proteinleri endoplazmik retikulumda üretilir. H ve F proteini hücre yüzeyinde bulunup virusun hücreden çıkarken oluşturduğu kapsid ile beraber virus yapısına eklenirler (Chen ve ark., 2023; Otsuki ve ark., 2013; Yadav ve ark., 2021)

Replikasyonda ilk önce N proteini üretilir ve RNA ile birleşerek RNP kompleksini oluşturur. Daha sonra transkripsiyonu desteklemek ve doğal bağışıklığı kontrol etmek için P (V ve C yapısal olmayan proteinler dahil) üretilir. Üçüncü olarak hem RNP yapısına katılan hem de hücre füzyonunda rol alan H ve F proteinleri ile ilişki olan M proteini üretilir. M proteinin ana görevi ise assembly' yi sağlamaktır. Dördüncü protein F proteindir. Reseptörlere tutunma ve sinsityum oluşumu dışında proteinlerin eksprese edilmesini desteklediği düşünülmektedir. Beşinci protein olarak H proteini üretilir. Morbilliviruslarda Nörominidaz aktivitesi olmadığı için HN şeklinde değil yalnızca H proteini olarak üretilir ve hücre reseptörlerine bağlanmada görev alır (Bamford ve Zuckerman, 2020; Liu, 2014; MacLachlan ve ark., 2016).

Şekil 2.3.'de Morbillivirus' ların replikasyon stratejisi şematik olarak gösterilmiştir.

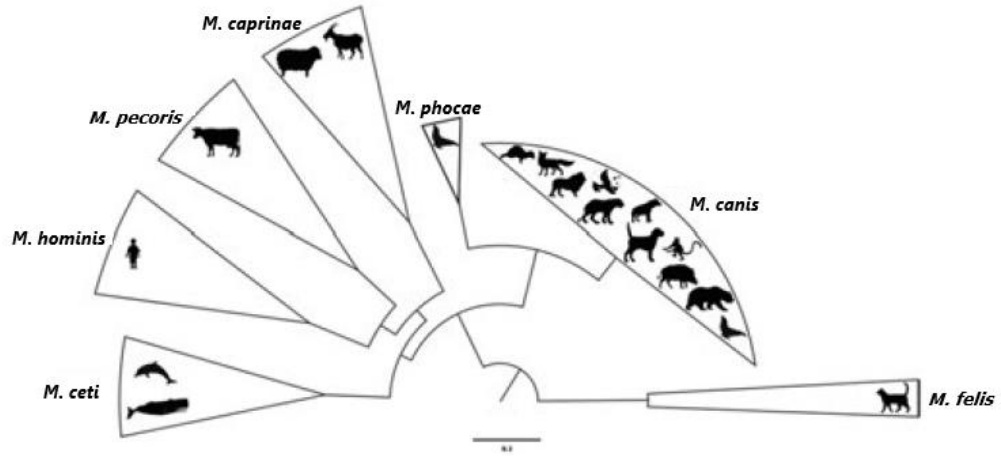


Şekil 2.3. Morbillivirusların replikasyon stratejisinin şematik gösterimi (Bamford ve Zuckerman, 2020).

2.1.5. Epidemiyoloji

Köpek gençlik hastalığı, oldukça bulaşıcı, yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden tüm dünyada yaygın bir viral hastalıktır (Deem ve ark., 2000).

CDV, *Paramyxoviridae* ailesinde bulunup *Morbillivirus* genusunda yer almaktadır. Bu genus da en son keşfedilen *Feline morbillivirus* (Woo ve ark., 2012) dahil olmak üzere *Kızamık virusu* (*Morbillivirus hominis*), *Sığır vebası virusu* (*Morbillivirus pecoris*), *Küçük ruminant vebası virusu* (*Morbillivirus caprinae*), *Fokgillerin morbillivirusu* (*Morbillivirus phocae*) ve *Deniz memelilerinin morbillivirusu* (*Morbillivirus ceti*) türleri bulunmaktadır (Rima ve ark., 2019) (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. *Morbillivirus* genusunda bulunan virus türleri ve konakçıları (İsimlendirme güncel ICTV' ye göre düzenlenmiştir) (Bamford ve Zuckerman, 2020).

Canine distemper virus başta *Canidae* ailesi (köpek, çakal, kurt) olmak üzere *Ursidae* (dev panda), *Ailuridae* (kırmızı panda), *Mustelidae* (ferret, mink), *Felidae* (aslan, leopar) gibi birçok aileyi etkilemektedir (MacLachlan ark., 2016). Türler arası çapraz geçişin yüksek olduğu için birçok çalışma yapılmıştır (Beineke ve ark., 2015; Duque-Valencia ve ark., 2019).

CDV, evcil olmayan türlerde ilk defa 1937 yılında Güney Afrika'da gümüş çakal türünde (*Vulpes chama*) bildirilmiştir. 1942 yılında Amerika'da Amerikan porsuğu (*Taxidea taxus*), 1972 yılında İsviçre'de Kedigillerde (*Felidae*) bildirilmiştir. (Martinez-Gutierrez ve Ruiz-Saenz, 2016). Özellikle son yıllarda yaban hayatında CDV varlığı için çalışmalar artmıştır. CDV' nin ilk olarak *Canidae* ailesinde ortaya çıktığı düşünülmektedir. Türler arası geçişte H proteinin 549. bölgesinde *Canidae* ailesinde tirozin aminoasiti bulunurken, diğer ailelerin çoğunda histidin bulunduğu gözlenmiştir (Nikolin ve ark., 2012).

Hastalığın yaygınlığı bölgeden bölgeye değişmekle birlikte özellikle soğuk mevsimlerde artmaktadır. Bu durum aşı geçmişi ve yaşa (gençlerde yetişkinlere göre daha yüksek) bağlı olarak değişmektedir (Martella ve ark., 2008).

Farklı coğrafi bölgelerden izole edilmiş virusların H geni sekansına göre en az 21 suş bulunmuştur; Amerika-1, Amerika-2, Kuzey Amerika-3, Güney Amerika/Kuzey Amerika-4, Amerika-5, Kanada 1 ve 2, Asya-1, Asya-2, Asya-3, Asya-4, Asya-5, Asya 6, Avrupa Yaban Hayatı, Arktik, Afrika-1, Afrika-2, Avrupa-1/Güney Amerika-1,

Güney Amerika-2, Güney Amerika-3 ve Rockborn benzeri (Echeverry-Bonilla ve ark., 2022; Giacinti ve ark., 2022).

CDV en etkili olarak oral/nazal sıvılarla direkt temas ile bulaşmaktadır. Bunların haricinde idrar, dışkı gibi birçok şekilde de bulaşabilir (Lanszki ve ark., 2021).

2.1.6. Patogenez

CDV, aerosol yollarla bulaşma sonrası üst solunum yollarında bulunan mononükleer hücrelerde ilk replikasyonu gerçekleştirir. Dentritik hücreler, timositler, makrofajlar ve aktif lenfositlerde oldukça fazla bulunan SLAM reseptörüne tutunarak replike olurlar (MacLachlan ve ark., 2016). SLAM reseptörü susturulmuş gelinciklerde sistemik bir enfeksiyon görülmemiştir (Messling ve ark., 2006).

CDV, bölgesel lenf yumrularında çoğalıp B ve T hücrelerini enfekte eder ve bunlar vasıtasıyla sistemik olarak yayılır. T hücrelerinin B hücrelerinden daha fazla etkilendiği bulunmuştur (Martella ve ark., 2008). Vahşi tip virusun kontrol altına alınamadığı durumlarda B ve T hücrelerinde enfeksiyonun %80’ni aştığı görülmüştür (Pillet ve von Messling, 2009).

İlk viremi hücre aracılıdır ve viremi ile birlikte ilk ateş 6 gün sonra görülerek lenfoid dokuların enfeksiyonu ile sonuçlanır (Von Messling ve ark., 2004). Yeni enfekte olmuş kan mononükleer hücreleri, ikinci ateş ve viremiye neden olur. Akciğer, mesane ve derideki epitel hücrelerinin enfeksiyonu, bu hücrelerin bazolateral yüzeyinde eksprese edilen Nektin-4 ile yoluyla meydana gelir ve böylece enfekte olmuş dolaşımdaki kan mononükleer hücreleriyle doğrudan etkileşimi kolaylaştırır. Merkezi sinir sistemi enfeksiyonu, geç olmakla birlikte her zaman gerçekleşmeyebilir (Bamford ve Zuckerman, 2020; MacLachlan ve ark., 2016). Ayrıca CDV, kaspas-3 ve kaspas-8’i aktive ederek apoptosisi uyarmaktadır (Kajita ve ark., 2006).

2.1.7. Klinik Bulgular

Köpek gençlik hastalığı özellikle yavru köpekleri etkileyen bazen de yaşlı köpeklerde de ortaya çıkabilen persiste bir hastalıktır. Hastalık etkeni aerosol yolla CDV organizmaya girdikten sonra mukoz membranlar ve lenfoid dokular asıl hedef yerleridir. Bu alanlarda primer replikasyonu sonrası solunum yolları, mesane, gastrointestinal

sistem veya merkezi sinir sistemine tropizm gösterirler (Elia ve ark., 2015). Şekil 2.5. de CDV ile enfekte olmuş köpekten enfeksiyon modeli gösterilmiştir.

Virusun inkübasyon süresi hayvanın yaşı, anneden aldığı maternal antikorlar, aşı olma durumu veya nörolojik bulguların ortaya çıkmasına bağlı olarak 1 haftadan 4 haftaya kadar değişebilmektedir. Klinik bulguların başlangıcında ateş, burun akıntısı, gözlerde çift taraflı seröz bir akıntı dikkat çeker. Hayvan genelde iştahsız ve halsizdir. Bilateral seröz oküler akıntılar, öksürük ile birlikte zor nefes almanın yanında mukopurulent hale gelebilir ve bu belirtiler genellikle "*kennel cough*" (köpeklerde akut solunum yolu hastalığı) ayırt edilemeyen belirtilerdir (MacLachlan ve ark., 2016).

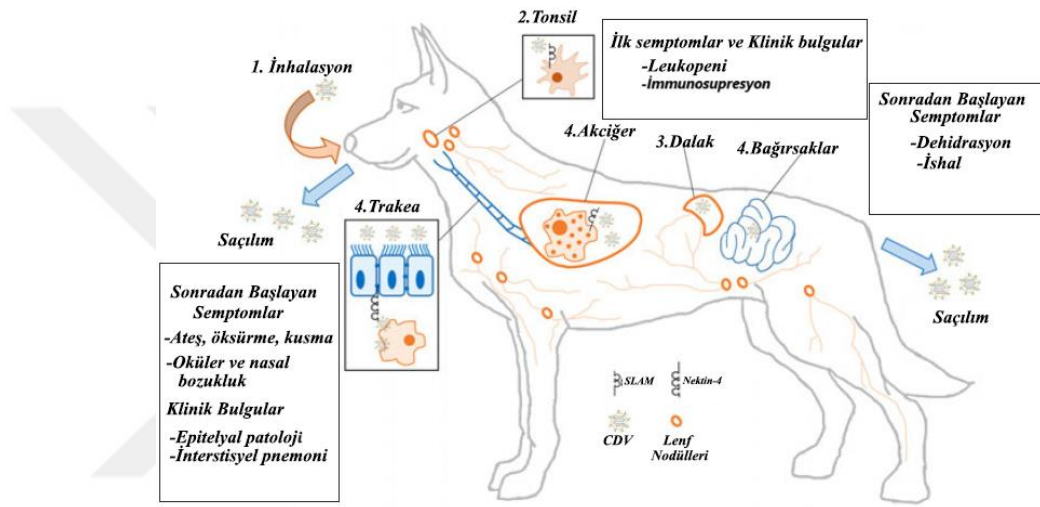
Hastalığın şiddetli olması durumunda enfekte köpeklerde ilk olarak 3 ila 6 günlük bir inkübe döneminden sonra ateş gelişir, virusun bütün sistemlere yayılması ile lökopeni şekillenir ve ikinci bir ateş yükselmesi (39°C-41°C arası) ortaya çıkar. Çoğu köpekte öncelikle solunum belirtileri görülür; üst solunum yollarında enflamasyon ve hasara bağlı olarak aşırı bir öksürüğe, ardından bronşit ve interstisyel pnömoniye neden olur. Bazı köpeklerde gastrointestinal bulgular gözükür; kusma ve sulu ishal oluşabilir. Hastalığın süresi, sıklıkla ikincil bakteriyel enfeksiyonların neden olduğu komplikasyonlara bağlı olarak değişir. Enfekte hayvanlardan virus saçılımı sindirim ya da solunum yolu ile gerçekleşir (Can Sahna ve ark., 2008; Martinez-Gutierrez ve Ruiz-Saenz, 2016; Von Messling ve ark., 2004; Pillet ve von Messling, 2009).

Bazı köpeklerde ise ayak taban yastığı ve burun ucunda hiperkeratoz görülmesine bağlı olarak *hardpad disease* görülebilmektedir (Koutinas ve ark., 2004).

Solunum ve gastro-intestinal bulguların yanı sıra nörolojik bulgular da gözükmemektedir. Eğer hayvanın bağışıklığı yeterince güçlü olmazsa virus merkezi sinir sistemine ulaşabilir. Sinirsel hastalık nöbetleri, serebellar ve vestibüler belirtiler, duyuşsal ataksiler nörolojik klinik bulgu gösteren hayvanlarda yaygındır. Ölüm oranı ise duyarlı hayvanlara göre değişmekle birlikte %30-80 arası değişmektedir (MacLachlan ve ark., 2016; Martella ve ark., 2008). Son yıllarda hastalığa karşı aşı uygulaması rutin olarak yapılmaktadır fakat aşı %100 etkili değildir (Çomaklı ve ark., 2020). CDV' nin nörolojik bulguları genetik olarak yakın ilişkili olduğu Kızamık enfeksiyonu ile benzerlik göstermektedir (Summers ve Appel, 1994). Kızamıkta persiste durumda

görülen *Subakut skleroz panensafalit*, köpeklerde *yaşlı köpek ensefaliti* olarak karşımıza çıkmaktadır (Beineke ve ark., 2009; Laksono ve ark., 2021).

Ferret'lerde vahşi tip CDV ve epitelyal hücrelerde çoğalması engellenen rekombinant CDV'nin kullanıldığı bir karşılaştırma çalışmasında vahşi tipin klinik belirti gösterdikten sonra ölüme neden olduğu gözlenirken, rekombinant CDV verilen Ferret'lerde klinik belirti gözlenmeksizin immunsupresyon belirlenmiştir. Sonuç olarak epitel hücrelerde virusun üremesi klinik belirtiler için gerekli olup, immun sistemi baskılamak için gerekli olmadığı ortaya çıkmıştır (Sawatsky ve ark., 2012).



Şekil 2.5. CDV ile enfekte olmuş köpekten enfeksiyon modeli. CDV aerosol yol ile organizmaya girer (1), ve ilk replikasyon olarak solunum yollarındaki SLAM reseptörünü ve tonsilleri (2) kullanır. Viremi yoluyla enfekte olan immun hücreler (makrofaj vb.) dalak gibi (3) immun sistem ile ilişkili organlara giderler. Buradan tekrar ikinci viremi sonrası immun hücre ile ilişkili olarak bağırsak, akciğer ve trakea (4) gibi diğer organlara yayılır. Bu dokularda daha çok Nektin-4 reseptörünü kullanarak epitel hücrelerine geçer. Bu ikinci aşama birçok klinik belirtinin (kusma, ateş vb.) oluşmasına neden olur. En son aşamada ise oluşan yeni nesil CDV'ler sindirim veya solunum yolu ile saçılarak yeni konakçıları enfekte ederler. Bazı köpeklerde sinirsel bulgular ortaya çıkabilmektedir (görselde belirtilmemiştir) (Bamford ve Zuckerman, 2020)

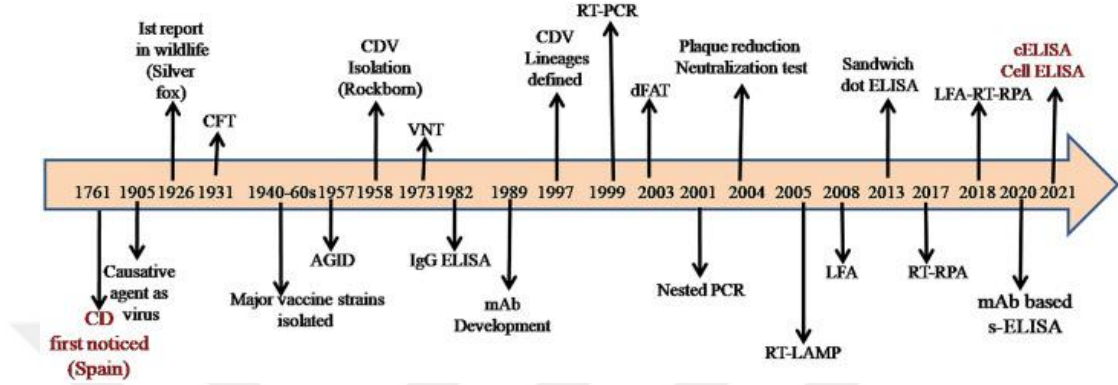
2.1.8. Teşhis Yöntemleri

CDV tüm dünyada oldukça yaygın olduğu için teşhis ve tedavi yöntemlerine yönelik çalışmalar, virusun keşfedildiği günden itibaren araştırmacılar tarafından yapılmaktadır.

19.yy. başlarında tanımlanabilen CDV için 1973 yılında mikronötralizasyon testi (Appel ve Robson, 1973), 1999 yılında RT-PCR (Frisk ve ark., 1999), 2004 yılında plak redüksiyon testi (Oyedele ve ark., 2004), 2013 yılında Sandviç dot ELISA (Li ve ark.,

2013), 2021 yılında cELISA gibi yöntemler geliştirilmiştir (Şekil 2.6.) (Karki ve ark., 2022).

Bunların dışında yeni teknoloji yöntemleri ile birlikte birçok yöntemle CDV hem serolojik hem de virolojik araştırılmıştır (Elia ve ark., 2015).



Şekil 2.6. CDV test yöntemleri tarihsel süreci (Karki ve ark., 2022).

2.1.9. Kontrol ve Korunma, Kimyasal ve Fiziksel Ajanlara Duyarlılık

Köpek gençlik hastalığına karşı ilk aşı Puntoni tarafından 1923 yılında geliştirilmiştir. Bu aşırı geliştirmek için ensefalit olan köpekten beyin dokusu alınıp formalinde inaktive edilmiştir. Laidlaw ve Dunkin de 1928 yılında benzer aşı çalışmaları yapmalarına rağmen kayda değer sonuçlar alamamışlardır. Uzun yıllar inaktif aşılar kullanılmasına rağmen hastalık kontrol altına alınamadığı için canlı aşılar ihtiyacı duyulmuştur (Appel, 1999).

1952 yılında Cabasso ve Cox ilk modifiye-canlı aşırı geliştirdimşlerdir (Lederle suşu) (Cabasso ve Cox, 1941). Embriyolu tavuk yumurtasına adapte ettikleri virüsü daha sonra doku kültürüne de adapte etmişlerdir. Benzer şekilde Haig 1956 yılında Onderstepoort aşı suşunu geliştirmiştir (Haig, 1956). 1960 yılında ise Rockborn kendi adını verdiği Rockborn suşunu köpek böbrek hücre kültürüne adapte etmeyi başarmıştır (Rockborn, 1960). Bu canlı aşılar günümüzde hala kullanılmaktadır.

2.1.10. Türkiye’de CDV Çalışmaları

Ülkemizde CDV’ nin varlığına ilişkin yapılmış farklı çalışmalar bulunmaktadır. Ertürk 1960 yılında yayınladığı çalışmada 1933-1958 yılları arası Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi’ne gelen toplam 617 köpeğe yapılan nekropsi sonucu 159 köpekte

Gençlik Hastalığını tespit etmiştir (Ertürk, 1960). 2000-2002 yılları arasında Türkiye'nin Ankara, Muğla ve İstanbul illerinde yaşayan 609 sağlıklı sokak köpeği serum örneklerinde nötralize edici antikorların prevalansı %9.03 (n=55) olarak tespit edilmiştir (Gencay ve ark., 2004). Başka bir çalışmada klinik olarak ishal tablosu gösteren yavru köpeklerde viral etken olarak CDV nin RT-PCR ile varlığı %15 olarak tespit edilmiştir (Can Sahna ve ark., 2008). Çalışkan ve Burgu; 2007 yılında yaptıkları RT-PCR çalışmasında 157 köpeğin 51'inde CDV pozitiflik tespit etmişlerdir (Çalışkan ve Burgu, 2007). Hasircioğlu ve Aslım 2021 yılında yaptıkları real-time RT-PCR çalışmasında 65 köpekten 33'ünün CDV pozitif olduğunu belirlemişlerdir (Hasircioğlu ve Aslım, 2021). Saltık ve Kale'nin 2021 yılında yaptıkları çalışmada 50 hayvanda yapılan örneklemelerden (kan, nasal swab, oküler swab, idrar) toplam 250 örnekleme için yapılan one-step RT-PCR sonucu %42 pozitiflik tespit edilmiştir (Saltık ve Kale, 2021). Sayın ve Erol 2021 yılında Antalya ilinden topladıkları örnekleri incelediklerinde CDV'ye karşı IgG ve IgM ELISA yapıldığında 92 örnekte ortalama %98'lik pozitif bulmuşlardır. Ayrıca toplanan örneklerden yapılan immunokromotografik yöntemle yapılan hızlı testte %5,43 CDV pozitif olarak belirlenmiştir (Sayın ve Erol, 2021). Koç ve ark. (2021) Ankara'da köpek barınağından aldıkları örneklerden yapılan RT-PCR sonucu için CDV H genine karşı yaptıkları filogenetik analizde ilk defa Türkiye'de Arktik benzeri suşu bildirmişlerdir. Benzer çalışmayı Karapınar ve ark. 2022 yılında yapmıştır. Bu çalışmaya göre 11 aşılammamış ve CDV klinik bulguları gösteren köpeklerden aldıkları örnekler için H ve F genlerine karşı yaptıkları filogenetik analizde Arktik benzeri ve Avrupa coğrafi suşlarını tespit etmişlerdir (Karapınar ve ark., 2023). Ayrıca 2022 yılında Esin ve ark. Karadeniz bölgesinde bulunan iki porsukta CDV tespit etmişlerdir (Esin ve ark., 2022).

Bu çalışmalar göstermektedir ki CDV dünyada olduğu gibi ülkemizde de oldukça yaygın durumdadır.

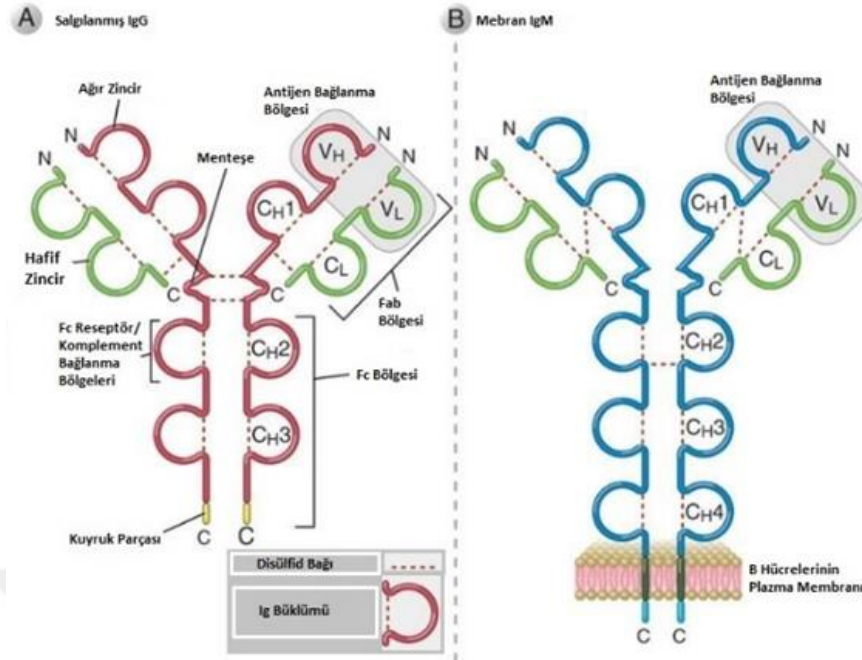
2.2. İmmun Sistem ve Monoklonal Antikorlar

İmmun sistem enfeksiyonlarla mücadelede önemli bir araçtır ve doğal bağışıklık ve edinsel bağışıklık olmak üzere ikiye ayrılır (Aksoy, 2013). Edinsel bağışıklık ise humoral ve hücreli bağışıklık olmak üzere ikiye ayrılır. Hücreli immunité özellikle virüslere, hücre içi bakterilere ve kansere karşı koruma sağlar. Burada T lenfositler ve

makrofajlar önemli rol oynar. Dentritik hücreler, makrofajlar, B lenfositler gibi antijen sunan hücreler (ASH) tarafından antijenler yakalanır, naif T lenfositlerine sunulur ve burada sitokinlerle etkinleşip klonal çoğalma sonrası antijeni yok etmeye yönelik farklılaşırlar (Abbas ve ark., 2016; Hughes ve ark., 2016; Songu ve Kat, 2012).

Antijen sunan hücrelerin antijen sunması sonrası olgunlaşmamış B lenfositler antijenleri tanır, yardımcı T hücreleri ve diğer uyarımlarla etkin B hücrelerine dönüşürler. Klonal bir çoğalma sonrası antikor salgılayan plazma hücrelerine farklılaşırlar (Abbas ve ark., 2016; Songu ve Kat, 2012). Humoral immun yanıtla gelişen antikorların antijenlere bağlanması ile presipitasyon, nötralizasyon veya lizis gibi farklı etkiler ortaya çıkabilmektedir (Songu ve Kat, 2012).

Antikor terimi ilk defa Paul Ehrlich tarafından Ekim 1891 yılında yayınlanan “Bağışıklık Konusunda Deneysel Çalışmalar” adlı çalışmasında kullanıldı (Lindenmann, 1984). İmmunoglobulinler olarak da bilinen antikorlar, B hücrelerinin yüzeyinde bulunabilen veya ekstrasellüler boşlukta bulunup antijenleri nötralize edebilen glikoprotein yapısındaki moleküllerdir. Memeli organizmalar infeksiyöz bir etkenle karşılaştığı zaman B hücreleri ve plazma hücreleri tarafından antikor salgırlar. B hücreleri ise kemik iliğinden köken alırlar. Memelilerde 5 çeşit (IgM, IgG, IgA, IgD ve IgE), kuşlarda ise 3 çeşit (IgY, IgA ve IgM) antikor bulunmaktadır. Bir antikor molekülü birbirine eş iki ağır (~55 kDa) iki hafif zincir (~24 kDa) bulunur. Her bir zincir bir değişken ve bir sabit bölge içeren dört tane polipeptit zincirinden oluşur. Ayrıca bir antikorum, antijen bağlanma bölgesi Fab (Fragment Antigen Binding) ve kristalize bölge Fc (Fragment Crystalline) olmak üzere iki bölgesi vardır. Bu ikisin birbirine bağlayan esnek yapıda “Menteşe (Hinge)” bölgesi vardır. Fab bölgesinde 6 tane (L1, L2, L3, H1, H2 ve H3) antijenin tanıyıp bağlayan “Tamamlayıcılığı Belirleyen Bölge (Complementary Determining Region, CDR)” bulunur ve antijeni tanımak için bunların bazen hepsini bazen birkaçını kullanır (Cohen, 1975; Hanack ve ark., 2016; Hoffman ve ark., 2016; Lipman ve ark., 2005) .



Şekil 2.7. Antikorların yapısı; salgılanan IgG (A) ve membrana bağlı IgM (B)'nin şematik gösterimi (Abbas ve ark., 2016).

Monoklonal antikorlar ise sadece bir epitopa karşı reaksiyon gösteren antikorlardır ve sadece bir adet B lenfositte dayanan hücre klonundan elde edilirler. Monoklonal antikorlar Köhler ve Milstein tarafından 1975 yılında keşfedilmiştir (Köhler ve Milstein, 1975). Araştırmacılar sürekli çoğalan dalak hücreleri ile fare kökenli P3-X63-Ag8 miyeloma hücrelerini füzyon işlemine tabi tutarak hibridomalar geliştirmişlerdir. Elde edilen hibridomaları klonal olarak çoğaltıp, her bir klonu seçmişlerdir. Bu sayede her klon aynı epitopa özgü antikor üretmiştir. Monoklonal antikor üretimi hibridoma teknolojisi olarak da adlandırılmaktadır. Hibridoma teknolojisinin temeli antikor üretebilen B hücresi ile sürekli çoğalabilen miyeloma hücresinin birleştirilip yeni hibrit hücre (hibridoma) üretilmesine dayanmaktadır. Bunun için fareler en az 3 defa immunize edilir. Steril bir ortamda farenin dalağı çıkarılıp dalak hücreleri ayrıştırılır. Füze edici etkisi bulunan polietilen glikol (PEG) yardımı ile miyeloma ve dalak hücreleri birleştirilir. Füzyon sonrası hücreler 24 saat Hipoaksantin-Aminopterin-Timidin (HAT) içeren besiyerinde bekletilir. Daha sonra yarı katı bir ortama alınır veya normal ortam da devam ettirilerek sınırlayıcı dilüsyon yapılarak oluşan klonlar seçilip antikor yönünden tarama yapılır (Pandey, 2010; Selimoğlu ve ark., 2016).

HAT, füzyona girmemiş miyeloma hücrelerinin ölmesi için kullanılır. Normal hücrelerde HGPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) geni bulunur. Ancak bu genden eksik miyeloma hücreleri HAT içerisinde bulunan Aminopterin ile baskılanarak ölürlür. Burada de novo sentezinden nükleotitleri baskılayarak yaparlar. Füzyona girmiş hücreler ve B hücreleri ise salvage yolu ile bölünmeye devam ederler (Mitra ve Tomar, 2021). Füzyona girmemiş dalak ve B hücreleri ise birkaç gün içerisinde ölür ve yalnızca hibridomalar yaşamaya devam ederler (Tablo 2.3.)

Tablo 2.3. HAT ortamındaki hücrelerin durumu.

Hücreler	DNA Sentezi		HAT besiyerinde
	Salvage Sentez Yolu*	De Novo Sentez Yolu	
Miyeloma	HGPRT-	Aminopterin tarafından baskılanır	DNA sentezi olmaz; ölür
Dalak	HGPRT +		DNA sentezi var ama <i>in vitro</i> ortamda uzun süre yaşayamaz
Miyeloma-Dalak -Hibrit	HGPRT +		Bölünmeye devam eder
Miyeloma-Miyeloma-Hibrit	HGPRT-		DNA sentezi olmadığı için ölür.
Dalak- Dalak - Hibrit	HGPRT +		DNA sentezi var ama <i>in vitro</i> ortamda uzun süre yaşayamaz

*HGPRT pozitif hücreler de novo sentez yolu baskılanınca salvage sentez yolu ile DNA sentezine devam edebilir.

2.3. Enzim Bağlı İmmunosorbent Testi (ELISA)

ELISA, protein yapıdaki antijen ve antijene spesifik enzim işaretli antikorun varlığında enzime spesifik substrat temelli; analitik duyarlılığı yüksek ve cihaz yardımı ile sonucun değerlendirmesine dayanan bir testtir. ELISA yöntemi ilk defa birbirinden bağımsız iki farklı araştırma ekibi tarafından tanımlanmıştır (Engvall ve Perlmann, 1971b; Weemen ve Schuurs, 1971). Aslında araştırmacılar daha önceden kullanılan Radyoimmun testi (radioimmunoassay, RIA) yöntemini geliştirmişlerdi fakat RIA yönteminde kullanılan radyoizotoplar kansere neden olabileceği için HRP gibi bir enzime dayalı yöntem geliştirmişlerdir (Aydin, 2015).

ELISA yönteminde bilinen bir antijen veya antikor karbonat/bikarbonat tampon solüsyonu gibi yüksek bazik değerli (pH 9.6) bir solüsyon içerisinde 96 kuyucuklu mikropleytin tabanına bağlanılır. Daha sonra yıkama solüsyonu (PBS içerisinde Tween 20 gibi) ile yıkama yapılarak yüksek protein içeren bloklama solüsyonu (sığır serum albümin, yağsız süt tozu vb.) kuyucuklara eklenir. Bağlanmayan antikorlar veya antijenler yıkama ile uzaklaştırılıp enzimle (HRP, alkalın fosfataz vb.) işaretli antikor (konjugat) eklenilerek inkübe edilir. Yıkama sonrası enzime spesifik substrat eklenilerek karanlık sahada yaklaşık 10 dk inkübasyon sonrası durdurma solüsyonu (2M sülfirik asit vb.) eklenerek enzime bağlı olarak dalga boylarında spektrofoto metre cihazından optik dansidite (OD) değeri için ölçüm yapılır. Kuyucuklara eklenen en az 2 tane negatif kontrolün OD değerlerinin aritmetik ortalaması alınır ve 2 katı üzeri cut-off değeri olarak hesaplanılır. Cut-off değerinin üstü pozitif örnek olarak kabul edilir (Hornbeck, 2015).

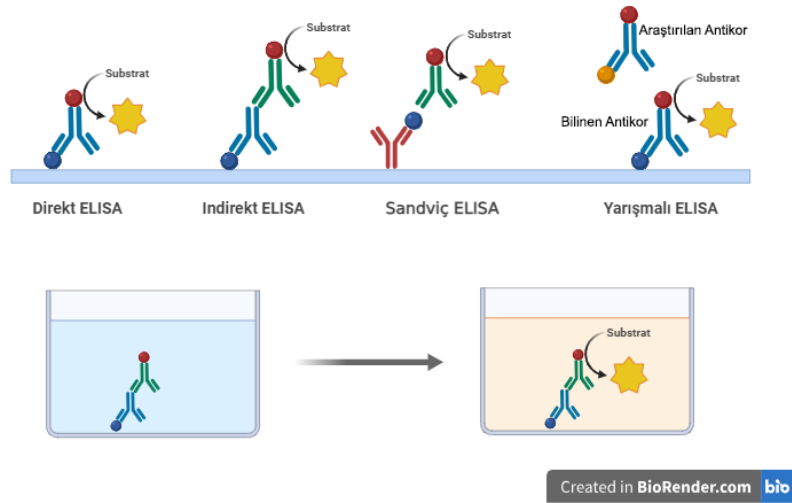
ELISA yönteminin sensitivitesi yüksektir. Aynı anda çok fazla örnek çalışabilmesi testin saha örneklerinde kullanımını arttırmaktadır. Ancak yapılabilmesi için uzman kişilerin gerekliliği, uygun malzemenin olması gibi durumlar dezavantaj oluşturmaktadır (Yeşilbağ, 2017).

ELISA yöntemi için tespit edilecek amaca bağlı olarak farklı yöntemler geliştirilmiştir.

Direkt ELISA ve indirekt ELISA yönteminde, tabana antijen bağlanılır. Farklı olarak; direkt ELISA’ da bir tane antikor (konjugat) kullanılıp antijen taramalarında kullanılmıştır. ELISA’ yı geliştiren ilk araştırmacıların yaptığı yöntemdir. İndirekt ELISA’ da iki farklı antikor kullanılarak antikor taraması yapılmaktadır. 1978 yılında

Lindström ve Wager insan serum albumin IgG araştırması için bu yöntemi geliştirmişlerdir (Lindström ve Wager, 1978). Sandviç ELISA'da ise tabana antikor bağlanılıp daha sonra antijen eklenilir ve sekonder antikor (konjugat) ile sandviç benzeri sistem oluşturulur. Sandviç ELISA yöntemi ilk defa 1977 yılında Kato ve ark. (Kato ve ark., 1977) tarafından geliştirilmiştir. Bunun dışında ilk defa Yorde ve ark. tarafından tanımlanan yarışmalı ELISA (cELISA) bulunmaktadır (Yorde ve ark., 1976). Diğer yöntemlerden farklı olarak pleyte antijen bağlandıktan sonra daha önceden bilinen antikor ve araştırılacak örnek aynı anda eklenilir. Pleytte bir yarışma ortamı sağlanmış olur. Bilinen antikora spesifik konjugat ve substrat eklenildikten sonra OD değerlerine göre karar verilir. Eğer bilinen antikor antijene bağlanmışsa OD değeri yüksek çıkar ve araştırdığımız örnekte antikor yok veya az şeklinde karar verilir. Eğer OD değeri düşük çıkarsa, araştırılan örnekte antikor seviyesi yüksek olup bilinen antikorun bağlanmasını engellemiş anlamına gelmektedir (Aydın, 2015). Diğer ELISA yöntemlerinden farklı olarak OD değerinin düşük olması araştırılan örnekte antikor varlığının yüksekliğini göstermektedir (Şekil 2.8.).

Antijen taramaları için iki farklı antikor kullanılmasından dolayı bu tez çalışmasında Sandviç ELISA tercih edilmiştir.



Şekil 2.8. ELISA yöntemlerinin şematik gösterimi.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma İzni

Hayvan deney çalışmalarının tamamı Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı kapsamında (Karar No: 22/117, Tarih: 05/05/2021) yapılmıştır.

3.2. Kullanılan Hayvanlar ve Örneklerin İşlenmesi

Çalışmada örnekleme hayvanı olarak; Kayseri bölgesindeki pet klinik ve Erciyes Üniversitesi (ERÜ) Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi'ne gelen dişi/erkek, çift taraflı göz yaşı, solunum problemi, ateş ve bazı hayvanlarda da merkezi sinir sistemi bulguları gösteren, CDV şüpheli köpekler kullanılmıştır. CDV şüpheli köpeklerden kan lökosit örneği ve göz swabı örnekleri toplanılmıştır. Örnekler ERÜ Veteriner Fakültesi Viroloji laboratuvarında işlenilmiştir. Lökosit ve swab örnekleri virus izolasyonu ve identifikasyonu amacıyla ve geliştirilen antijen ELISA testi için kullanılmıştır.

Ayrıca monoklonal antikor üretimi amacıyla saf virus inokülasyonları için üç adet 4-6 haftalık dişi BALB/c fareleri ve poliklonal antikor üretmek amacıyla bir adet 4-8 aylık Yeni Zelanda ırkı dişi tavşan kullanılmıştır. Deney hayvanlarından kan ve doku örneklemeleri yapılmıştır.

CDV şüpheli köpeklerin kanları EDTA'lı kan tüplerine (BD Vacutainer, 367525) alınmıştır. Viroloji laboratuvarında kan örnekleri 1500 rpm'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Lökosit tabakası steril bir pipet yardımıyla toplanarak steril mikrosantrifüj tüplerine alınıp virus izolasyonu ve RT-PCR testine tabii tutulmak üzere -20 °C'de buzdolabında saklanılmıştır.

Göz swabı, %10 penisilin-streptomisin- amfoterisin B içeren (BI Technology, 03-33-1B) steril 1x PBS ile sulandırıldıktan sonra 0.45 µm enjektör filtre (GVS, FJ13BNPPS004AH01) ile filtre edilip virus izolasyonu ve RT-PCR testine tabii

tutulmak üzere -20 °C buzdolabında saklanılmıştır. RT-PCR pozitif örnekler geliştirilmiş olan Antijen-ELISA testinin etkinlik kontrollerinde de kullanılmıştır.

3.3. Virolojik Çalışma

3.3.1. Kullanılan Hücreler ve Vasatlar

Çalışmada CDV şüpheli köpeklerden alınarak inokulum haline getirilen lökosit ve göz swapı örneklerinden virus izolasyonu için laboratuvar stoklarında bulunan Madin-Darby köpek böbrek (MDCK, Madin-Darby Canine Kidney, ATCC, NBL-2) hücre hattı kullanılmıştır. Monoklonal antikorların üretilmesi aşamasında ise F0 miyeloma (ATCC, CRL-1646) hücre hattı kullanılmıştır.

Ayrıca hücre kültür vasatı olarak Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Düşük glikoz) (Capricorn, DMEM-LPA-P10), Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) (Gibco, 51800-035) ve Dulbecco's PBS (ThermoFisher, 14190250) kullanılmıştır. Vasat içerisine Fetal Bovine Serum (FBS) (BI Technology, 04-007-1A) ve penisilin-streptomisin-amfoterisin B (antibiyotik-antimikotik) eklenmiştir.

3.3.2. Hücre Kültürü Üretimi

Hücre kültürü çalışmalarında öncelikle 50 ml santrifüj tüplerine (Jetbiofil, CFT011500) %1 antibiyotik-antimikotik ve %10 FBS içeren DMEM vasatı hazırlanılmıştır.

Laboratuvar stoklarında bulunan MDCK hücreleri -80°C derin dondurucudan (Haier, DW-86L628) çıkarılarak 37 °C'de hızlıca çözündürülmüştür. Daha sonra 25 cm² (ThermoFisher, 130189) hücre kültür kaplarına (flask) ayrı ayrı aktarılmıştır ve 2 gün boyunca çoğalıp monolayer hale geldikten sonra pasajlama yapılmıştır.

Bunun için flask içerisindeki vasat dökülerek 2 defa D-PBS ile 2 ml ile yıkamak yapılmıştır ve 1 ml tripsin-EDTA (%0.25) (Sigma, T3924) eklenerek 37 °C CO₂ inkübatöre kaldırılmıştır. Yaklaşık 10 dk inkübe edildikten sonra yapışan hücrelerin kalktığı ters mikroskop (Olympus, CKX41) altında görülmüştür. Üzerine 5 ml %10 FBS içeren DMEM vasatı eklenerek flaskın içi yıkanmış ve tamamı alınıp 15 ml steril santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Santrifüj dengeleri ayarlandıktan sonra 1000 rpm'de 10 dk santrifüj cihazında (Nüve, 1200R) santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası süpernatant atılarak tüpün dibinde bulunan pelet parmak darbeleriyle çözündürülmüştür. Üzerine %10 FBS içeren DMEM vasatından 1 ml eklenerek resüspanse

edilmiştir. Daha sonra tamamı alınıp 75 cm² (Orange Scientific, 5520200) flaska geçilmiştir. %5 CO₂ 37 °C inkübatörde 3 gün boyunca inkübe edilmiştir.

75 cm² flaskın tamamına yakını dolduğu ters mikroskop altında görülüp tekrar tripsin-EDTA (%0.25) ile pasajlama yapılmıştır. Daha sonra 175 cm² (Orange Scientific, 5520300) hücre kültür flasklarında çoğaltılmıştır.

3.3.3. Virus İzolasyonu

Sahadan toplanan göz swabı ve lökosit örneklerinin inokulumları, MDCK hücre hatlarına ekim yapılmıştır. Bu amaçla MDCK hücreleri 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 10⁵/ml oranında geçilerek bir gün boyunca %5 CO₂ 37 °C inkübatörde (ESCO, CCL-170B-8) inkübe edilmiş ve %70-80 arası monolayer hale gelen hücrelere inokulumlardan %1 oranında ekim yapılmıştır. Kültürler inkübatöre kaldırılıp günlük olarak ters mikroskop altında yuvarlaklaşma, vakuol oluşumu ve sinsityum (dev hücre) şeklindeki sitopatik etki (cytopathic effect, CPE) açısından gözlem yapılmıştır. 10. günden sonra hücreler -20 °C'ye kaldırılıp çözündürme işlemi yapılarak hücre kültürü kaplarındaki vasat alınmış ve santrifüj tüpünde +4 °C'de 7500 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantın üstünden 1 ml alınarak steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.

Mikrosantrifüj tüpüne alınan örneklerle RT-PCR uygulanarak virusun varlığı araştırılmıştır.

3.3.4. Virus İdentifikasyonu

Sahadan toplanılan örnekler ve hücre kültüründe izole edilen örnekler ters-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile identifiye edilmiştir. Bunun için öncelikle guaninidin-tiyosiyonat-fenol-kloroform yöntemi (Chomczynski ve Sacchi, 2006) kullanılarak RNA ekstraksiyonu yapılmıştır.

RNA ekstraksiyonu için hazırlanan malzemeler:

1. Solüsyon D
 - 3 ml %10'luk N-Laoril sarcosin (Sarkozil) (Sigma, L9150-100G)
 - ❖ 0.3 g alınıp 3 ml dH₂O ile çözülmüştür
 - 0.75 M sodyum sitrat (dihidrat) (Sigma, W30260)
 - ❖ 0.45 g al 2 ml dH₂O ile çözülmüştür

➤ 25 g Guanidin tiyosiyanat (Merck, 8.20613.1000)

Solüsyon D protokol: Hazırlanan %10'luk N-Laoril sarcosin'den 2.64 ml, 0.75 M sodyum sitrat' dan 1.75 ml ve 25 g Guanidin tiyosiyanat' da bir cam şişeye eklenip üzerine 29.3 ml dH₂O eklenilip karıştırılmıştır. Daha sonra otoklav edilmiştir ve otoklav sonrası soğumaya bırakılmıştır ve üzerine 0.25 ml betamerkaptoethanol (Merck, 8.05740.0250) eklenilmiştir.

2. 3M Sodyum Asetat (pH<5) (Sigma, S2889)

3. Asit fenol (Merck, 100201.1000)

Bir miktar fenol 60 °C'de eritilmiştir. Otoklavlanmış dH₂O (ddH₂O) eklenerek magnetik karıştırıcıda 30 dk boyunca opak renk berraklaşana kadar karıştırılmıştır. Oda ısısında bekletildiğinde oluşan 2 fazdan üstteki faz dikkatlice çekilerek yeni ddH₂O eklenilmiştir. pH ölçülüp 4.5-5'e ayarlanılıp kullanılmak üzere kaldırılmıştır.

RNA Ekstraksiyon Metodu

Bu amaçla 400 µl örnekten alınıp steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 400 µl solüsyon D ve 50 µl sodyum asetat (3M) ilave edilip vortex cihazında karıştırılmıştır. Daha sonra sırasıyla 400 µl asit fenol ve 200 µl kloroform/izoamil alkol (49/1) eklenilip tekrar vortex ile karıştırılmıştır. 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edilip üstteki fazdan 750 µl alınarak yeni steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 750 µl izopropil alkol eklenip vortex ile karıştırılmıştır.

Daha sonra -80 °C'de 1 saat inkübe edilip 8000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp üzerine 500 µl %70 etanol eklenilerek vortex ile karıştırılmıştır. Sonra tekrar 8000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.

Süpernatant atılıp kurutma kâğıdı üzerine ters çevrilerek etanol' ün uçması sağlanılmıştır. Üzerine 20 µl nükleaz içermeyen su (ddH₂O) eklenilip vortex ile karıştırılmıştır ve kullanılmak üzere +4 °C' e kaldırılmıştır.

Daha sonra elde edilen RNA, tamamlayıcı DNA'ya (complementary DNA, cDNA) kit prosedürüne uygun olarak (ThermoFisher, k1622) dönüştürülmüştür (Tablo 3.1.).

RNase enzimi içermeyen mikrosantrifüj tüpüne aşağıdaki karışım hazırlanılmıştır. Tüm çalışma buz üzerinde kabin içerisinde yapılmıştır.

Tablo 3.1. cDNA karışımı.

Eklenen Ürün	Miktar
RNA	5 µl
Random Primer	1 µl
ddH ₂ O	6 µl
5x Reaksiyon Bufferı	4 µl
RNase inhibitör	1 µl
10 mM dNTP	2 µl
RevertAid M-MLV RT	1 µl
Toplam	20 µl

Mikrosantrifüj tüpündeki karışım 25 °C’de 5 dk, 45 °C’de 60 dk inkübe edilmiştir. cDNA elde edildikten sonra RT-PCR aşamasına geçilmiştir.

Füzyon geni için tasarlanılmış primerler kullanılmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. RT-PCR için primerler (Romanutti ve ark., 2016).

Primer Adı	Primer Dizilimi
FP1	5’ TGGGATTATCGGGACTGA 3’
FP2	3’ GGGCCAAATATTGACAAC 5’

PCR karışımı hazırlanılarak ısı döngüleyici de PCR işlemi yapılmıştır. Bunun için Transgen Biotech (Ap111-01) kiti kullanılmıştır (Tablo 3.3.).

Tablo 3.3. PCR karışımı.

Eklenen ürün	Miktar	Oran
cDNA	5 µl	-
FP1 (10 µM)	1 µl	200 nM
FP2 (10 µM)	1 µl	200 nM
10 mM dNTP	1 µl	200 µM
10x Easy Taq Buffer	5 µl	1x
Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	0.5 µl	2.5U
ddH ₂ O	36.5 µl	-
Toplam	50 µl	

Isı döngüleyici (Biorad, T100) de ayrışma için: 94 °C’de 1 dk, yapışma için 54 °C’de 1 dk ve uzatma için 72 °C’de 1 dk toplam 35 döngü ayarlanılmıştır. En son uzatma ısı 72 °C’de 10 dk ayarlanılarak PCR işlemi tamamlanılmıştır (Romanutti ve ark., 2016). PCR sonucunda cDNA ürünleri %1.7 Agaroz jel kullanılarak 120V da 20 dk elektroforez edilerek UV transilluminatorde (Vilber Lourmat) CDV F genine spesifik 556 bp bant uzunluğu bakımından incelendi.

RT-PCR ile pozitif bulunan örnekler ayrırlıp 75 cm² hücre kültür kaplarına geçilerek çoğaltılmıştır. Bu şekilde elde edilen izolatlar tekrar dondur-çöz yöntemi yapılp RT-PCR ile doğrulaması yapılmıştır.

3.3.5. Virus İzolatının Moleküler Karakterizasyonu ve Biyoinformatik Analiz

Proje çalışmasında elddilen izolatın RT-PCR F gen ürünü jelden pürifiye edilerek Sanger sekanslama yöntemi ile hizmet alımı olarak sekans yaptırılmıştır (Genoks, Lifescience).

PCR amplifikasyonu agaroz jelde yürütüldükten sonra Nucleogene NGE-019 kiti ile jelden DNA pürifikasyonu yapılmıştır.

Jelden DNA Pürifikasyonu Yöntemi:

RT-PCR sonrası ampikonlar agaroz jelde yürütülmüştür. UV transilluminator bantlar jelden kesilip steril mikrosantrifüj tüpüne eklenerek üzerine 300 µl Binding buffer eklenilmiştir. Jelin çözülmesi için; 30 s boyunca vorteks cihazında karıştırılmıştır. Daha sonra 56 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Jel tamamen çözdürüldükten sonra üzerine 150 µl izopropanol alkol eklenerek tekrar vorteks cihazında karıştırılmıştır. Elde edilen sıvı kısmın tamamı alınıp spin kolona yerleştirilmiştir. Santrifüj cihazında 1 dk 20 °C'de 12000 g'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra toplama tüpünde biriken sıvı atılarak column üzerine 500 µl wash buffer eklenilmiştir. Tekrar 1 dk santrifüj yapılarak toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır. Tekrar 200 µl wash buffer eklenerek santrifüj sonrası toplama tüpü atılmıştır. Spin kolon yeni mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek üzerine 50 µl elution buffer eklenilerek santrifüj yapılmıştır.

Elde edilen DNA sekanslama için primerlerle birlikte ticari şirkete gönderilmiştir.

Dizileme sonrası gönderilen dizi DNA NCBI/BLAST ile GenBank veri tabanında araştırılmıştır. Elde edilen sekanslarda en yakın suş ve referans suşlara göre izolatın mutasyonları belirlenilmiş ve Sekans GenBank'a eklenilmiştir.

Daha sonra MEGA11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılarak Clustral W parametreleri kullanılarak alignment edilmiştir. Alignment sonrası elde edilen veriler “.mas” ve “.fasta” formatında ayrı ayrı kaydedilmiştir.

Kaydedilen alignment sekansları filogenetik analiz yapılmıştır. Filogenetik analizler MEGA11 programında (Tamura ve ark., 2021), Maximum Likelihood yöntemi ve

Tamura 3 parametrelili model kullanılarak çıkarılmıştır (Tamura, 1992). Bootstrap konsensüs ağacı 1000 tekrarlama ile çıkarılmıştır (Felsenstein, 1985), analiz edilen sekansların evrimsel geçmişini temsil etmek için alınmıştır. İlişkili sekansların bootstrap testinde (1000 tekrar) birlikte kümelendiği tekrar ağaçlarının yüzdesi dalların üstünde gösterilmiştir (Felsenstein, 1985) . Sezgisel arama için ilk ağaçlar, Tamura 3 parametre modeli kullanılarak tahmin edilen çiftler arası mesafeler matrisine Neighbor-Join ve BioNJ algoritmaları uygulanarak ve ardından üstün log olasılık değerine sahip topoloji seçilerek otomatik olarak elde edilmiştir. Bölgeler arasındaki evrimsel oran farklılıklarını modellemek için ayrı bir Gama dağılımı kullanılmıştır (5 kategori (+G, parametre = 2,7099)).

Daha sonra elde edilen filogenetik ağaç newick formatında kaydedilip, iToL (Interactive Tree of Life) biyoinformatik veri tabanı ile renklendirme yapılmıştır. İlgili renklendirme ve suş tayini Saltık ve Atlı' nın çalışması ile birlikte (Saltık ve Atlı, 2023) Lanszki ve ark. (Lanszki ve ark., 2022) çalışmasına göre yapılmıştır.

3.3.6. Polietilen Glikol 8000 ile Virus Konsantre Edilmesi

Hazırlanacak Materyaller

- %23 (w/v) oranında NaCl (Merck, 1.06404.1000)

23 g NaCl 100 ml dH₂O içerisinde çözündürülmüştür. Otoklav cihazında (NÜVE, NF 1200R) otoklav edilerek steril hale getirilmiştir.

- %50 (w/v) oranında Polietilen glikol 8000 (Bioshop, PEH8000.1)

25 g PEG 8000, 50 ml dH₂O içerisinde 50 °C sıcaklıkta çözündürülmüştür.

- 10xTEN (Tris/EDTA/NaCl) Solüsyonu
 - ❖ 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) (Sigma, 1081286001)
 - ❖ 0.01 M EDTA (pH 8.0) (Sigma, E9884)
 - ❖ 1 M NaCl

dH₂O içerisinde hazırlanılmıştır. Daha sonra 100 ml 10xTEN solüsyonundan alınarak 900 ml dH₂O ile tamamlanıp 1xTEN solüsyonu hazırlanılmıştır. pH 7.4'e ayarlanarak 0.22 µm enjektör filtreden filtre edilmiştir.

CDV izolatu -80 °C’de dondur çöz yapıldıktan sonra 3000 rpm’de 30 dk +4 °C’de santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant ayrı bir steril cam erlenmeyere alınarak çöktürme işlemine başlatılmıştır.

Toplam hacim 20 ml olduğu için %15’i kadar 3 ml önceden hazırlanan %23 NaCl solüsyonundan yavaş bir şekilde eklenilmiştir. Daha sonra toplam hacim 23 ml olduğu için %10 oranında PEG 8000 solüsyonundan 2.3 ml yavaş bir şekilde eklenilmiştir. Virus-PEG-NaCl karışımı, manyetik karıştırıcı da bir gece boyunca +4 °C’de 100 rpm’de karıştırılarak inkübe edilmiştir (Berber, 2014).

Ertesi sabah karışım steril 50 ml santrifüj tüplerine alınarak 3950’ de rpm’de santrifüj edilmiştir. Daha sonra ilk süpernatant atılmış ve dipteki pelet 2 ml 1xTEN solüsyonu ile yavaş bir şekilde çözdürülmüştür. İki farklı mikrosantrifüj tüpüne aktarılaraq 14500 rpm’de 2 saat boyunca +4 °C’de santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonunda süpernatantlar atılarak 500 µl 1xTEN solüsyonundan eklenilmiştir ve 2 saat boyunca +4 °C’de yavaş bir şekilde çözdürülmüştür.

Daha sonra elde edilen örnekler tekrar RT-PCR yöntemi ile doğrulanıp konsantre protein miktarı Bradford protein test yöntemi (Bradford, 1976) temelli Biorad kiti ile ölçülmüştür.

3.3.7. Konsantre Protein Miktarının Ölçülmesi

Farelere ve tavşanlara verilecek antijen miktarını belirlenmesi için Bradford protein yöntemi yapılmıştır. Bu amaçla 0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2.5 mg/ml ve 5 mg/ml sığır serum albümin (bovine serum albümine, BSA) (Serva, 11943.01) standartları hazırlanılmıştır.

Standartlar ve virus örnekleri 96 kuyucuklu mikropleyte (SPL, 32296) 5’er µl eklenilmiştir. Daha sonra Biorad Dc Protein Assay (Kat: 500-0113) protein protokolüne göre Reagent A’dan 20’şer µl daha sonra 200’er µl Reagent B’den üzerlerine eklenilip spektrofotometre cihazında (Allsheng, AMR100) 650 nm dalga boyutunda okutulmuştur.

3.3.8. Virus İnaktivasyonu

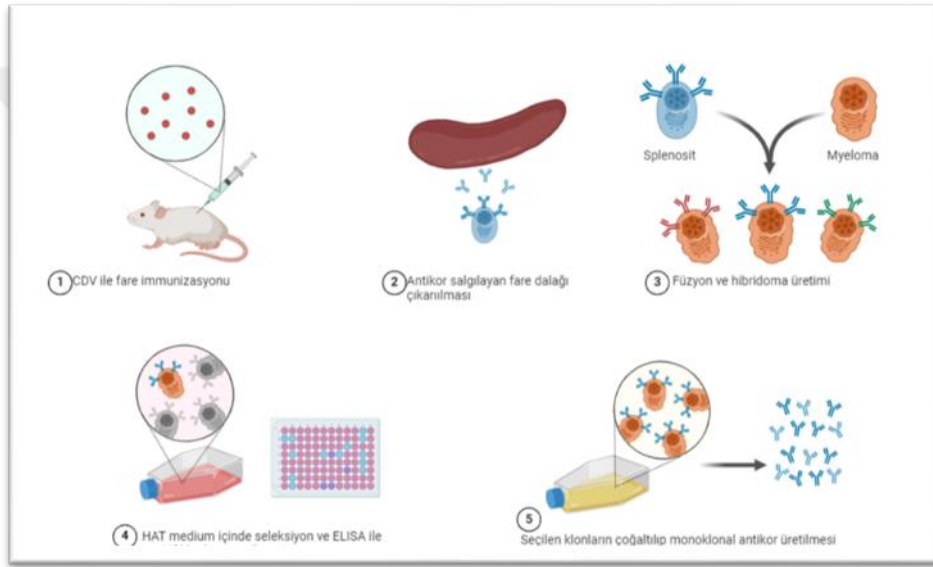
İzole edilen ve PEG8000 ile konsantre edilen izolat Biyogüvenlik kabininde UV altında 10 dk bekletildikten sonra kabinden kaldırılmıştır (Heaney ve ark., 2002).

İnaktivasyonun kontrol edilmesi amacıyla MDCK hücrelerine tekrar inoküle edilerek virusun çoğalmadığı ve inaktif olduğu hem CPE hem de RT-PCR yöntemi ile doğrulanılmıştır. CPE kontrolü için 12. güne kadar beklenilmiştir. PCR örnekleri için 3., 5., 7., 9. ve 12. günlerde ayrı ayrı kaldırılıp dondur çöz yapılarak RT-PCR yapılmıştır.

3.4. Monoklonal Antikor Üretimi

Monoklonal antikor üretimi için elde edilen izolat inaktif virusu kullanılmıştır.

Fare immunizasyonundan itibaren mAb'ların üretilip saflaştırılmasına kadar geçen işlemler aşağıdaki Şekil 3.1.'de belirtilmiştir.



Şekil 3.1. CDV ile fare immunizasyondan füzyon işlemine kadar sürecin şeması. Biorender programı ile oluşturulmuştur.

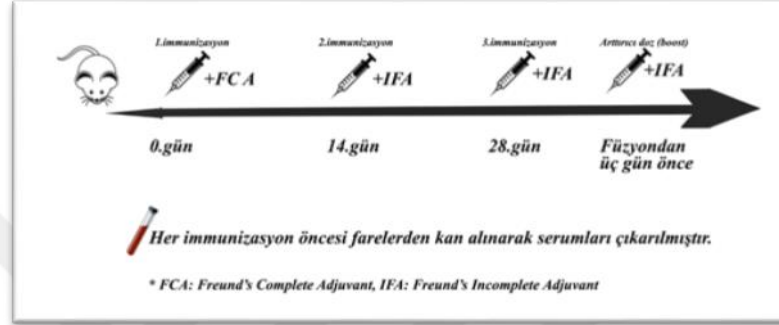
3.4.1. Fare İmmünizasyonu

İnaktif edilen CDV izolatı ile 6-8 haftalık 3 farklı dişi BALB/c fare immunize edilmiştir. Her immunizasyon 50 µg antijen olacak şekilde dilüsyon yapılarak immunizasyon yapılmıştır (Liu ve ark., 2017).

İlk immunizasyon 1:1 oranında Freund's Complete Adjuvant'ı (ThermoFisher, 77140) ile yapılmıştır. Daha sonraki 2 immunizasyon, bir önceki immunizasyondan 2 hafta sonra 1:1 oranında Freund's Incomplete Adjuvant'ı (ThermoFisher, 77145) ile immunizasyon yapılmıştır. Füzyondan 3 gün önce ise 1:1 oranında PBS + antijen karışımı ile arttırıcı doz (boost) yapılmıştır (Singh ve O'Hagan, 2003; Stills, 2005).

Her immunizasyon öncesi farelerden kan alınarak serumları çıkarılmıştır. Bunun için kanlar kuyruktan alınarak, oda ısısında 30 dk bekletilmiştir ve 2000 rpm’de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte çıkan serumlar steril yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılarak -20 °C’de saklanılmıştır (Şekil 3.2.).

Bu serumlar füzyon öncesi farenin antikor titresini belirleyebilmek için antikor-ELISA testinde kullanılmıştır.



Şekil 3.2. İmmunizasyon şeması. İlk immunizasyon FCA ile adjuvanize edilmiş olup, diğer immunizasyonları IFA ile adjuvanize edilmiştir.

Antikor-ELISA

Hazırlanılan solüsyonlar

- Yıkama solüsyonu: 1xPBS içerisinde %0.05 Tween 20 (Merck, 34321284)
- Bloklama solüsyonu: Yıkama solüsyonu içerisinde %5 yağsız süt tozu (Serva, 4259.01)
- 50 mM Karbonat buffer (1L için)
 - ❖ Sodyum karbonat (Na_2CO_3): 1.59 g
 - ❖ Sodyum bikarbonat (NaHCO_3): 2.93 g
 - ❖ 1 L distile su içerisinde çözündürüldükten sonra pH 9.6' ya ayarlanılmıştır.
- 0.05 M Substrat Solüsyonu
 - ❖ 0.2 M Sodyum dibazik fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$) (ISOLAB, 969.183.1000), 3.55g 100ml de çözündürülmüştür.
 - ❖ 0.1 M Sitrik Asit monohidrat (ISOLAB, 910.046.1000), 2.10 g 100 ml çözündürülmüştür.
 - ❖ Hazırlanan 0.2 M Sodyum dibazik fosfat dihidrat'tan 25.7 ml, 0.1 M Sitrik Asit monohidrat'tan 24.3 ml alınıp karıştırılır. pH 5.0' ayarlanılıp +4 °C'de saklanılmıştır.

Hazırlanan karbonat/bikarbonat buffer içerisinde dilüe edilmiş 500 ng/ml CDV eklenilerek +4 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi sabah yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde mikropleyt kuyucukları 3 defa yıkanılmıştır. Daha sonra üzerine 200 µl/kuyucuk bloklama solüsyonu eklenilip mikropleytin üzeri kapatılarak 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

Süre sonunda tekrar yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde 5 defa yıkanmıştır. Daha sonra üzerine aşağıdaki şekilde belirtilen şekilde fare serumları log₂ tabanında sulandırma yapılarak 100 µl/kuyucuk olacak şekilde ekleme yapılmış ve 1 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir (Şekil 3.3.).

	1.İ.	2. İ.	3.İ	Kontrol	1.İ.	2. İ.	3.İ	Kontrol	1.İ.	2. İ.	3.İ	Kontrol
A	1000	1000	1000	PK	1000	1000	1000	PK	1000	1000	1000	PK
B	2000	2000	2000	PK	2000	2000	2000	PK	2000	2000	2000	PK
C	4000	4000	4000	NK İ.Ö.	4000	4000	4000	NK İ.Ö.	4000	4000	4000	NK İ.Ö.
D	8000	8000	8000	NK İ.Ö.	8000	8000	8000	NK İ.Ö.	8000	8000	8000	NK İ.Ö.
E	16000	16000	16000	NK B.S.	16000	16000	16000	NK B.S.	16000	16000	16000	NK B.S.
F	32000	32000	32000	NK B.S.	32000	32000	32000	NK B.S.	32000	32000	32000	NK B.S.
G	64000	64000	64000	NK B.S.	64000	64000	64000	NK B.S.	64000	64000	64000	NK B.S.
H	128000	128000	128000	NK B.S.	128000	128000	128000	NK B.S.	128000	128000	128000	NK B.S.

1. FARE 2. FARE 3. FARE

Şekil 3.3 İmmünize farelerin antikor titrelerini belirlemek için dilüsyon oranları. **PK:** 3.immunizasyondan 2 hafta sonraki serum 1/500 dilüsyonu, **NK İ.Ö:** immunizasyon öncesi fare serumu, **NK B.S:** bloklama solüsyonu

Bu sırada bloklama solüsyonu içerisinde konjugat hazırlanılmıştır. Konjugat olarak HRP (Horseradish peroxidase) enzimi ile işaretli Goat-antimouse IgG (Southern Biotech, 1030-05) kullanılmıştır. Konjugat 1/3000 oranında bloklama solüsyonu içerisinde sulandırılmıştır (Dunn ve ark., 2001; Ginkel ve ark., 1999).

İnkübasyon sonunda yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde 5 defa yıkama yapılmıştır. Daha sonra 100 µl/kuyucuk olacak şekilde hazırlanan konjugat solüsyonundan eklenilmiştir ve 1 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 5 defa yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde yıkama yapılmıştır.

Yıkama sonunda substrat solüsyonundan eklenilmiştir. Bunun için 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma, T5525-50TAB) tableti 1 ml DMSO içerisinde vortex cihazında karıştırılarak çözündürülmüştür. Daha sonra önceden hazırlanılan 0.05 M substrat solüsyonundan 9 ml eklenilerek karıştırılmıştır. TMB' nin aktifleşmesi için kuyucuklara eklenmeden hemen önce 2 µl %30 Hidrojen peroksit (H₂O₂) solüsyonundan eklenilip karıştırılmıştır.

Son yıkama sonrası hazırlanılan TMB substrat solüsyonundan 100 µl/kuyucuk olacak şekilde eklenilerek 10 dk karanlık sahada inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurma solüsyonu (2 M sülfirik asit) ile 50 µl/kuyucuk olacak şekilde eklenilerek reaksiyon durdurulmuştur. Daha sonra 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede optik dansite (OD) değerleri ölçülmüştür. Cut-off değeri aşağıdaki gibi hesaplanılmıştır.

Cut-off: Negatif kuyucukların aritmetik ortalaması x 2

3.4.2. Miyeloma Hücrelerinin Hazırlanması

Çalışmaya başlamadan önce 50 ml steril santrifüj tüplerine %1 antibiyotik-antimikotik ve %10 FBS içeren RPMI 1640 vasatı hazırlanılmıştır.

Laboratuvar stoklarında bulunan F0 miyeloma hücreleri (ATCC, CRL-1646) -80 °C derin dondurucudan çıkarılarak 37 °C' de hızlıca çözölmüştür. Steril 15 ml santrifüj tüplerine çözödürlen hücre aktarılıp hazırlanılan vasattan 9 ml eklenilmiştir. 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir ve santrifüj sonrası süpernatant atılıp pelet çözödürlerek 1 ml vasat eklenilerek resüspanse edilmiştir.

Daha sonra 25 cm² hücre kültür flasklarına geçilmiştir ve 2 gün boyunca çoğalıp monolayer hale geldikten sonra pasajlama yapılmıştır. Bunun için hücre kültür kazıyıcıları (İsolab, 1.121.12.030) kullanılarak yapışan F0 miyeloma hücreleri kaldırılmıştır. Daha sonra steril 5 ml'lik pipet ile flaskların içi yıkanarak tamamı alınıp 15 ml santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Santrifüj dengeleri ayarlandıktan sonra 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak tüpün dibinde bulunan pelet %10 FBS içeren RPMI-1640 vasatından 1 ml eklenerek resüspanse edilmiştir. Daha sonra tamamı alınıp 75 cm² flaska geçilmiştir. %5 CO₂ 37 °C inkübatörde 3 gün boyunca bekletilmiştir. Hücreler 75 cm² flaskın tamamına yakın

kapladığında tekrar pasajlama yapılmıştır. Bu aşamada miyelomalara 50 ml'ye 1 ml Azaguanine (Sigma, A5284) eklenip füzyona kadar vasat içerisine Azaguanine eklenilerek devam edilmiştir (Greenfield, 2021). Daha sonra 2 tane 175 cm² hücre kültür flasklarında çoğaltılmıştır ve yeterli hücre elde edildikten sonra füzyona girilmiştir.

Hücreler füzyona girmeden yaklaşık 24 saat öncesinde pasajlama yapılmıştır. Çünkü Hurrell, miyeloma hücrelerinin G2+M fazının füzyon işleminde önemli olduğunu belirtmiştir (Hurrell, 1982).

Hücre sayımı KOVA-GRİD (Kova grid, 27144E) ile yapılmıştır. Bunun için öncelikle flasklarda bulunan hücreler kaldırılmıştır (Piccinini ve ark., 2017). Hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantları atılmıştır. Daha sonra hücreler çözdürülerek her bir santrifüj tüpü 1 ml %10 FBS içeren RPMI-1640 vasatı ile resüspanse edilmiştir. Daha sonra santrifüj tüplerinde bulunan hücrelerden 10 µl alınıp üzerine Tripan Mavisi (Biocencept, 5-72F00H) boyasından 90 µl eklenilmiştir ve ters mikroskop altında mavi tabla üzerine bulunan parlak hücreler sayılmıştır. Sayım lamı üzerinde 3x3 toplam 9 olmak üzere büyük kare ve her karenin içerisinde 3x3 toplam 9 küçük kare vardır. Hücreler sayıldıktan sonra aşağıdaki formüle göre hesaplama yapılmıştır.

3.4.3. Makrofaj Hücrelerinin Hazırlanılması

Bu aşamada 8 haftalık dişi BALB/c fare herhangi bir immunizasyon yapılmadan kullanılmıştır. Fare öncelikle 40-50 mg/kg intraperitoneal yolla Sodyum Pentobarbital (Cerrilant, 01-001-826) ile anesteziye alınmıştır (Dutton ve ark., 2019). Birkaç dakika parmak kısırtma yanıtları, palpebral ve kornea refleksleri ile anestezi derinliği test edilmiştir.

Anestezi sonrası fare servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilmiştir. Sakrifizasyon işleminden sonra fare %70 ethanol içerisine alınmıştır. Biyogüvenlik kabinine alındıktan sonra ayakları iğneyle sabitlenip orta-abdominal bölgesi öncelikle %10 povidon (Konix) ile temizlenip daha sonra derisi açılarak periton içerisine 5 ml serumsuz RPMI 1640 vasatından verilmiştir. Vasatın karın içerisine dağılmasını sağlamak için yavaş bir şekilde parmak uçlarıyla basınç yapılmıştır. Daha sonra yaklaşık 4 ml vasat tekrar enjektör içerisine çekilmiştir. (Şekil 3.4.)



Şekil 3.4. Farenden makrofaj eldesi için periton içi RPM1640 vasatından enjekte edilmesi.

Elde edilen bu vasat 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant atılarak 1 ml vasat ile resüspanse edilmiştir ve hücreler Tripan Mavisı ile sayılmıştır.

Elde edilen hücreler hazırlanan makrofaj vasatı (Tablo 3.4.) ile 6000 hücre / kuyucuk olacak şekilde süspanse edilerek 96 kuyucuklu hücre kültür pleytine 100 µl/kuyucuk olacak şekilde paylaştırılmıştır. Hücreler 100 µl/kuyucuk dağıtıldıktan sonra 1 gece 37°C %5 CO₂ inkübatörde inkübe edilmiştir.

Tablo 3.4. Makrofaj hücreleri için hazırlanılan vasat.

Eklenen Ürün	Oran
FBS	%20
L-glutamin	%2
D-glukoz	%2
Antibiyotik (penisilin-streptomisin)	%2
Sodyum Prüvat (50 mM)	0.45 mM/ µl
İnsülin (100U)	0.2 U/ µl
RPMI 1640	ile tamamlanır

3.4.4. Füzyon

Yapılan tüm işlemler Yücel'in çalışması optimize edilerek gerçekleştirilmiştir (Yucel, 2010)

Hazırlanan solüsyonlar

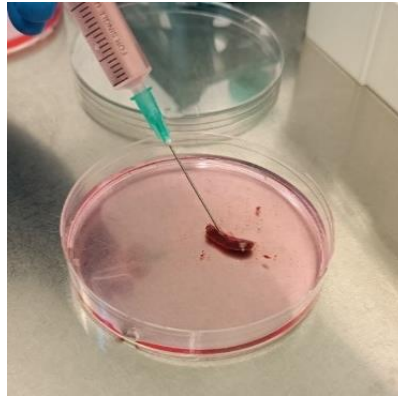
- M1: %2 penisilin-streptomisin antibiyotik + RPMI 1640
- M2: %2 penisilin-streptomisin antibiyotik + RPMI 1640 + %20 FBS
- Hemolitik Vasat
0.2 g Tris +0.88 g Amonyum kloride (Isolab, 903.033.1000) 100 ml distile su içerisinde çözülüp 0.45 µM enjektör filtreden filtre edilip kullanılmıştır.

Füzyon işlemi için antikor titresi en yüksek çıkan fare kullanılmıştır.

Fare öncelikle 40-50 mg/kg intraperitoneal yolla Sodyum Pentobarbital (Cerrilant, 01-001-826) ile anesteziye alınmıştır. Birkaç dakika parmak kıstırma yanıtları, palpebral ve kornea refleksleri ile anestezi derinliği test edilmiştir.

Anestezi sonrası servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilmiştir. Sakrifikasyon işleminden sonra fare %70 ethanol içerisinde alınmıştır. Daha sonra steril şartlarda ve kabin içerisinde orta abdominal bölgesi önce derisi daha sonra peritonu kesilerek abdomen bölgesinden iç organların ortaya çıkarılması sağlanmıştır.

Farenin sol tarafından bulunan dalağı yağlarından ayrılarak dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Steril petri kabının içerisinde bulunan 5 ml M1 içerisinde bırakılmıştır. Kontaminasyonu engellemek amacıyla hazırlanan M1 vasatı içeren 2. petri kabına dikkatli bir şekilde alınmıştır (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Fare sakrifikasyonu sonrası elde M1 vasatı içerisindeki dalak.

Daha sonra iki farklı 5 ml'lik enjektör içerisine 5'er ml M1 çekilmiştir. Dalak enjektör ucundaki iğne ile 40-50 adet delinerek içerisine her bir enjektörde 5 ml M1 bulunan vasattan enjekte edilmiştir. Böylece dalak hücreleri yani splenositlerin petri içerisine çıkarılması sağlanılmıştır. Daha sonra kalan dalak hücrelerini çıkarmak için doku-parçalayıcı (tissue-grander) içerisine alınıp hücreler tamamen çıkana kadar (dalak koyu kırmızı renkten açık şeffaf renge dönene kadar) parçalanmıştır.

Petri kabı içerisindeki hücreler M1 ile birlikte süspanse edilerek steril 50 ml santrifüj tüpüne alınmıştır. 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek hücrelerin dibe çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak pelet parmak darbeleriyle ayrıştırılmıştır.

Kan hücrelerinin yıkımı için hemolitik vasatından öncelikle 1 ml eklenerek resüspanse edilmiştir. Daha sonra üzerine 4 ml daha hemolitik vasatı eklenip 10 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Süre sonunda 5 ml M1 vasatından üzerine eklenip tekrar 1000 rpm 5 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak pelet çözdürülmüştür ve 1 ml M1 vasatından eklenerek resüspanse edilmiştir.

Daha sonra Tripan Mavisi ile hücre sayımı yapılmıştır. Bunun için KOVA grid kullanılmıştır. 1 ml hacimde bulunan hücre sayımı için 10 µl hücre alınmıştır. Daha sonra 90 µl M1 içerisinde sulandırılmıştır. Sulandırılan hücreden tekrar 10 µl alınıp üzerine 90 µl Tripan Mavisi boyası eklenmiştir. Böylece sulandırma oranı 100 kat olmuştur.

Lam üzerinde hücreler sayılarak aritmetik ortalaması alınmış ve aşağıdaki formüle göre hesaplama yapılmıştır.

$$\text{Hücre sayısı} \times \text{sulandırma oranı} \times 9 \times 10^4 = 1\text{ml hücre sayısı}$$

Bu işlem birlikte F0 miyeloma hücreleri 3 defa serumsuz RPMI 1640 vasatı ile yıkama yapılarak hazırlanılmıştır. Hücreler kaldırılıp 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantı atılmıştır. Serumsuz RPMI 1640 vasatı ile resüspanse edilerek 10 ml'ye tamamlanılmıştır ve tekrar santrifüj edilmiştir. Bu şekilde toplam 3 defa serumsuz vasat ile F0 miyeloma hücreleri yıkanarak hücrelerde bulunan serum kalıntıları atılmıştır.

Daha sonra splenositler, F0 miyeloma hücrelerinin üzerine aktarılmıştır. M1 ile 20 ml'ye tamamlanarak 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant dökülerek parmak darbeleriyle pelet çözdürülmüştür ve 37 °C benmari içerisinde konulmuştur.

Daha önceden ısıtılan 1 ml PEG 4000 (%50 w/v) (Roche, 60852500) 1 dk içerisinde yavaş bir şekilde ve karıştırılarak hücrelerin üzerine eklenilmiş ve 1 dk 37 °C benmari içerisinde inkübe edilmiştir. Üzerine 4 ml M1 2 dk içerisinde karıştırılarak eklenilmiştir. Daha sonra yine M1 vasatından 20 ml 3 dk içerisinde karıştırılarak eklenilmiştir. M2 vasatından üzerine 20 ml 3 dk içerisinde yine karıştırılarak eklenilmiştir ve 1 saat 37 °C %5 CO₂ inkübatörde inkübe edilmiştir.

Süre sonunda 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilip santrifüj sonrası süpernatant atılmıştır. Pelet parmak darbeleriyle ayrıştırılıp 1 ml M2 vasatı ile resüspanse edilmiştir. HAT besiyeri hazırlanarak içerisinde füzyon sonrası hazırlanan hücreler eklenip karıştırılmıştır. Daha sonra bir gün önceden hazırlanan makrofaj hücrelerini içeren pleytlere 150 µl /kuyucuk olacak şekilde kuyucuklara dağıtılmıştır (Tablo 3.5.).

Tablo 3.5. HAT besiyeri için hazırlanan karışım ve oranları.

Eklenen Ürün	Oran
HAT	%2
FBS	%20
L-glutamin	%2
D-glukoz	%2
Antibiyotik (penisilin-streptomisin)	%2
Sodyum Pirüvat (50 mM)	0.45 mM/ µl
İnsülin (100U)	0.2 U/ µl
RPMI 1640	İle tamamlanır

3.4.5. Pozitif Klonların Belirlenmesi ve oğaltılması

Füzyonun 10. günü sonunda klon oluşan kuyucuklar Antikor-ELISA yöntemi ile antikor yönünden taranmıştır.

Antikor-ELISA

Hazırlanılan solüsyonlar

- Yıkama solüsyonu: 1x PBS içerisinde % 0.05 Tween 20
- Bloklama solüsyonu: Yıkama solüsyonu içerisinde %5 yağsız süt tozu

Bir gece öncesinden ELISA pleytine karbonat/bikarbonat buffer (pH 9.6) içerisinde dilüe edilmiş 1 µg/kuyucuk olacak şekilde CDV izolatı eklenilerek +4 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi sabah yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde pleyt kuyucukları 3 defa yıkanılmıştır. Daha sonra üzerine 200 µl/kuyucuk bloklama solüsyonu eklenilip pleytin üzeri kapatılarak 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

Süre sonunda tekrar yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde 5 defa yıkanılmıştır. Daha sonra seçilen kuyucuklardan 100 µl örnek kuyucuklara eklenilmiştir ve 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

Bu sırada konjugat solüsyonu hazırlanılmıştır. Konjugat olarak HRP (Horseradish peroxidase) enzimi ile işaretili Goat-antimouse IgG kullanılmıştır. Konjugat 1/3000 oranında bloklama solüsyonu içerisinde sulandırılmıştır (Ginkel ve ark., 1999; Dunn ve ark., 2001).

İnkübasyon sonunda yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde 5 defa yıkama yapılmıştır. Daha sonra 100 µl/kuyucuk olacak şekilde hazırlanan konjugat solüsyonundan eklenilmiş ve 1 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 5 defa yıkama solüsyonu ile (200 µl/kuyucuk) yıkama yapılmıştır. Yıkama sonunda substrat solüsyonu içerisinde hazırlanılmış TMB 100 µl/kuyucuk olacak şekilde eklenilerek 10 dk karanlık sahada inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 2M sülfirik asit reaksiyonu durdurma solüsyonu (50 µl/kuyucuk) eklenilerek reaksiyon durdurulmuştur. Daha sonra 450nm dalga boyunda spektrofotometrede optik dansite (OD) değerleri ölçölmüştür.

Pozitif klonların belirlenebilmesi için Cut-off değeri hesaplanılmıştır. Cut-off değerinin üzeri pozitif olarak belirlenmiştir.

Cut-off = Negatif kuyucukların OD' lerinin aritmetik ortalaması x 2

ELISA sonucunda 96 kuyucuklu pleytte (CellStar, 655.180) bulunan pozitif klonlar kuyucuklarda pipetleme yapılarak kaldırılmış ve tamamı 24 kuyucuklu pleyte (SPL13485) aktarılmıştır. Üzerine hibridoma büyütme ortamından 1 ml eklenerek 2-3 gün boyunca çoğalmaları takip edilmiştir. Çoğalan klonlar tekrar antikor-ELISA ile test edilmiştir.

Daha sonra pozitif bulunan klonların tamamı alınıp sırası ile 25 cm² ve 75 cm² flasklara geçilerek çoğaltılmıştır. Bunun için HT içeren hibridoma besiyeri hazırlanılmıştır (Tablo 3.6.).

Tablo 3.6. HT medyumun hazırlanılması ve oranları.

Eklenen Ürün	Oran
HT	%2
FBS	%20
L-glutamin	%2
D-glukoz	%2
Antibiyotik (penisilin-streptomisin)	%2
Sodyum Prüvat (50 mM)	0.45 mM/ µl
İnsülin (100U)	0.2 U/ µl
RPMI 1640	ile tamamlanır

Tekrar antikor-ELISA testi ile kontrol edildikten sonra pozitif bulunan klonlar %90 FBS +%10 dimetil sülfosit (DMSO) (Serva, 39757.02) vasatı ile dondurulmuştur.

3.4.6. Antikor Saflaştırılması

Elde edilen pozitif klonlar flasklarda çoğaltılarak her 2 günde bir olmak üzere süpernatantları toplanılmıştır. Daha sonra toplanan süpernatantlar amonyum sülfat ile (ThermoFisher, 45216) konsantre edilmiştir (Harlow ve Lane, 1989).

Yöntem:

- Hücre kültürlerinden toplanan vasat 4 °C'de 30 dakika boyunca 3000 rpm'de santrifüj yapılmıştır.
- Süpernatantların üzerine yavaş bir şekilde satüre edilmiş amonyum sülfat solüsyonundan 1:1 oranında eklenilmiştir.
- Oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde 30 dk boyunca karıştırılmıştır.
- Daha sonra karışım 50 ml santrifüj tüplerine alınarak 4000 rpm'de 30 dk boyunca santrifüj edilmiştir.
- Süpernatantı dikkatli atılmıştır ve steril 1x PBS ile resüspanse edilmiştir.
- Resüspanse edilmiş çökelti diyaliz membranına (Sigma, D9402) aktarılacak 1x PBS içerisinde tuzları giderilmesi sağlanılmıştır. Bunun için toplam 2 defa 2 saatte bir 1x steril PBS' i değiştirmek üzere oda ısısında karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra +4 °C'de bir gece steril 1x PBS içerisinde inkübe edilmiştir.
- Ertesi sabah membrandan antikor alınarak steril santrifüj tüpüne aktarılmıştır.

Mevcut çalışmada kullanılacak antikorlar MabTrap Kiti (Cytiva, 71-5003-43 AK) kullanılarak saflaştırılmıştır. Kit prosedürüne göre öncelikle kit içerisindeki solüsyonların dilüsyonları hazırlanılmıştır.

Hazırlık

- 2.5 ml binding buffer'a 22.5 ml ddH₂O eklenerek karıştırılmıştır.
- 0.5 ml elüsyon buffer'a 4.5 ml ddH₂O eklenerek karıştırılmıştır.
- Daha sonra buffer'lar 0.45 µm enjektör filtreden geçirilmiştir.
- Antikorlarında korunması için toplanacak her 1 ml örnek için yaklaşık 100 µl nötralizan buffer kolonlardan geçirilmiştir.

Yöntem

- Üst kapak çıkarılarak ddH₂O ile tüp doldurulmuştur. Daha sonra kolonun ucundaki tıpa çıkartılarak 1 damla/saniye olacak şekilde etanol eklenilmiştir.
- Kolonu dengelemek için tekrar üzerine binding buffer'dan 3 ml eklenilmiştir.
- Amonyum sülfat ile konsantre edilen örnek damla damla eklenilmiştir.
- Daha sonra yaklaşık 5 ml binding buffer ile yıkama yapılmıştır.

- Üzerine 3 ml Elüsyon buffer'dan eklenerek steril 15 ml santrifüj tüpe aktarılmıştır.
- Kolondan 5 ml binding buffer'dan tekrar geçirilerek kaldırılmıştır.

Daha sonra Bradford test yöntemi (Bradford, 1976) ile antikor miktarı belirlenilmiştir.

Bu amaçla 0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15mg/ml ve 20 mg/ml sığır serum albümin (bovine serum albumine, BSA) (Serva, 11943.01) standartları hazırlanılmıştır. Standartlar ve örnekler 96 kuyucuklu mikroplyete (SPL, 32296) 5'er µl eklenilmiştir. Daha sonra Biorad Dc Protein Assay (Kat: 500-0113) protein protokolüne göre Reagent A ve Reagent S karışımında 20 µl ve 200'er µl Reagent B'den üzerlerine eklenilip spektrofotometre cihazında 650nm de okutulmuştur.

3.4.7. SDS ve Western Blot Yöntemi

Elde edilen mAb'ın karakterizasyonunu yapmak için Western Blot yöntemi yapılmıştır. Öncelikle sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel (SDS PAGE) hazırlanmıştır. Bunun için;

SDS PAGE Hazırlığı:

- %30 akrilamid karışımı
 - 29 g akrilamid (CHEMSOLUTE, 9912.500) + 1 g bisakrilamid (AppliChem, A3636.0100)
 - 100 ml dH₂O içerisinde çözündürülüp 0.45 µm enjektör filtreler ile filtre edilmiştir.
- 1.5 M Tris (pH 8.8)
 - 18.17 g Tris (AppliChem, A2264.0500) 100 ml dH₂O ile çözündürülmüştür. Daha sonra HCl asit ve NaOH kullanılarak pH 8.8'e ayarlanılmıştır.
- 1 M Tris (pH 6.8)
 - 12.114 g Tris (AppliChem, A2264.0500) 100 ml dH₂O ile çözündürülmüştür. Daha sonra HCl asit ve NaOH kullanılarak pH 6.8'e ayarlanılmıştır.
- %10 SDS
 - 10g SDS 100 ml dH₂O içerisinde çözündürülmüştür.

- %10 Amonyum persülfat (APS)
 - 1g APS (Sigma, A3678) 10 ml dH₂O içerisinde çözündürülmüştür.

SDS PAGE

Öncelikle toplam 10 ml hacimde %10'luk Resolving jel hazırlanılmıştır (Tablo 3.7.).

Tablo 3.7. Resolving jel hazırlama.

Eklenen Ürün	Miktarı
H ₂ O	4 ml
%30 akrilamid mix	3.3 ml
1.5 M Tris	2.5 ml
%10 SDS	0.1 ml
%10 APS	0.1 ml
TEMED	0.0004

Resolving jel 15 ml santrifüj tüpünde hazırlanılmıştır. Daha sonra önceden hazırlanılan Western blot sistemine aktarılmıştır. Daha sonra polimerleşmenin olması için yaklaşık 30 dk oda ısısında bekletilmiştir. Bu sırada proteinlerin bantlarının ayrılması için %5 oranında 5 ml stacking jel hazırlanılmıştır (Tablo 3.8).

Tablo 3.8. Stacking jel hazırlama.

Eklenen Ürün	Miktarı
H ₂ O	3.4 ml
%30 akrilamid mix	0.83 ml
1.5 M Tris	0.63 ml
%10 SDS	0.05 ml
%10 APS	0.05 ml
TEMED	0.0005

Resolving jel polimerleştikten sonra stacking jelden üzerine eklenilmiştir ve örneklerin kuyucuklara yüklenebilmesi için tarak yerleştirilmiştir. Oda ısısında polimerleşmesi için 30 dk inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.6.).



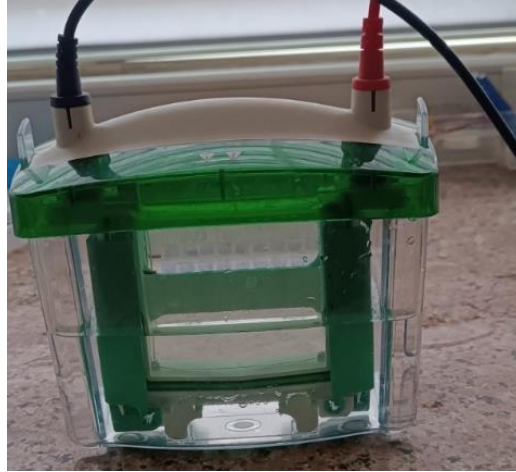
Şekil 3.6. SDS PAGE için hazırlanılan Biorad sistem. Resolving jel hazırlandıktan sonra 2 jel için ayrı ayrı cam arasına eklenilmiştir.

Bu sırada örnekler 4x laemmlı buffer (Biorad, 161-0747) ile hazırlanılmıştır.

Bunun için;

- 3 örnek : 1 laemmlı buffer (beta merkaptotoethanol içeren) olacak şekilde 9 μ l örnek + 3 μ l buffer eklenilmiştir.
- Daha sonra 95 °C'de 5 dk inkübe edilmiştir.

Stacking jel polimerleştikten sonra camlar Western blot sistemine yerleştirilmiştir. Taraklar çıkarılarak hazırlanılan örnekler eklenilmiştir. Tampon solüsyonu olarak Tris/Glisin buffer (ThermoFisher, 28363) eklenilmiştir (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Camlar Western blot sistemine yerleştirip örnekler eklenildikten sonra.

Elektroforez cihazında 120 V' da 130 dk yürütülmüştür.

Örneklerin camın en aşağısına indiği görüldükten sonra cihaz durdurulmuştur. Camlar dikkatli şekilde açıldıktan sonra bir tane jel commassie boyama için ayrılmıştır. Diğerleri ise Western blot tekniğinde kullanılmıştır.

Commassie Boyama

Commassie Mavisi boyaması Brunelli ve Green'in yöntemine göre yapılmıştır (Brunelle ve Green, 2014).

Hazırlık

- %50 hacim methanol, %10 hacim glacial asetik asit, %40 su içeren karışım hazırlandıktan sonra 1 g commassie boyası eklenip yaklaşık 4 saat karıştırılarak çözündürülmüştür.
- Daha sonra filtre kağıdı ile filtre edilerek oda ısısında depolanılmıştır.

Yöntem:

Jel bir kaba dikkatlice alındıktan sonra üzerine yaklaşık 50 kat oranında hazırlanan commassie solüsyonu eklenilmiştir. Mikrodalga fırında kaynayana kadar beklenilip oda ısısında soğumaya bırakılmıştır.

Daha sonra hazırlanan destaning solüsyonunda jel boyası çıkarılmıştır.

Destaning solüsyonu:

- 250 ml metanol + 50 ml asetik asit + 200 ml dH₂O karışımı hazırlanılmıştır.

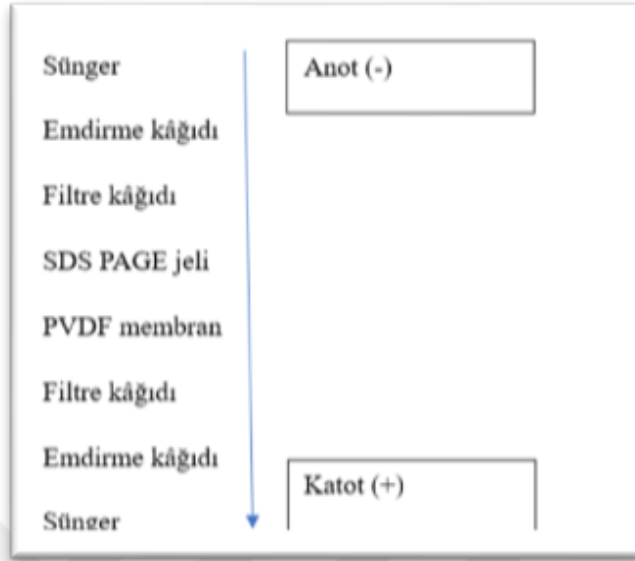
Western Blot Yöntemi

Hazırlık

- Yıkama Solüsyonu
 - 1x PBS içerisinde (%0.05 Tween 20)
- Bloklama Solüsyonu
 - Yıkama solüsyonu içerisinde %1 BSA

Western blot için ayrılan jelin üst stacking kısmı kesilip atılmıştır. Jel ile eş boyutta 0.45 µm polivinil diflorür membran (PVDF) kesilerek jelin üzerine yerleştirilmiştir. Sandviç olarak hazırlanan western sistemi aşağıda bildirilmiştir (Şekil 3.8). Daha sonra sandviç

tanka yerleştirilmiştir. Tris/glisin yürütme tamponu tank eklenilip 100V elektroforez de 1 saat boyunca jelden membrana aktarım sağlanılmıştır.



Şekil 3.8. Western blot transfer aşaması şeması.

Süre sonunda membran çıkarıldıktan sonra membranda protein marker bantları görülerek aktarımın gerçekleştirildiği doğrulanmıştır.

Yeni bir kaba alınan membranın üzerine bloklama solüsyonundan eklenilerek 1 saat oda ısısında çalkalayıcı karıştırılarak da inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonundan membranın üzerini kaplayacak kadar eklenerek 10 dk'da bir değiştirilmek üzere 3 defa yıkama solüsyonu ile yıkama yapılmıştır.

Daha sonra membran üzerine elde edilen monoklonal antikorlardan 40 µg olacak şekilde eklenilmiştir. 1 saat oda ısısında çalkalayıcıda karıştırılarak inkübe edildikten sonra 10 dk'da bir değiştirilmek üzere 3 defa yıkama solüsyonu ile yıkama yapılmıştır.

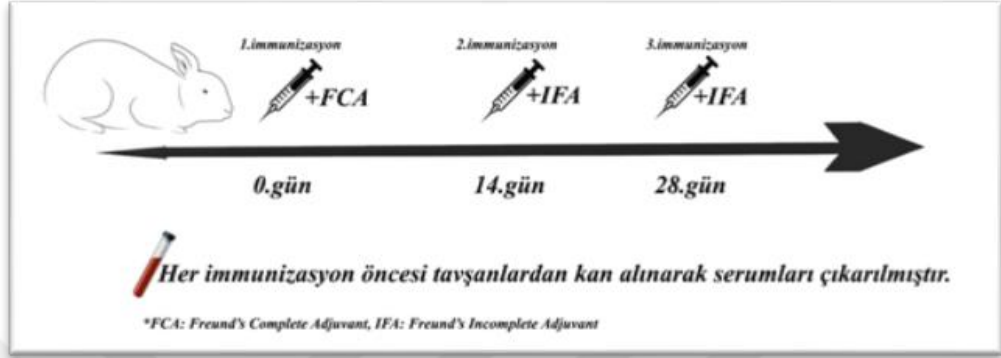
Bu sırada konjugat hazırlanmıştır. 1/1000 oranında goat antimouse HRP konjugatı bloklama solüsyonun içerisinde sulandırılmıştır. Yıkama sonrası konjugat eklenilip çalkalayıcı içerisinde 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası tekrar 3 defa 10'ar dk aralıklarla yıkama yapılmıştır. Yıkama sonunda ECL substrat (ThermoFisher, 32209) eklenilmiştir. 1 dk karanlık saha inkübasyonu sonrası Kemilüminesans cihazında (Invitrogen iBright™ CL750 Imaging System) görüntüleme yapılmıştır.

3.5. Poliklonal Antikor Üretimi

3.5.1. Tavşan İmmünizasyonu

Bu aşamada 6-8 aylık dişi Yeni Zelanda ırkı tavşana çalışmada elde edilmiş olan CDV izolatından 100 µg antijen ile adjuvanize edilerek inoküle edilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Tavşan immunizasyon şeması.

Tavşanlara toplamda ikişer hafta aralıklarla 3 immunizasyon yapılmıştır. İlk immunizasyon FCA adjuvanı ile 1:1 oranında sulandırılarak yapılmıştır. Diğer iki immunizasyon ise IFA adjuvanı ile 1:1 oranında sulandırma yapılarak immunize edilmiştir (Greenfield, 2020). Her immunizasyon öncesi kulak venasından kan örnekleri alınarak 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek serumları yeni steril santrifüj tüplerine alınmıştır. Serumlar kullanılana kadar -20 °C buzdolabında saklanılmıştır.

3.5.2. Tavşan Poliklonal Antikorların Titrelelerinin Belirlenmesi

Tavşan üç defa immunize edildikten sonra elde edilen poliklonal antikorların titrelelerinin belirlenmesi için Antikor-ELISA yöntemi yapılmıştır

Antikor-ELISA

Hazırlanılan solüsyonlar

- Yıkama solüsyonu: 1x PBS içerisinde %0.05 Tween 20
- Bloklama solüsyonu: Yıkama solüsyonu içerisinde %5 yağsız süt tozu

Bir gece öncesinden ELISA pleytine karbonat/bikarbonat buffer (pH 9.6) içerisinde dilüe edilmiş 1 µg/kuyucuk olacak şekilde CDV eklenilerek +4 °C'de inkübe edilmiştir. Ertesi sabah yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde pleyt kuyucukları 3

defa yıkanmıştır. Daha sonra üzerine 200 µl/kuyucuk bloklama solüsyonu eklenilip pleytin üzeri kapatılarak 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

Süre sonunda tekrar yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde 5 defa yıkanmıştır. Daha sonra aşağıdaki şekildeki gibi tavşanlardan elde edilen serumlar bloklama solüsyonu içerisinde sulandırılarak 100 µl/kuyucuk olacak şekilde eklenilmiştir ve 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.10).

	1.immunizasyon	2. immunizasyon	3. immunizasyon	Kontrol
A	1/2000	1/2000	1/2000	PK
B	1/4000	1/4000	1/4000	PK
C	1/8000	1/8000	1/8000	NK İÖ
D	1/16000	1/16000	1/16000	NK İÖ
E	1/32000	1/32000	1/32000	N.K BS
F	1/64000	1/64000	1/64000	N.K BS
G	1/128000	1/128000	1/128000	N.K BS
H	1/256000	1/256000	1/256000	N.K BS

Şekil 3.10. Tavşan immunizasyonları sonrası antikor titreleri için serumların sulandırılması ve örneklerin ELISA pleytine eklenilme şeması. **İ.Ö:** İmmünizasyon öncesi fare serumu, **B.S:** bloklama solüsyonu.

Bu sırada konjugat solüsyonu hazırlanılmıştır. Konjugat olarak HRP (Horseradish peroxidase) enzimi ile işaretli Goat-antirabbit (Southernbiotech, 4030-05) IgG kullanılmıştır. Konjugat 1/4000 oranında bloklama solüsyonu içerisinde sulandırılmıştır (Wimer-Mackin ve ark., 2006; Beauchemin ve ark., 2014).

İnkübasyon sonunda yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde 5 defa yıkama yapılmıştır. Daha sonra 100 µl/kuyucuk olacak şekilde hazırlanan konjugat solüsyonundan eklenilmiş ve 1 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 5 defa yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde yıkama yapılmıştır. Yıkama sonunda TMB substrat solüsyonundan 100 µl/kuyucuk olacak şekilde eklenilerek 10 dk karanlık sahada inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurma solüsyonu ile 50 µl/kuyucuk olacak şekilde eklenilerek reaksiyon durdurulmuştur.

Daha sonra 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede optik dansidite (OD) değerleri ölçülmüştür.

Pozitif klonların belirlenebilmesi için NK İÖ ve NK BS için ayrı ayrı Cut-off değeri hesaplanmıştır. Cut-off değerinin üzeri pozitif olarak belirlenmiştir.

Cut-off = Negatif kuyucukların OD' lerinin aritmetik ortalaması x 2

3.5.3. Tavşan Poliklonal Antikorumun Saflaştırılması

İmmunize tavşandan elde edilen serumlar amonyum sülfat ile (ThermoFisher, 45216) konsantre edilmiştir.

Yöntem:

- Tavşan serumları üzerine yavaş bir şekilde satüre edilmiş amonyum sülfat solüsyonundan 1:1 oranında eklenilmiştir.
- Oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde 30 dk boyunca karıştırılmıştır.
- 4 °C'de karıştırıcı da gece boyunca yavaş bir şekilde karıştırılmıştır.
- Daha sonra karışım 50 ml santrifüj tüplerine alınarak 4000 rpm'de 30 dk boyunca santrifüj edilmiştir.
- Süpernatantı dikkatli atılmıştır ve steril 1x PBS'den ile resüspanse edilmiştir.
- Resüspanse edilmiş çökelti diyaliz membranına (Sigma, D9402) aktararak 1x PBS içerisinde tuzları giderilmesi sağlanılmıştır. Bunun için toplam 2 defa 2 saatte bir 1x steril PBS'i değiştirmek üzere oda ısısında karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra +4°C'de bir gece steril 1x PBS içerisinde inkübe edilmiştir.

Mevcut çalışmada kullanılacak antikorlar MabTrap Kiti (Cytiva, 71-5003-43 AK) kullanılarak protein G kolunu ile saflaştırılmıştır. Kit prosedürüne göre öncelikle kit içerisindeki solüsyonların dilüsyonları hazırlanılmıştır.

Hazırlık

- 2.5 ml binding buffer'a 22.5 ml ddH₂O eklenerek karıştırılmıştır.
- 0.5 ml elüsyon buffer'a 4.5 ml ddH₂O eklenerek karıştırılmıştır.
- Daha sonra buffer'lar 0.45 µm enjektör filtreden geçirilmiştir.
- Antikorlarında korunması için toplanacak her 1 ml örnek için yaklaşık 100 µl nötralizan buffer kolonlardan geçirilmiştir.

Yöntem

- Üst kapak çıkarılarak ddH₂O ile tüp doldurulmuştur. Daha sonra kolonun ucundaki tıpa çıkartılarak 1 damla/saniye olacak şekilde etanol eklenilmiştir.
- Kolonu dengelemek için tekrar üzerine binding buffer'dan 3 ml eklenilmiştir.
- Çöktürülen örnek damla damla eklenilmiştir.
- Daha sonra yaklaşık 5 ml binding buffer ile yıkama yapılmıştır.
- Üzerine 3 ml elüsyon buffer'dan eklenerek steril 15ml tüpe aktarılmıştır.
- Kolondan 5 ml binding buffer'dan tekrar geçirilerek kaldırılmıştır.

Daha sonra Bradford test yöntemi ile antikor miktarı belirlenilmiştir.

Bu amaçla 1 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, sıgır serum albümin standartları hazırlanılmıştır. Standartlar ve örnekler 96 kuyucuklu mikroplyte (SPL, 32296) 5'er µl eklenilmiştir. Daha sonra Biorad Dc Protein Assay (Kat: 500-0113) protein protokolüne göre Reagent A ve Reagent S karışımında 20 µl ve 200'er µl Reagent B'den üzerlerine eklenilip spektrofotometre cihazında 650 nm dalga boyutunda okutulmuştur.

3.6. Saflaştırılmış Monoklonal Antikorların HRP Enzimi ile İşaretlenmesi

Elde edilen mAb'lar ayrı ayrı saflaştırıldıktan sonra ThermoFisher EZ-Link, (Cat: 31497) kit prosedürüne göre HRP enzimi ile işaretlenmiştir.

- Kit içerisinde bulunan toz haldeki PBS ddH₂O ile çözündürülmüştür.
- Liyofilize haldeki HRP enzimi 100 µl ddH₂O ile sulandırılmıştır.
- 1mg mAb 1 ml PBS içerisinde hazırlanılmıştır. Daha sonra üzerine hazırlanılmış olan 100 µl hacimdeki HRP enziminin tamamı aktarılmıştır.
- Çeker ocak içerisinde 10 µl Sodyum Siyanoborohidrat eklenilip 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir.
- Daha sonra üzerine 20 µl Quenching solüsyonundan eklenilip 15 dk oda ısısında inkübe edilmiştir.

Tuzlarından arındırılmak için diyaliz yapılmıştır. Bunun için;

HRP işaretli mAb diyaliz membranına (Sigma, D9402) aktararak 1x PBS içerisinde tuzların giderilmesi sağlanılmıştır. Bunun için toplam 2 defa 2 saatte bir 1x steril PBS ile (otoklav edilmiş) değiştirmek üzere oda ısısında karıştırıcı üzerinde inkübe

edilmiştir. Daha sonra +4 °C'de bir gece steril 1x PBS içerisinde inkübe edilmiştir. Ertesi sabah diyaliz membranındaki konjugatın tamamı alınıp kontrol edilmek üzere +4 °C'ye kaldırılmıştır.

3.7. Antijen ELISA Testinin Geliştirilmesi

Hazırlanılan solüsyonlar

- Yıkama solüsyonu: 1x PBS içerisinde %0.05 Tween 20
- Bloklama solüsyonu: Yıkama solüsyonu içerisinde %5 yağsız süt tozu

Bir gece öncesinden ELISA pleytine tavşan poliklonal antikorlar aşağıdaki şekilde belirtildiği gibi 1/1000, 1/2000, 1/3000, 1/4000, 1/5000, 1/6000 dilüsyonlarda karbonat/bikarbonat buffer (pH 9.6) içerisinde dilüe edilerek 100 µl/kuyucuk olacak şekilde eklenilmiştir ve +4 °C'de inkübe edilmiştir. Ertesi sabah yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde pleyt kuyucukları 3 defa yıkanmıştır. Daha sonra üzerine 200 µl/kuyucuk bloklama solüsyonu eklenilip pleytin üzeri kapatılarak 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda tekrar yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde 5 defa yıkanmıştır. Daha sonra şekilde belirtildiği gibi ilk 4 şerit 500ng CDV PEG8000 pürifiye antijeni bloklama solüsyonu içerisinde dilüe edilerek 100 µl/kuyucuk olacak şekilde eklenilmiştir. Şema da belirtilen yatay son dört şerit (E-H) negatif kontrol olarak belirlenmiştir ve sadece bloklama solüsyonu eklenilmiştir. Daha sonra 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

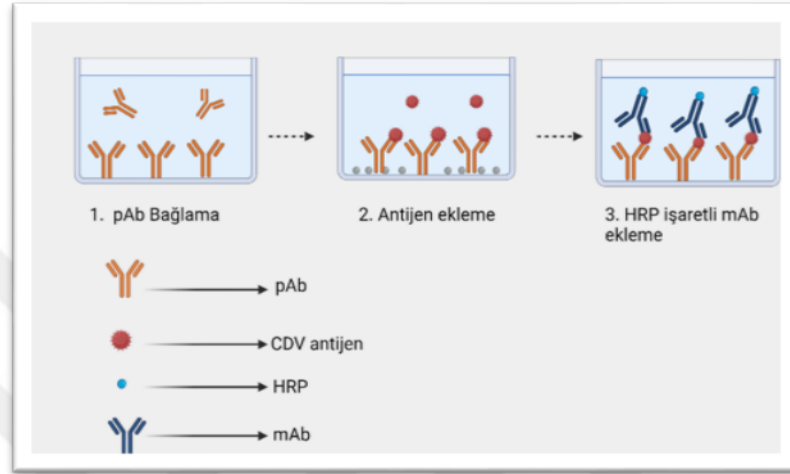
Bu sırada laboratuvar da elde edilen HRP enzimi ile işaretli mAb konjugatı dilüsyonları hazırlanmıştır. Konjugat 1/50, 1/100, 1/200 ve 1/400 olacak şekilde bloklama solüsyonu içerisinde sulandırılmıştır (Şekil 3.12.).

İnkübasyon sonunda yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde 5 defa yıkama yapılmıştır. Daha sonra 100 µl/kuyucuk olacak şekilde hazırlanan konjugat solüsyonundan eklenilmiş ve 1 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 5 defa yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde yıkama yapılmıştır. Yıkama sonunda substrat solüsyonundan 100 µl/kuyucuk olacak şekilde eklenilerek 10 dk karanlık sahada inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurma solüsyonu ile 50 µl/kuyucuk olacak şekilde eklenilerek reaksiyon durdurulmuştur.

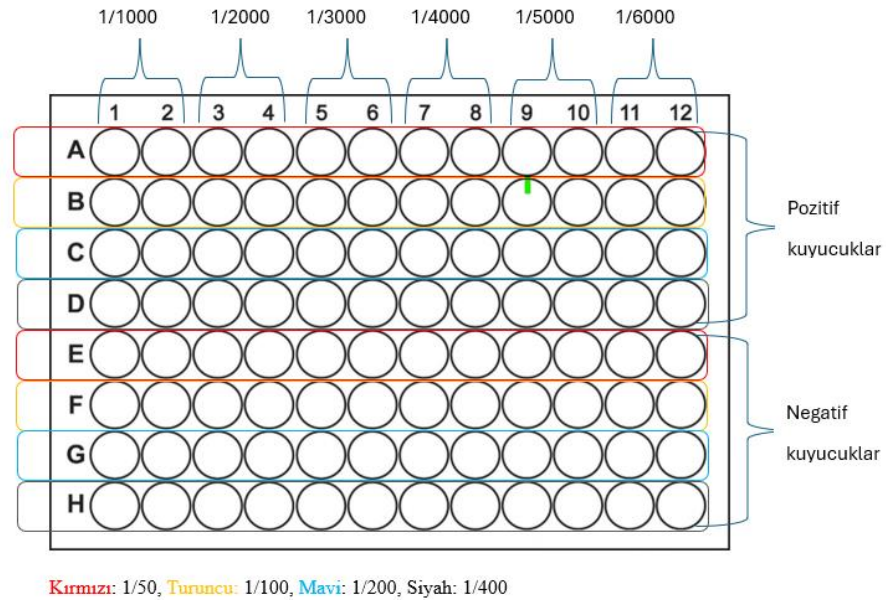
Daha sonra 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede optik dansidite (OD) değerleri ölçülmüştür. Pozitif kuyucukların belirlenebilmesi için Cut-off değeri hesaplanmıştır. Cut-off değerinin üzeri pozitif olarak belirlenmiştir.

Cut-off = Negatif kuyucukların OD' lerinin aritmetik ortalaması x 2

Geliştirilen antijen-ELISA testinin şematik görünümü Şekil 3.11.'de verilmiştir.



Şekil 3.11. Geliştirilen Antijen ELISA testi şeması.



Şekil 3.12. Antijen ELISA testi için optimizasyon şeması. **Poliklonal Antikor:** Dikey düzlemde 1/1000 – 1/6000 arası sulandırılmıştır. **Konjugat:** Yatay düzlemde 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 olacak şekilde sulandırılıp eklenilmiştir. A-E arası pozitif kuyucuklar, E-H arası negatif kuyucuklar (bloklama solüsyonu).

3.8. Antijen ELISA ile Örneklerin Taranması

RT-PCR ile pozitif olarak belirlenen 29 pozitif örnek ve 11 adet virus izolatu pozitif olarak kullanılmıştır. Laboratuvara farklı zamanlardan gelen RT-PCR ile negatiflikleri belirlenen 40 farklı örnek negatif olarak kullanılmıştır. Toplam 80 farklı örnek Antijen-ELISA ile taranılmıştır. Her örnek alt alta gelecek 2 kopya olarak eklenilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												PK
B												PK
C												NK HK
D												NK HK
E												BOŞ NK BS
F												NK BS
G												NK BS
H												NK BS

POZİTİF ÖRNEKLER	NEGATİF ÖRNEKLER
---------------------	---------------------

Şekil 3.13. Antijen ELISA için pleytletlere örneklerin yüklenmesi. Her örnek ikişer kopya olarak alt alta eklenilmiştir. RT-PCR sonucuna göre Kırmızı renkler pozitif, Mavi renkler negatif olarak eklenilmiştir. **PK:** MDCK34388 izolatu, **NK HK:** Hücre kültür vasatı, **NK BS:** Bloklama solüsyonu.

Hazırlanılan solüsyonlar

- Yıkama solüsyonu: 1x PBS içerisinde %0.05 Tween 20
- Bloklama solüsyonu: Yıkama solüsyonu içerisinde %5 yağsız süt tozu

Bir gece öncesinden ELISA pleytine tavşan poliklonal antikorlar optimize edilmiş oranda karbonat/bikarbonat buffer (pH 9.6) içerisinde dilüe edilerek 100 µl/kuyucuk olacak şekilde eklenilmiştir ve +4 °C'de inkübe edilmiştir. Ertesi sabah yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde pleyt kuyucukları 3 defa yıkanmıştır. Daha sonra üzerine 200 µl/kuyucuk bloklama solüsyonu eklenilip pleytin üzeri kapatılarak 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda tekrar yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde 5 defa yıkanmıştır. Daha sonra sahadan toplanılan köpek örnekleri eklenilmiştir ve 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

Bu sırada laboratuvar da elde edilen HRP enzimi ile işaretli mAb konjugatı dilüsyonları hazırlanmıştır. Konjugat optimize edildikten sonra etkin oranda bloklama solüsyonu içerisinde sulandırılmıştır.

İnkübasyon sonunda yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde 5 defa yıkama yapılmıştır. Daha sonra 100 µl/kuyucuk olacak şekilde hazırlanan konjugat solüsyonundan eklenilmiş ve 1 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 5 defa yıkama solüsyonu ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde yıkama yapılmıştır. Yıkama sonunda TMB ile hazırlanan substrat solüsyonundan 100 µl/kuyucuk olacak şekilde eklenilerek 15 dk karanlık sahada inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 2M sülfirik asit reaksiyonu durdurma solüsyonu ile 50 µl/kuyucuk olacak şekilde eklenilerek reaksiyon durdurulmuştur. Daha sonra 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede optik dansidite (OD) değerleri ölçülmüştür.

Pozitif kuyucukların belirlenebilmesi için Cut-off değeri hesaplanmıştır. Cut-off değerinin üzeri pozitif olarak belirlenmiştir.

Cut-off = Negatif kuyucukların OD' lerinin aritmetik ortalaması x 2

3.9. Antijen ELISA Testinin İstatistiksel Sonuçları

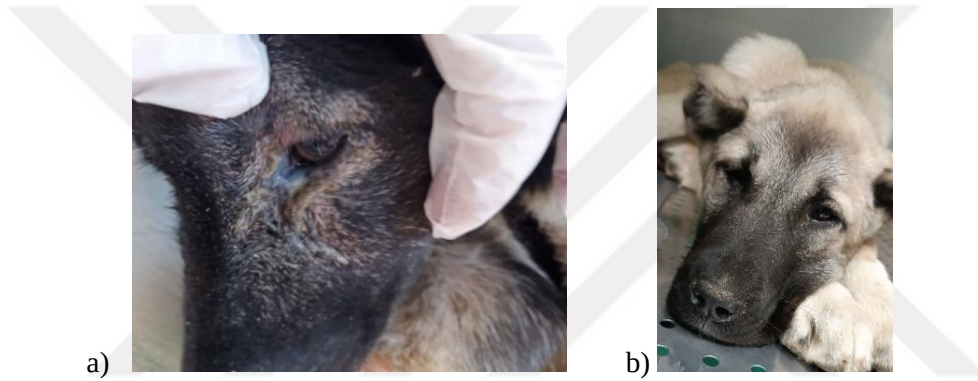
İstatistiksel sonuçlar köpeklerden elde edilen örneklerin RT-PCR testi ve geliştirilen Antijen ELISA testi verilerinin karşılaştırılması ile elde edilmiştir. Bu karşılaştırmaya göre Sensitivite (Duyarlılık) ve Spesifite (özellik) hesaplamaları Graphpad Prism 10 programı ile yapılmıştır. İstatistiksel analizler yapılmıştır. *p değeri* ($p < 0.05$) Fisher's exact test ile analiz edilmiştir.

İki farklı test yönteminde elde edilen sonuçlar ile hayvanların genel klinik bulgularının yüzdeleri hesaplanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Köpeklerden Elde Edilen Örnekler ve PCR ile Doğrulanması

Tez çalışması süresince Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Uygulama hastanesine gelen CDV şüpheli/pozitif köpeklerden örnekler alınmıştır. Şekil 4.1.'de solunum problemlili CDV pozitif köpeklerin klinik görünüşleri verilmiştir. Örnek alınan köpeklerin genel bilgileri Tablo 4.1'de bilgileri bulunmaktadır ve Şekil 4.2.'de klinik bulguların grafiği verilmiştir.



Şekil 4.1. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi'ne gelen CDV pozitif köpekler. a) serö-mukoz göz yaşı akıntısı, b) nasofarengeal buruntu akıntısı.

Tablo 4.1. Örnek alınan köpeklerin genel klinik bilgileri.

Örnek	Yaş (Ay)	Ateş (≥ 38.5)	Klinik Bulguları	RT-PCR Sonuçları	Antijen ELISA Sonuçları	CPE Pozitif Örnekler*
1.	6	38.5	Solunum	Pozitif	Pozitif	
2.	14		Nörolojik	Pozitif	Pozitif	+++
3.	7		Nörolojik	Pozitif	Pozitif	
4.	9		Nörolojik	Pozitif	Pozitif	
5.	12	39.3	Solunum	Pozitif	Pozitif	+++
6.	11	39	Karışık	Negatif	Pozitif	

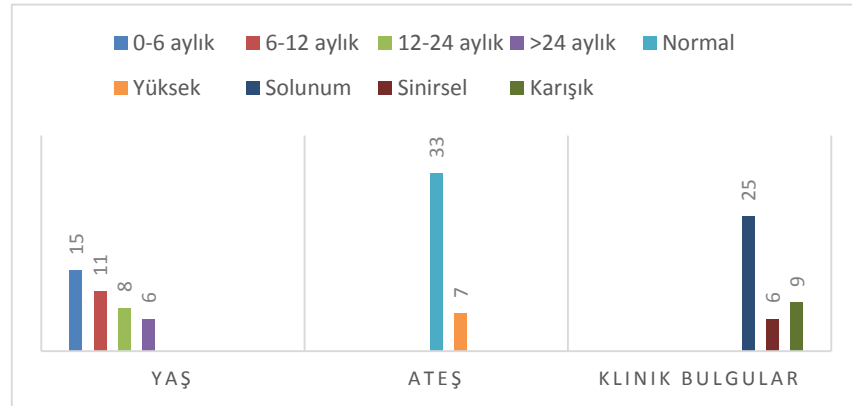
Tablo 4.1. Devam

7.	6		Karışık	Negatif	Pozitif	
8.	3	38.6	Karışık	Pozitif	Pozitif	+++
9.	24		Nörolojik	Negatif	Pozitif	
10.	10		Solunum	Pozitif	Pozitif	+
11.	12		Nörolojik	Negatif	Negatif	
12.	29		Solunum	Negatif	Negatif	
13.	37		Karışık	Pozitif	Pozitif	++
14.	49		Solunum	Pozitif	Pozitif	+++
15.	6		Solunum	Pozitif	Pozitif	
16.	15		Karışık	Negatif	Negatif	
17.	9		Nörolojik	Negatif	Pozitif	
18.	24		Solunum	Pozitif	Pozitif	+++
19.	3		Solunum	Pozitif	Pozitif	++
20.	8		Solunum	Negatif	Negatif	
21.	8		Solunum	Pozitif	Pozitif	+++
22.	23		Karışık	Pozitif	Negatif	
23.	5		Karışık	Pozitif	Negatif	
24.	6	40.6	Solunum	Pozitif	Pozitif	+++
25.	8	41	Solunum	Pozitif	Pozitif	+++
26.	6		Solunum	Pozitif	Negatif	
27.	4		Solunum	Pozitif	Pozitif	

Tablo 4.1. Devam

28.	4		Solunum	Pozitif	Pozitif	
29.	5		Solunum	Pozitif	Negatif	
30.	5		Solunum	Pozitif	Pozitif	+++
31.	8	39.5	Karışık	Pozitif	Pozitif	+++
32.	18		Solunum	Pozitif	Pozitif	
33.	95		Solunum	Negatif	Negatif	
34.	15		Solunum	Negatif	Negatif	
35.	71		Solunum	Pozitif	Negatif	
36.	4		Solunum	Pozitif	Pozitif	+++
37.	15		Solunum	Negatif	Negatif	
38.	13		Solunum	Pozitif	Pozitif	+++
39.	6		Karışık	Pozitif	Pozitif	
40.	4		Solunum	Pozitif	Pozitif	

* CPE pozitif örneklerin kaçınıcı pasajda pozitif olduğu + işareti ile gösterilmiştir.
 +: 1.kör pasaj, ++: 2.kör pasaj, +++: 3.kör pasaj



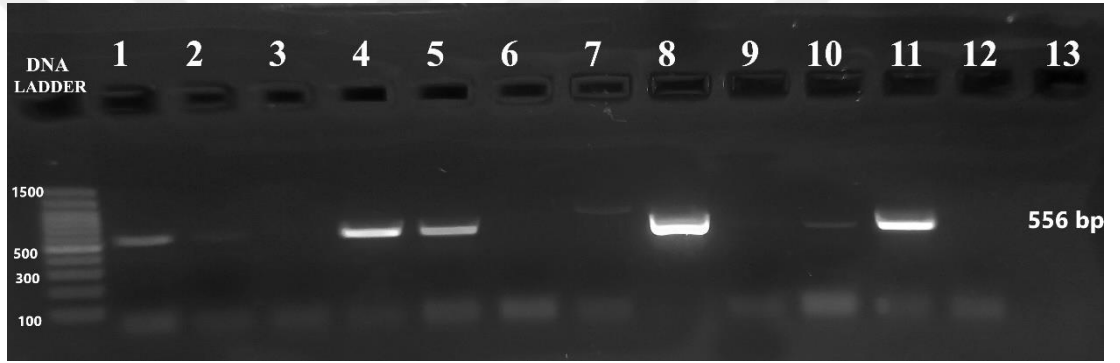
Şekil 4.2. Örnek toplanan köpeklerin genel özellikleri.

Örneklerin genel özellikleri;

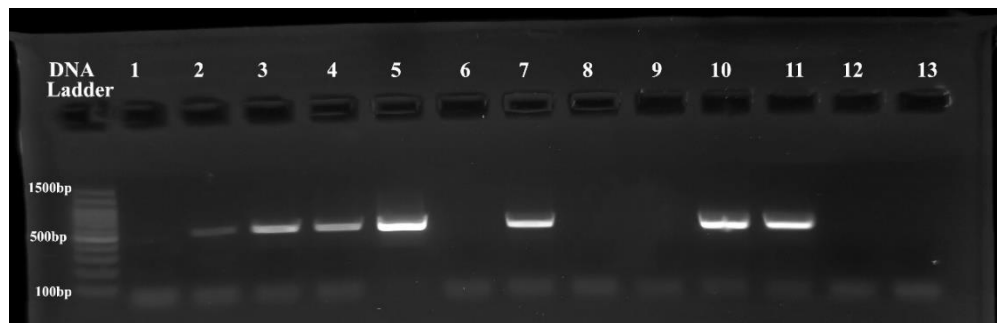
- Klinik bulgusuna göre; solunum problemi olan 25 (%62.5), sinirsel problemi olan 6 (%15), karışık bulgu gösteren (solunum+sinirsel) 9 (%22.5) örnek bulunmuştur.
- 40 hayvanın 15'i (%37.5) 0-6 aylık, 11'i (%27.5) 6-12 aylık, 8'i (%20) 12-24 aylık ve 6'sı (%15) >24ay olarak kaydedilmiştir.
- 7 hayvanda (%17.5) yüksek ateş (>38.5°C) saptanmıştır.

4.2. Virus İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Örnekler toplandıktan sonra F geni primerleri kullanılarak RT-PCR yapılmıştır (Şekil 4.3.).

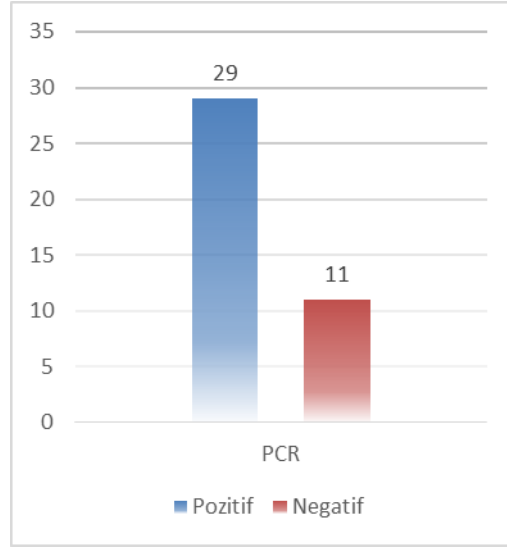


Şekil 4.3. (a) RT-PCR yapılan bazı örnekler. 11: Pozitif kontrol, 12: Negatif kontrol



Şekil 4.3.(b). RT-PCR yapılan bazı örnekler. 11: Pozitif kontrol, 13: Negatif kontrol

RT-PCR sonucuna göre 556 bp pozitif olarak değerlendirilmiştir (Romanutti ve ark., 2016).



Şekil 4.4. RT-PCR sonuçları.

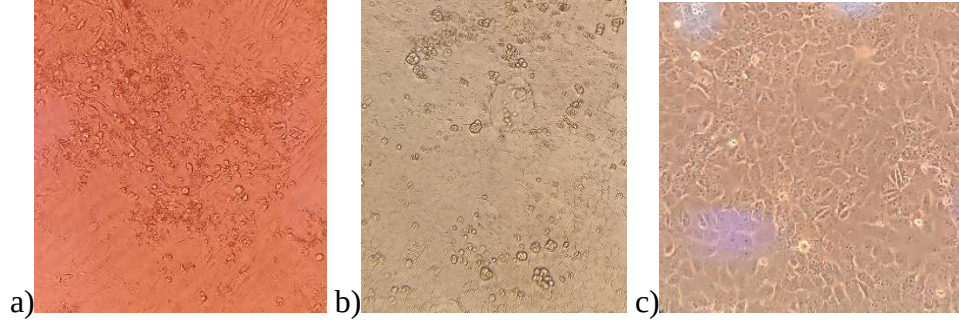
RT-PCR sonucuna göre;

- 40 örnekten 29 pozitif (%72.5), 11 negatif (%27.5) olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.4).
- Solunum problemi olan 20 (%68.96), sinirsel problemi olan 3 (%10.34), karışık klinik bulgu gösteren 6 (%20.68) köpek bulunmuştur.
- Yine RT-PCR ile, yüksek ateş belirtileri ($>38.5^{\circ}\text{C}$) gösteren 7 köpeğin 6'sı pozitif çıkarken, ateşi normal olan 33 köpeğin 23'ü pozitif olarak değerlendirilmiştir.
- Örneklerin alındığı 40 köpeğin yaşı 15'i (%37.5) 0-6 aylık, 11'i (%27.5) 6-12 aylık, 8'i (%20) 12-24 aylık ve 6'sı (%15) >24 ay olarak kaydedilmiştir. RT-PCR testine göre bu yaş aralıklarında pozitif köpek sayısı sırasıyla; 14 (%48.27), 7 (%24.13), 5 (%17.24) ve 3 (%10.34) olarak bulunmuştur.

Köpeklerden elde edilen örneklerden virus izolasyonu yapılmıştır. Örnekler laboratuvarında inokulum haline getirildikten sonra 24 kuyucuklu pleytlere ekim yapılmıştır.

Örnekler MDCK hücrelerine ekildikten sonra günlük olarak hücre kültür mikroskopunda CPE (cytopathic effect) için hücre yuvarlaklaşması ve vakuolizasyonu açısından araştırılmış ve Tablo 4.1. de belirtilen bazı örnekler pozitif olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.5).

Örneklerden; 1. Pasajda 1 örnek, 2. Pasajda 2 örnek ve 3. Pasajda 12 örnek olmak üzere toplam 15 farklı örnek CPE bakımınının pozitif bulunmuştur. CPE pozitif örnekler daha sonra yine RT-PCR ile spesifik 556 bp'lik CDV F bandı görülmesi ile doğrulanmıştır.



Şekil 4.5. MDCK hücrelerine ekilen virusun 8. günde görüntüsü. a) 37319 numaralı örnek, b) 34388 numaralı örnek, c) kontrol MDCK hücresi.

Her örnek daha sonra aynı şekilde 2 defa daha ekim yapılarak toplam 3 kör pasaj yapılmıştır. Kör pasajlamanın sonunda Şekil 4.5.'de belirtildiği üzere 37319 ve 34388 numaralı örneklerde CPE görülmüştür. Daha sonra tüm örnekler RT-PCR ile doğrulanmıştır.

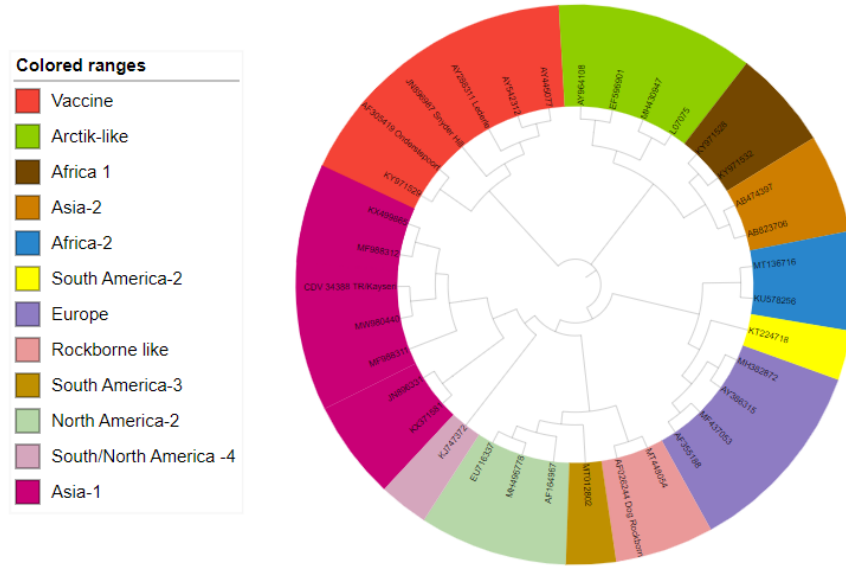
MDCK hücre kültüründe kör pasajlama sırasında 1.pasajda en belirgin CPE gösteren ve PCR güçlü pozitif çıkan 34388 numaralı örnek filogenetik analiz ve monoklonal-poliklonal antikor üretimi için kullanılmıştır.

4.3. Virus İzolatının Moleküler Karakterizasyonu ve Biyoinformatik Analiz

MDCK34388 izolatı hizmet alımı ile Sanger sekanslama yaptırılmış ve elde edilen sekans için biyoinformatik analiz yapılmıştır.

Sekans bilgileri “.fasta” formatında indirilip MEGA11 programı ile alignment edilmiş ve filogenetik analiz yapılmıştır (Şekil 4.8). Elde edilen filogenetik analiz iTOL veri tabanı ile renklendirme ve suş tayini yapılmıştır (Şekil 4.6).

Sekans NCBI GenBank’ a PQ537086.1 kayıt numarası ile eklenilmiştir.

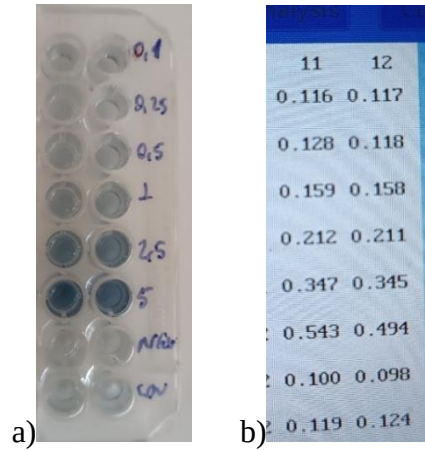


Şekil 4.6. Filogenetik ağaç ve suşlara göre renklendirme.

4.4. Polietilen Glikol ile Virus Konsantrasyonu ve Bradford Protein Testi ile Virus Miktarının Ölçülmesi

PEG8000 ile MDCK34388 izolatu Bradford protein test yöntemine dayanan Biorad Protein test kiti kullanılarak protein miktar tayini yapılmıştır

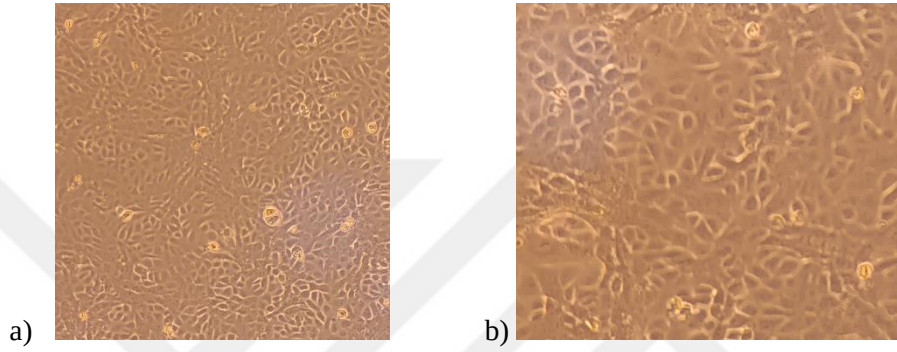
İzolatu OD değeri 0.25 mg/ml BSA ile benzer olduğu için izolat miktarı olarak bu oran kaydedilmiştir (Şekil 4.7.).



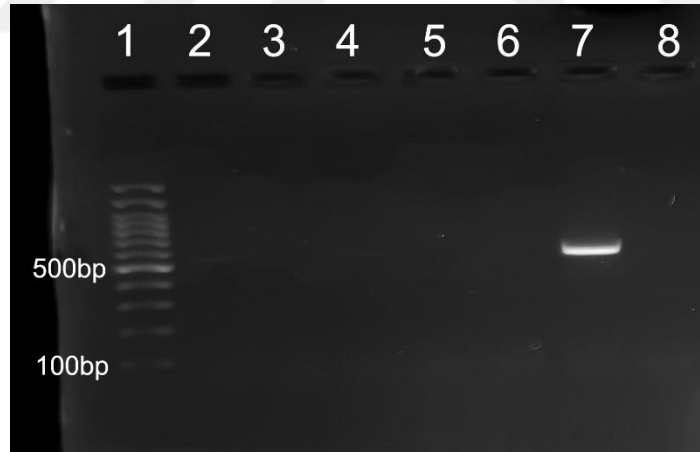
Şekil 4.7. PEG 8000 ile konsantre edilen MDCK34388 izolatu Bradford protein testi ile sonucu. **a)** Protein testi, **b)** spektrofotometre cihazı ile 650nm dalga boyutunda okutulması sonucu OD değerleri.

4.5. Virus İnaktivasyonu

UV altında inaktive edilen MDCK34388 numaralı izolat, kontrol edilmek üzere tekrar MDCK hücrelerine ekim yapılmış ve 12 gün boyunca mikroskop altında takibi yapılarak CPE negatif olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8.). Yine inaktivasyon sonrası MDCK hücre kültürüne ekilen ve farklı günlerde dondur-çöz yapılarak kaldırılan izolat örnekleri RT-PCR ile kontrol edilerek inokulumların inaktivasyonlarının doğrulaması yapılmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.8 İnaktivasyon sonrası hücre. Adsorbsiyonla 10. gün sonunda inaktive edilen örnekte CPE görülmemiştir. a) MDCK hücre kontrol, b) İnaktive MDCK34388



Şekil 4.9. İnaktivasyon sonrası farklı günlerde RT-PCR sonucu agaroz jel görüntüsü. MDCK hücre kültürüne ekilen ve farklı zamanlarda dondur-çöz yapılarak kaldırılan örnekler. **1:** DNA marker, **2:** 3.gün, **3:** 5.gün, **4:** 7.gün, **5:** 9. gün, **6:** 12.gün, **7:** pozitif kontrol, **8:** Negatif kontrol.

4.6. Monoklonal Antikor Üretimi

4.6.1. Fare İmmünizasyonları

Fareler MDCK34388 numaralı CDV ile inaktivasyon sonrası komple virion olarak immunize edilmiştir. Her immunizasyon 50 µg antijen olacak şekilde dilüsyon yapılarak immunizasyon yapılmıştır (Şekil 4.10.)

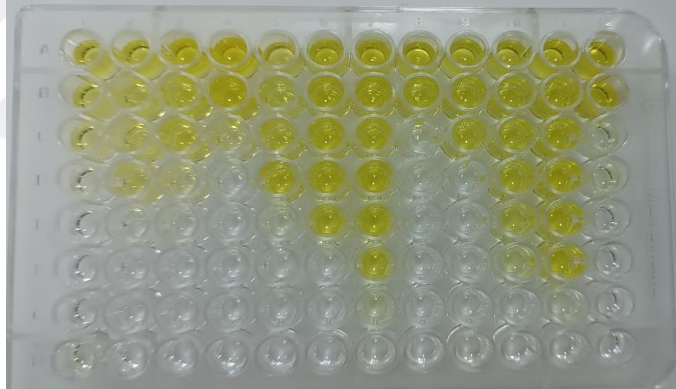
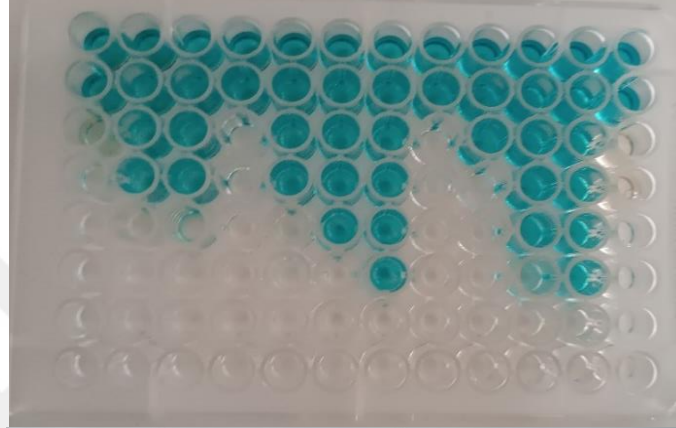


Şekil 4.10. Fare immunizasyonları.

Her immunizasyon öncesi farelerden kan alınarak serumları çıkarılmıştır. Bu serumlar füzyon öncesi farenin antikor titresini belirleyebilmek için Antikor-ELISA testinde kullanılmıştır. Farelerin antikor titresini 3. immunizasyon sonrası ELISA testi ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.11.). Fare serumlarından gelebilecek arka plandan dolayı immunizasyon öncesi cut-off değeri dikkate alınarak antikor oranları belirlenmiştir. MDCK34388 ile immunize edilen 2 numaralı farede 1/64000 antikor titresini görüldüğü için (Şekil 4.12.) hedeflenen en az antikor titresine ulaşılmıştır. Bu nedenle füzyon işlemi bu fare ile yapılmıştır.

	1.İ.	2.İ.	3.İ.	Kontrol	1.İ.	2.İ.	3.İ.	Kontrol	1.İ.	2.İ.	3.İ.	Kontrol
A	1000	1000	1000	PK	1000	1000	1000	PK	1000	1000	1000	PK
B	2000	2000	2000	PK	2000	2000	2000	PK	2000	2000	2000	PK
C	4000	4000	4000	NK İ.Ö.	4000	4000	4000	NK İ.Ö.	4000	4000	4000	NK İ.Ö.
D	8000	8000	8000	NK İ.Ö.	8000	8000	8000	NK İ.Ö.	8000	8000	8000	NK İ.Ö.
E	16000	16000	16000	NK B.S.	16000	16000	16000	NK B.S.	16000	16000	16000	NK B.S.
F	32000	32000	32000	NK B.S.	32000	32000	32000	NK B.S.	32000	32000	32000	NK B.S.
G	64000	64000	64000	NK B.S.	64000	64000	64000	NK B.S.	64000	64000	64000	NK B.S.
H	128000	128000	128000	NK B.S.	128000	128000	128000	NK B.S.	128000	128000	128000	NK B.S.

1. FARE 2. FARE 3. FARE



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.608	0.705	1.097	1.584	0.509	0.949	0.962	0.900	0.846	0.756	0.981	1.067
B	0.474	0.515	0.675	1.250	0.443	0.907	1.055	0.786	0.789	0.725	0.922	0.969
C	0.388	0.385	0.633	0.233	0.602	0.943	0.761	0.093	0.624	0.707	0.886	0.120
D	0.127	0.446	0.236	0.061	0.775	0.892	0.978	0.085	0.067	0.694	1.079	0.138
E	0.059	0.106	0.124	0.059	0.107	0.751	0.865	0.061	0.063	0.474	0.906	0.048
F	0.063	0.054	0.054	0.050	0.090	0.047	0.672	0.052	0.056	0.252	0.925	0.053
G	0.054	0.049	0.079	0.051	0.107	0.050	0.158	0.048	0.047	0.045	0.118	0.052
H	0.110	0.051	0.048	0.054	0.058	0.049	0.093	0.048	0.087	0.049	0.089	0.054

Şekil 4.11. Fare immunizasyonları sonrası Antikör ELISA sonuçları. **a)** İmmunize farelerin antikör titrelerini belirlemek için dilüsyon oranları. PK: 3.immunizasyondan 2 hafta sonraki serum 1/500 dilüsyonu, NK İ.Ö: immunizasyon öncesi fare serumu, NK B.S: bloklama solüsyonu **b)**15dk karanlık saha inkübasyon sonrası, **c)** durdurma solüsyonu sonrası, **d)** 450nm dalga boyutunda okuma sonrası OD değerleri.

Bu sonuçlara göre Cut-off değerleri:

$$1. \text{Fare NK İ.Ö.: } (4C+4D) / 2 \times 2 = (0.233 + 0.061) / 2 \times 2 = 0.294$$

$$1. \text{Fare NK BS: } (4E+4F+4G+4H) / 4 \times 2 = (0.059+0.050+0.051+0.054) / 4 \times 2 = 0.108$$

$$2. \text{Fare NK İ.Ö.: } (8C+8D) / 2 \times 2 = (0.093+0.085) / 2 \times 2 = 0.178$$

$$2. \text{Fare NK BS: } (8E+8F+8G+8H) / 4 \times 2 = (0.061+ 0.052+ 0.48+ 0.048) / 4 \times 2 = 0.105$$

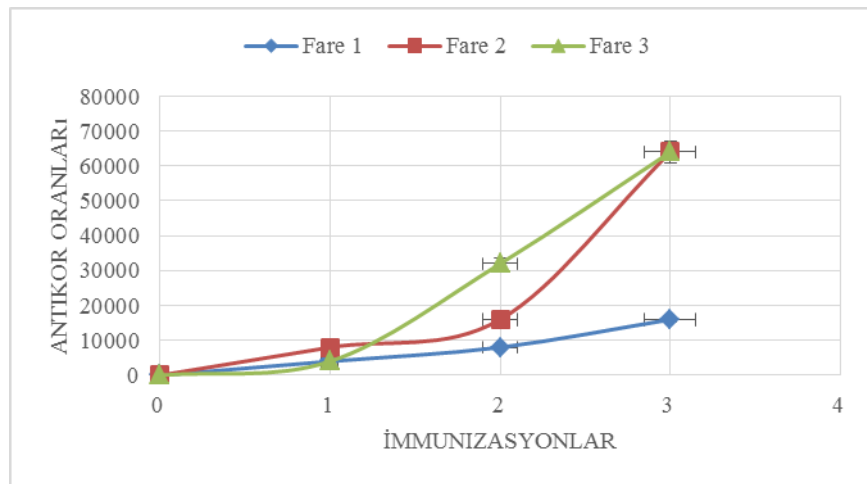
$$3. \text{Fare NK İ.Ö.: } (12C+12D) / 2 \times 2 = (0.120+ 0.138) / 2 \times 2 = 0.258$$

$$3. \text{Fare NK BS: } (12E+12F+12G+12H) / 4 \times 2 = (0.048+0.053+0.052+0.054) / 4 \times 2 = 0.104$$

	1. fare	2. fare	3. fare
NK İ.Ö.	0.294	0.178	0.258
NK B.S.	0.108	0.105	0.104

İmmünizasyon öncesi Cut-off değerlerine göre fare immünizasyon oranları;

	1. fare	2. fare	3. fare
1. immünizasyon	1/4000	1/8000	1/4000
2. immünizasyon	1/8000	1/16000	1/32000
3. immünizasyon	1/8000 1/16000	– 1/64000	1/64000

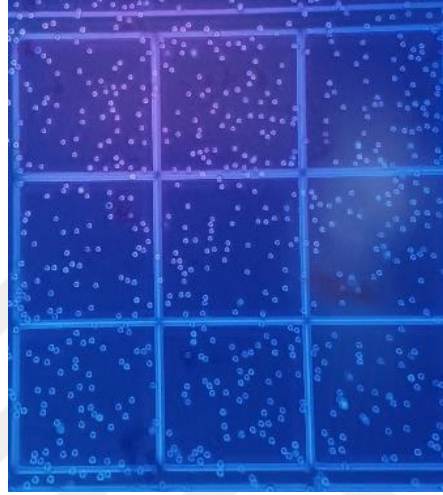


Şekil 4.12. MDCK-34388 ile immünize edilen farelerin antikoru titreleri.

4.6.2. Füzyon

Anestezi sonrası 2 numaralı fare servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiştir. Daha sonra orta abdominal bölgeden steril şartlarda dalağı çıkarılarak dalak hücreleri ayrıştırılmıştır.

Miyeloma hücreleri, makrofaj hücreleri ve Splenosit hücreleri Tripın mavisi boyası kullanılarak Kova Grid marka ürün ile hücre sayımı yapılmıştır (Şekil 4.13.).

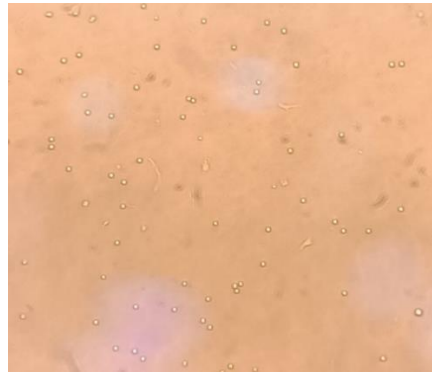


Şekil 4.13. Tripın mavisi içerisinde hücre sayımı.

Hücre sayısı x sulandırma oranı x $9 \times 10^4 = 1\text{ml}$ hücre sayısı

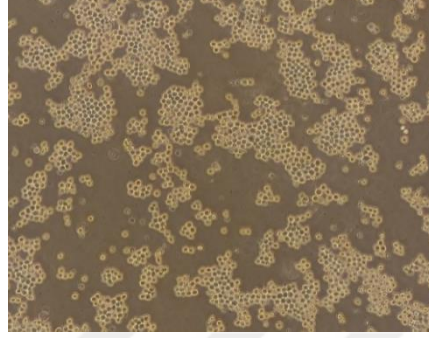
$23 \times 10 \times 9 \times 10^4 = 21 \times 10^6$ hücre ile füzyona girilmiştir.

Bir gün öncesinden 11 tane 96 kuyucuklu hücre kültür pleytine 6000 hücre / kuyucuk olacak şekilde makrofaj hücreleri geçilmiştir (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. Makrofajların 10x büyümede ters mikroskoptaki görüntüsü.

Füzyon işleminden önce -80 °C de bulunan F0 miyeloma hücreleri çözündürülerek hücre kültür flasklarında çoğaltılmıştır. Füzyona girildiğinde hücrelerin logaritmik fazda olacak şekilde 24 saat öncesinden pasajlama yapıp hedeflenen sayıda hücre için 2 tane 175 cm² flaskta çoğaltılmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. F0 miyeloma hücresinin Füzyon günü görüntüsü.

MDCK-34388 ile immunize edilen fare anestezi sonrası servikal dislokasyon ile ötanazi edilmiştir. Daha sonra steril ortamda dalak hücreleri ayrıştırıldıktan sonra PEG-4000 ile füzyon yapılmıştır. Bu işlemler Şekil 4.16.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Füzyon işlemi için fare dalak hücrelerinin çıkarılması.

F0 miyeloma: splenosit, 1:5 olacak şekilde 108×10^6 splenosit: 21×10^6 F0 miyeloma hücresi kullanılmıştır.

Füzyon sonrası hücreler hazırlanan makrofaj hücrelerinin üzerine 150 µl hücre/kuyucuk olacak şekilde eklenilmiştir (Şekil 4.17.).



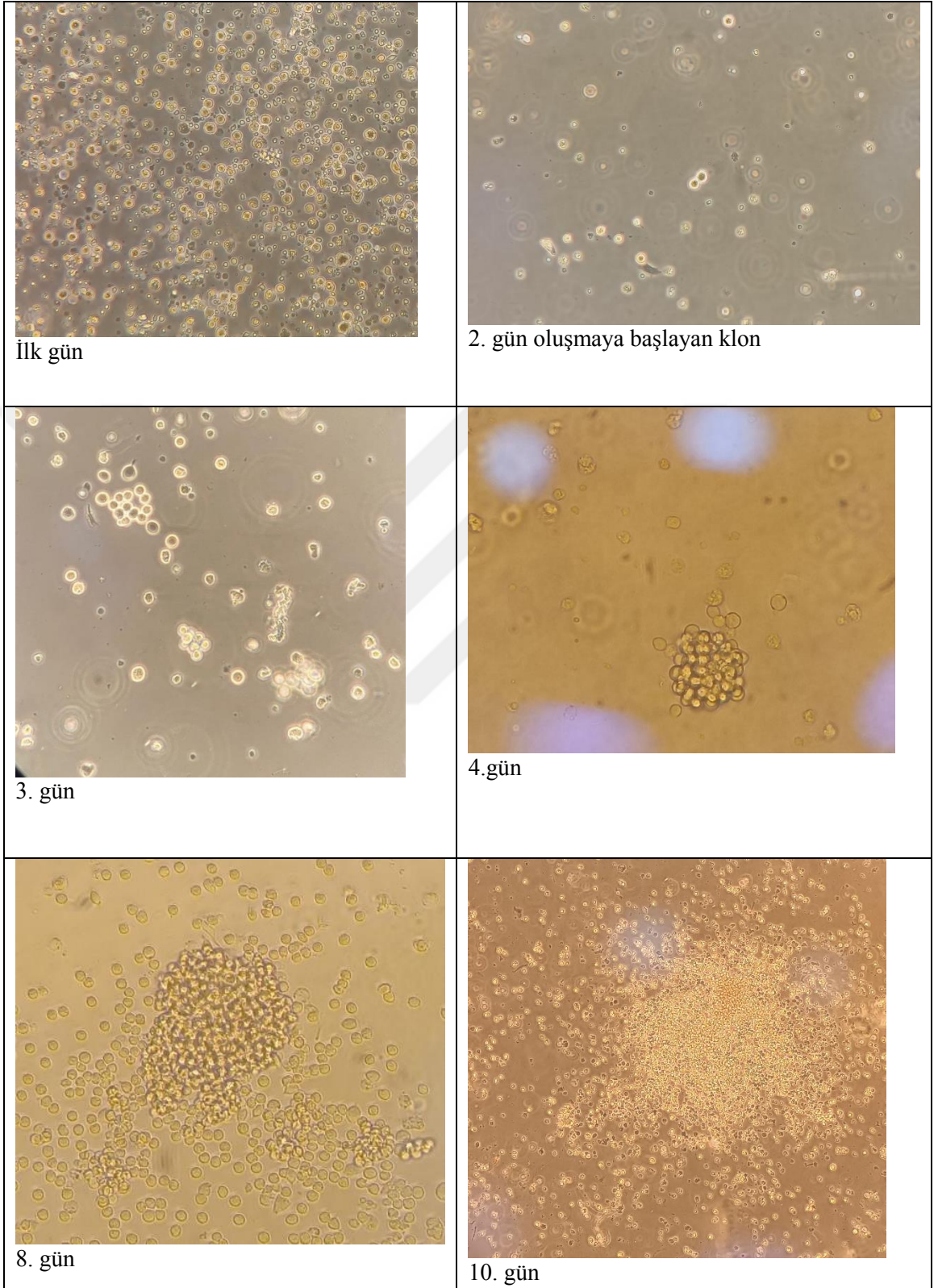
Şekil 4.17. Makrofaj hücrelerinin üzerlerine füzyon sonrası F0: splenosit hücrelerin eklendikten sonraki görüntü.

Füzyon işleminden sonra günlük olarak ters mikroskop altında hücreler incelenmiştir. HAT besiyeri ortamında füzyonun 2. gününden itibaren (Tablo 4.2.) füzyona girmemiş miyelomaların, 4. günden itibaren ise füzyona girmemiş splenosit hücrelerinin canlılıklarını devam ettiremediği görülmüştür.

Tablo 4.2. HAT besiyeri için hazırlanılan karışım ve oranları.

Eklenen Ürün	Oran	Miktarı
HAT	%2	3.2 ml
FBS	%20	32 ml
L-glutamin	%2	3.2 ml
D-glukoz	%2	3.2 ml
Antibiyotik (penisilin-streptomisin)	%2	3.2 ml
Sodyum Pirüvat (50 mM)	0.45 mM/ µl	1.44 ml
İnsülin (100U)	0.2 U/ µl	0.32 ml
RPMI 1640	160 ml'ye tamamlanır	116.7 ml

Aşağıdaki şekilde günlük klonların büyümeleri kaydedilmiştir (Şekil 4.18.).

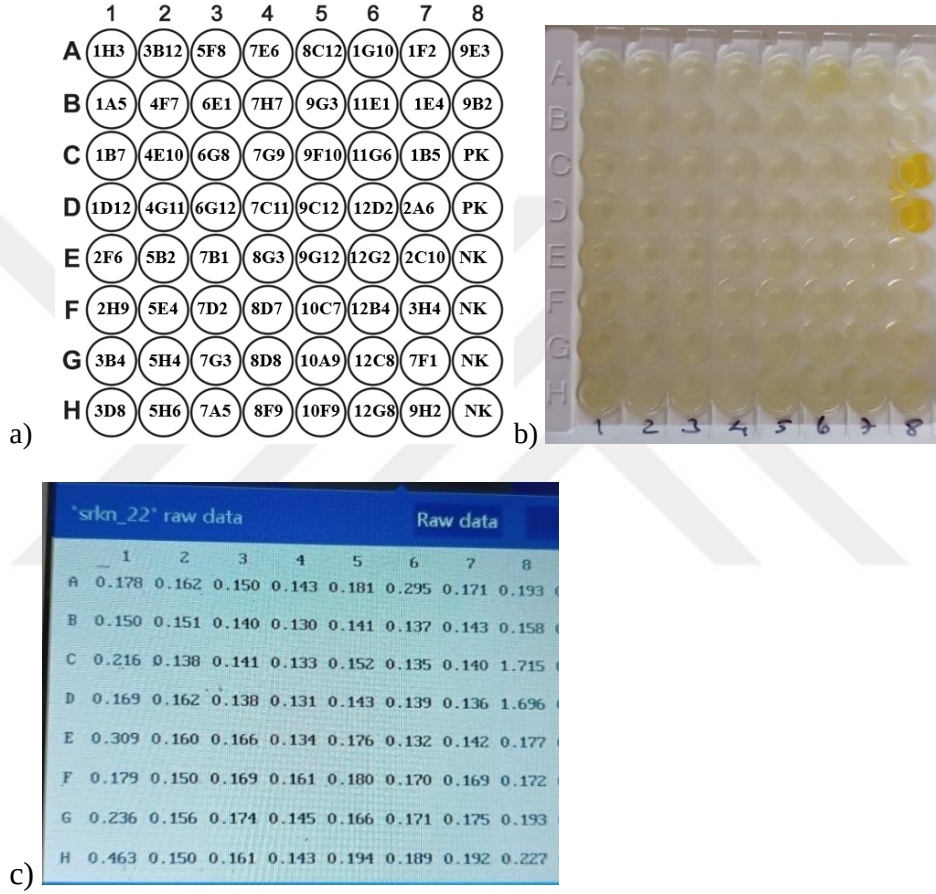


Şekil 4.18. Füzyon işlemi sonrası HAT ortamında klonların oluşması.

4.6.3. Pozitif Klonların Belirlenmesi ve Çoğaltılması

Füzyonun 10. gün sonrası büyüyen ve HAT besiyerinden etkilenmeyen klonlar belirlenmiştir. Toplam 1056 kuyucuktan 129 kuyucukta klon belirlenerek Antikor-ELISA yöntemi ile antikor yönünden inceleme yapılmıştır (Şekil 4.19.).

Bu klonlardan pozitif veren 62 klon seçilmiş 24 kuyucuklu hücre kültür pleytine alınmış ve 3 gün sonra tekrar ELISA ile antikor yönünden taramalar yapılmıştır.



Şekil 4.19. Pozitif klonların ELISA testi. a) Klonların yükleme sırası, b) Durdurma solüsyonu (2M sülfirik asit) eklendikten sonra c) 450nm dalga boyutunda spektrofotometre’ de okutulması sonrası OD değerleri.

Cut-off değeri ;

$$[(E8 + F8 + G8 + H8) / 4] \times 2$$

$$[(0.177+0.172+0.193+0.227)/4] \times 2=0,3845$$

Cut-off değeri üzerindeki ve yakın OD değerleri pozitif olarak kabul edilmiştir.

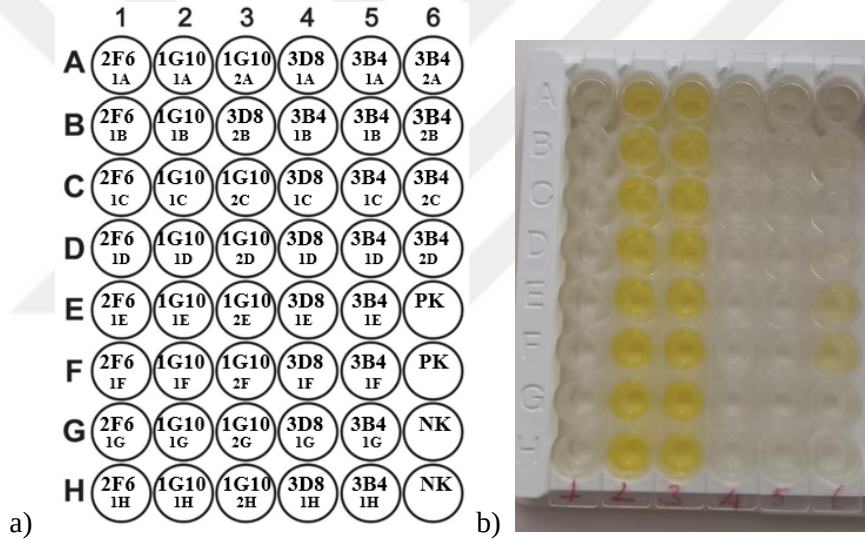
Buna göre; 2F6, 3B4, 3D8 ve 1G10 pozitif olarak kabul edildi.

Daha sonra 4 klonun alt dilüsyonları yapılarak çoğaltıldı ve tekrar ELISA ile antikor taraması yapıldı (Şekil 4.20.).

Klonların büyütülmesi HT içeren hibridoma besiyerinde yapılmıştır (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. HT besi yeri.

Eklenen Ürün	Oran	Miktarı
HT	%2	3.2 ml
FBS	%20	32 ml
L-glutamin	%2	3.2 ml
D-glukoz	%2	3.2 ml
Antibiyotik (penisilin-streptomisin)	%2	3.2 ml
Sodyum Prüvat (50 mM)	0.45 mM/ µl	1.44 ml
İnsülin (100U)	0.2 U/ µl	0.32 ml
RPMI 1640	160 ml tamamlanır	116.7 ml



c)

	1	2	3	4	5	6	7
A	0.126	0.736	0.699	0.129	0.123	0.180	0.000
B	0.093	0.728	0.683	0.094	0.099	0.287	0.000
C	0.102	0.713	0.732	0.111	0.106	0.068	0.000
D	0.114	0.718	0.666	0.100	0.111	0.804	0.000
E	0.090	0.668	0.667	0.088	0.088	0.331	0.000
F	0.089	0.771	0.724	0.081	0.084	0.358	0.000
G	0.133	0.673	0.796	0.104	0.101	0.099	0.000
H	0.113	0.744	0.646	0.110	0.096	0.092	0.000

Şekil 4.20. Pozitif klonların alt dilüsyonları ELISA testi. a) Klonların yükleme sırası, b) Durdurma sonrası görüntü c) 450 nm dalga boyutu okuma sonrası OD değerleri.

Cut-off değeri;

$$[(G6+H6) / 2] \times 2$$

$$[(0.099+0.092)/2] \times 2=0.191$$

Cut-off değeri sonucunda 1G10 klonunun tüm alt klonları pozitif olarak görülmüştür. Bunun yanı sıra 3B4 klonundan yalnızca 2B ve 2C alt klonları pozitiflik vermiştir. Diğer klonların tamamı alt klonları ile negatif çıkmıştır.

3B4-2B ve 3B4-2C alt klonları ise bir sonraki pasajlama da antikor üretmeyi durdurmuşlardır.

Daha sonraki çoğaltmalarda yalnızca 1G10 pozitif sonuç vermiştir. Bu nedenle 1G10 alt klonlarının tamamı 25 cm² flasklara alınarak çoğaltılmış, tekrar ELISA ile antikor pozitiflikleri doğrulanmıştır.

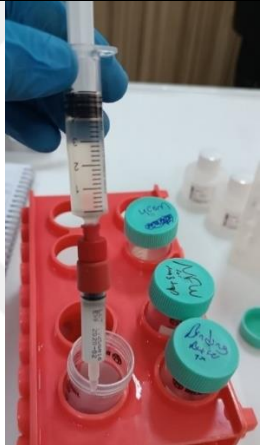
Pozitif klonlar %90 FBS + %10 DMSO içeren vasat ile dondurulmuştur.

4.6.4. Monoklonal Antikor Saflaştırılması ve Protein Ölçümü

1G10 klonun 1A, 2A ve 1FGH (1F+1G+1H) klonları ayrı ayrı 175 cm² flasklarda çoğaltılmıştır. Daha sonra her üç günde bir olmak üzere 1000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiş süpernatantları toplanılmıştır. Ayrıca santrifüj sonrası klonların %50’ si de alt pasajlar halinde dondurulmuştur.

Saflaştırma için örnekler öncelikle amonyum sülfat ile konsantre edilmiş ve daha sonra Protein G kolonu kullanılarak affinite kromatografi yöntemi ile saflaştırılmıştır.

Bu süreç Şekil 4.21’de verilmiştir.

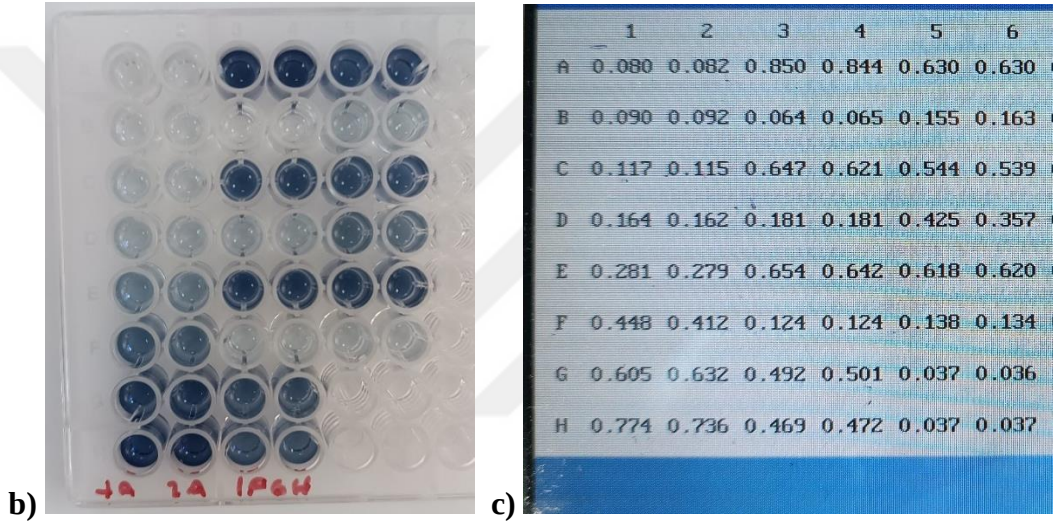
 Amonyum sülfat ile hibridoma süpernatantı 30 dk oda ısısında karıştıktan sonra.	 Karışımın santrifüj öncesi görüntü	 3950 rpm'de 20 dk +4°C'de karıştıktan sonra.
 Santrifüj sonrası oluşan pelet.	 Her klon ayrı ayrı çöktürüldükten diyaliz edilmiştir. Mavi:1A Turuncu:2A Mor: 1FGH	 Bir gece diyaliz sonrası Protein G kolonu ile mAb'ların saflaştırılmıştır.

Şekil 4.21. Amonyum sülfat ile antikor konsantrasyonundan Protein G ile antikor saflaştırmasına kadar geçen işlemler.

Saflaştırma ve diyaliz işlemleri sonrası elde edilen her ürün için protein analizi yapılmıştır (Şekil 4.22.) ve Tablo 4.4.'de protein miktarları verilmiştir.

0.1 mg/ml	0.1 mg/ml	20 mg/ml	20 mg/ml	2A D.S.	2A D.S.
0.25 mg/ml	0.25 mg/ml	N-SU	N-SU	2A Elüsyon	2A Elüsyon
0.5 mg/ml	0.5 mg/ml	1A Ö.S.	1A Ö.S.	1FGH Ö.S.	1FGH Ö.S.
1 mg/ml	1 mg/ml	1A Y.S.	1A Y.S.	1FGH Y.S.	1FGH Y.S.
2.5 mg/ml	2.5 mg/ml	1A D.S.	1A D.S.	1FGH D.S.	1FGH D.S.
5 mg/ml	5 mg/ml	1A Elüsyon	1A Elüsyon	1FGH Elüsyon	1FGH Elüsyon
10 mg/ml	10 mg/ml	2A Ö.S.	2A Ö.S.	2A D.S.	2A D.S.
15 mg/ml	15 mg/ml	2A Y.S.	2A Y.S.	2A Elüsyon	2A Elüsyon

a) Ö.S: Örnek Sonrası, Y.S.: Yıkama Sonrası, D.S.: Diyaliz Sonrası



Şekil 4.22. Saflaştırma sonrası ve diyaliz sonrası her aşama için Bradford protein testi. a) Saflaştırılma sonrası Protein test kiti için örneklerin yüklenme sırası. b) Test sonucu, c) spektrofotometre cihazı ile 650 nm dalga boyutunda okuma sonrası OD değerleri.

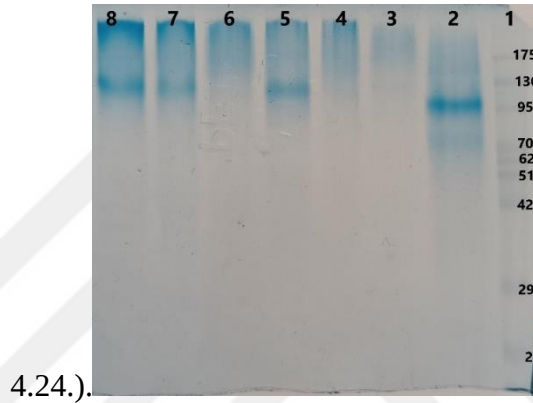
Tablo 4.4. Saflaştırma sonrası ürünlerin Bradford testi sonucuna göre protein miktarları.

	Diyaliz Sonrası	Örnek Sonrası	Yıkama Sonrası	Elüsyon
1A	10 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	0.5 mg/ml
2A	10 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml	1 mg/ml
1FGH	10 mg/ml	9 mg/ml	5 mg/ml	0.75 mg/ml

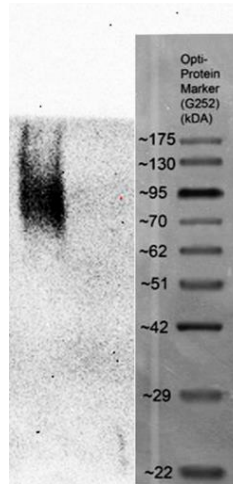
Şekil 4.21.'de görüldüğü üzere her aşama ayrı ayrı santrifüj tüpüne toplanılmıştır. Elüsyon aşaması tamamlandıktan sonra her aşamada tekrar Antikor-ELISA ile kontrol edilmiştir. Yalnızca Elüsyon aşamasında antikor pozitiflik görülmüştür (veri gösterilmemiştir). Elde edilen antikorlar, +4°C'de kullanılmak üzere saklanılmıştır.

4.6.5. Western Blot ile Monoklonal Antikor Tip Tayini

İzole edilen MDCK34388 CDV %10 SDS-PAGE'de yürütüldükten sonra PVDF membrana aktarılmıştır ve 1A mAb üzerine eklenilerek elde edilen mAb proteini SDS PAGE ve Western blot yöntemi ile araştırılmıştır (Şekil 4.23., Şekil



Şekil 4.23. SDS-PAGE görüntüsü. 1: Protein marker, 2: Diyaliz Sonrası 1A, 3: Yıkama sonrası, 4: Örnek sonrası, 5: 1A elüsyon, 6: 1A örnek sonrası, 7: 2A elüsyon, 8: 1FGH elüsyon.



Şekil 4.24. Kemilüminesans görüntüleme sonrası. Elde edilen 1A mAb yaklaşık F proteini (73kDa)'ye denk gelmektedir.

Uniprot veri tabanına göre yaklaşık 73 kDa olan F proteinine karşı mAb üretildiği görülmüştür.

4.7. Poliklonal Antikor Üretimi

4.7.1. Tavşan İmmünizasyonları

ERÜ DEKAM’ da Yeni Zellanda ırkı dişi tavşan inaktif CDV-MDCK34388 ile 3 defa immunize edilmiştir (Şekil 4.25.). İlk immunizasyon Freund’s Complete adjuvantı ile 1:1 oranında dilüe edilerek yapılmıştır. Daha sonraki iki immunizasyon Freund’s İncomplete adjuvantı ile 1:1 oranında dilüe edildikten sonra uygulanmıştır. Her uygulama 2 hafta ara ile yapılmıştır.

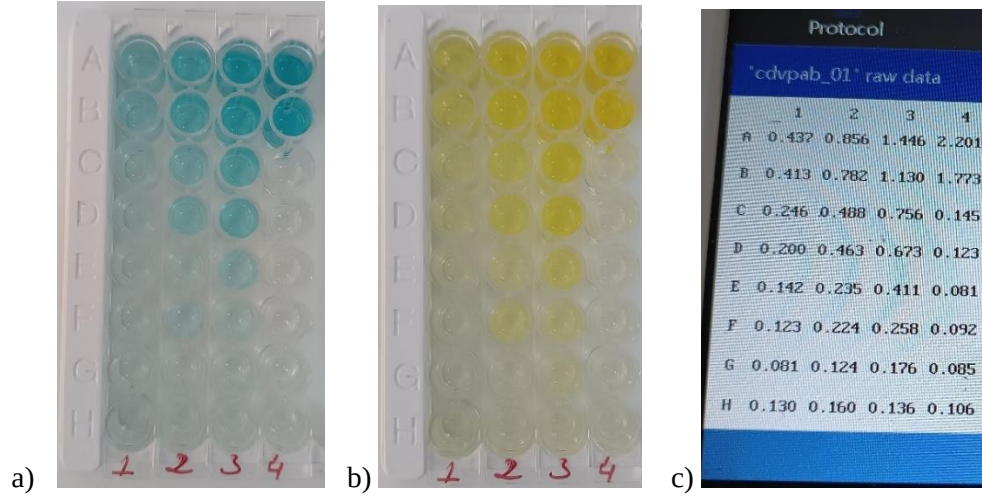


Şekil 4.25. Tavşan immunizasyonlarının kas içi uygulaması.

4.7.2. ELISA ile Tavşan Poliklonal Antikor Titresi Belirleme

Tavşanlardan alınan 0.gün (negatif), 1.immunizasyon, 2.immunizasyon ve 3.immunizasyondan 2 hafta sonraki serumlar Antikor-ELISA yöntemi ile taranmıştır.

ELISA sonucuna göre 1/8000’den başlayan pAb oranı 3. İmmünizasyon sonrası 1/128000 değerini aşmıştır (Şekil 4.26.).



Şekil 4.26. İmmunizasyon sonrası tavşan poliklonal antikor dilüsyonlarının ELISA sonucu. 1/2000’den başlayıp 1/128000’e kadar log2 tabanında sulandırılma yapılmıştır. a) Substrat eklenilip 15 dk karanlık inkübasyon sonrası, b) 2M sülfirik asit ile reaksiyon durdurma sonrası, c) 450 nm dalga boyutunda spektrofotometre cihazında OD değerleri. Sütunlar; 1: 1. İmmunizasyon, 2: 2.immunizasyon, 3: 3. İmmunizasyon, 4: A-B: 1/1000 3.immunizasyon, C-D: İmmunizasyon öncesi tavşan serumu, E-G: Bloklama solüsyonu.

ELISA sonucuna göre:

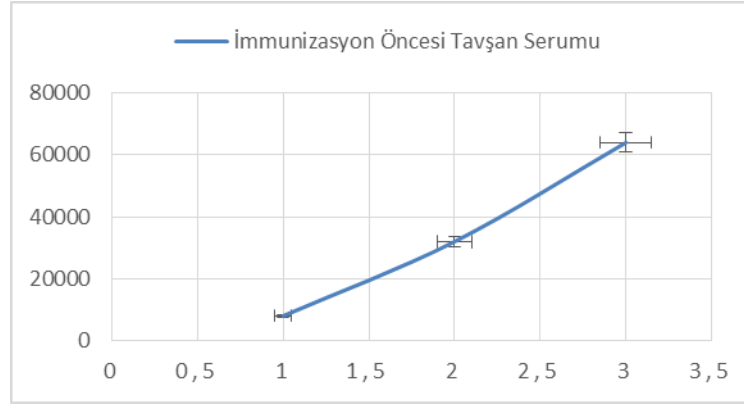
Cut-off:

Bloklama solüsyonu: $[(0.081 + 0.092 + 0.085 + 0.106) / 4] \times 2 = 0.182$

3.immunizasyon sonrası pAb 1/64000’ü aşmıştır (Şekil 4.27.).

Bu sonuçlara göre;

	İmmunize tavşan serumu antikor dilüsyonu.
1. immunizasyon	1/8000
2. immunizasyon	1/32000
3. immunizasyon	1/64000



Şekil 4.27. İmmünizasyon sonrası pAb dilüsyonları.

Daha sonra 1 hafta aralıklarla ile 1 ay boyunca kan alınarak serumlar toplanılıp birleştirilmiştir.

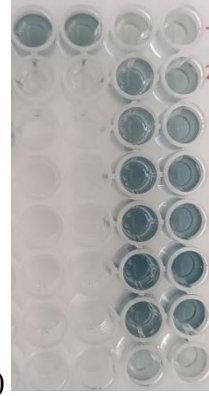
4.7.3. Poliklonal Antikor Saflaştırma

Tavşanlardan toplanılan serumlar amonyum sülfat ile konsantre edilmiştir. Daha sonra Elde edilen serumlar amonyum sülfat ile konsantre edildikten sonra Protein G kolunu ile saflaştırılmıştır. Daha sonra protein G kolonu ile saflaştırma yapılmıştır (Şekil 4.28.). Saflaştırmada elde edilen ürünlerin protein analizi yapılmıştır (Şekil 4.29.)



Şekil 4.28. Protein G kolonu ile pAb saflaştırma.

Elüsyon	Elüsyon	1 mg/ml	1 mg/ml
N-su	N-su	2.5 mg/ml	2.5 mg/ml
		5 mg/ml	5 mg/ml
		10 mg/ml	10 mg/ml
		15 mg/ml	15 mg/ml
		Diyaliz Sonrası	Diyaliz Sonrası
		Örnek Sonrası	Örnek Sonrası
		Yıkama Sonrası	Yıkama Sonrası



a)

9	10	11	12
0.401	0.394	0.170	0.168
0.097	0.100	0.394	0.313
0.041	0.041	0.407	0.396
0.041	0.041	0.554	0.499
0.041	0.041	0.599	0.511
0.040	0.040	0.687	0.635
0.040	0.040	0.573	0.525
0.041	0.041	0.198	0.172

c)

b)

Şekil 4.29. pAb saflaştırma sonrası protein miktar analizi a) Örnek yükleme sırası, b) Biorad protein ölçüm kiti solüsyonları ekleme sonrası, c) OD değerleri.

	Diyaliz Sonrası	Örnek Sonrası	Yıkama Sonrası	Elüsyon
pAb	>15 mg/ml	15 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml

Bu sonuçlara göre saflaştırma sonrası pAb değeri yaklaşık 5 mg/ml olarak ölçülmüştür.

4.8. Konjugat Optimizasyonu ve Antijen ELISA Geliştirilmesi

Yöntemde bildirildiği gibi 1AHRP konjugatı hazırlandıktan sonra Antijen ELISA testi geliştirmek için Sandviç ELISA yöntemi geliştirilmiştir.

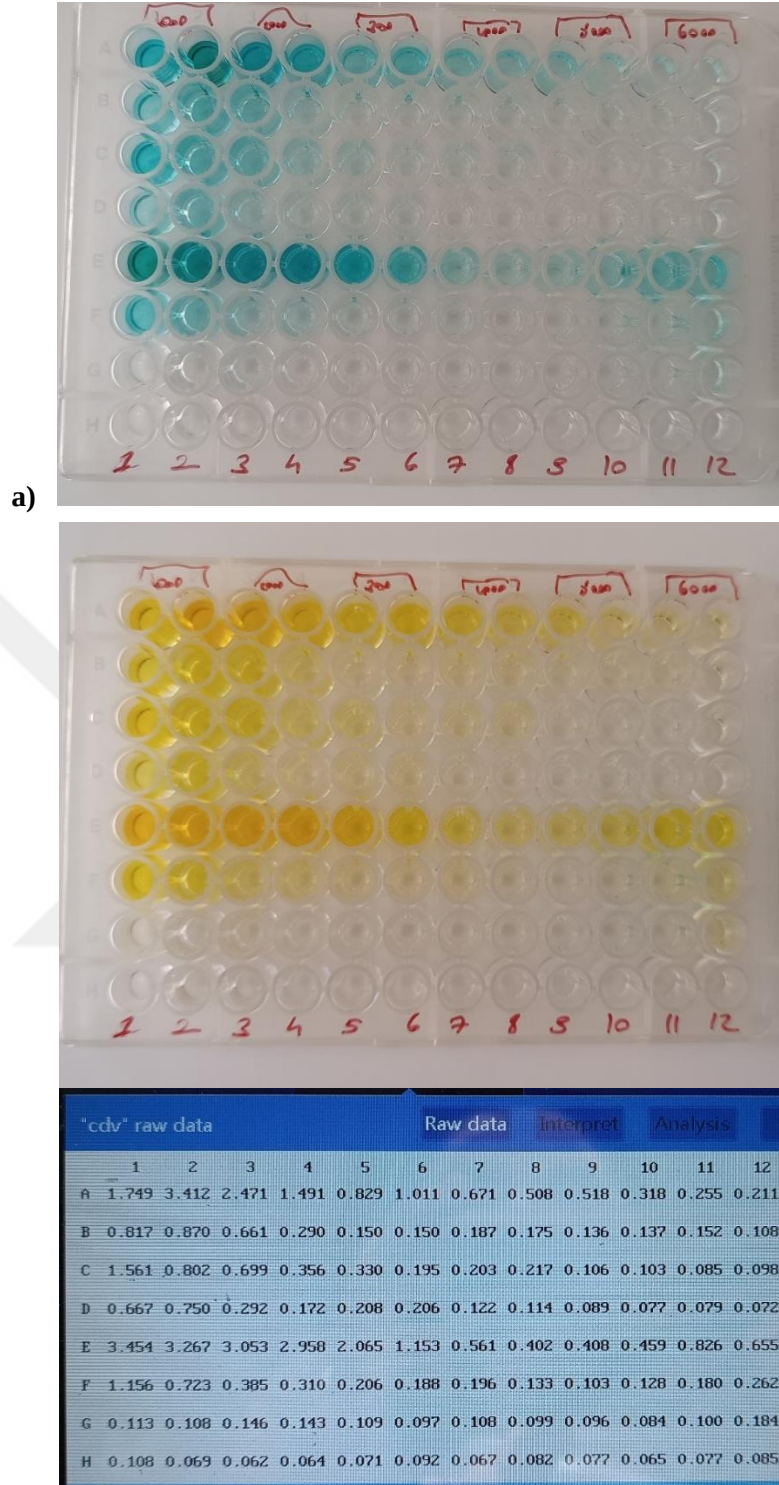
Bunun için;

Saflaştırılmamış pAb 1/1000 (1. ve 2. sütun), 1/2000 (3. ve 4. sütun), 1/3000 (5. ve 6. sütun), 1/4000 (7. ve 8. sütun), 1/5000 (9. ve 10. sütun) ve 1/6000 (11. ve 12. sütun) oranlarında karbonat/bikarbonat buffer içerisinde sulandırılmıştır.

1AHRP konjugatı 1/50 (A ve E satırı), 1/100 (B ve D satırı), 1/200 (C ve F satırı) ve 1/400 (G ve H satırı) oranlarında bloklama solüsyonu içinde sulandırılmıştır.

A-D satırlarına pozitif kontrol olarak CDV (MDCK34388), E-H satırlarına ise negatif kontrol olarak bloklama solüsyonu eklenilmiştir (Şekil 4.30.). ELISA sonucunda konjugat ve pAb'a göre cut-off değerleri Tablo 4.5'te verilmiştir.





Şekil 4.30. Antijen ELISA testi optimizasyonu. a) 15 dk karanlık saha inkübasyon sonrası, b) 2M sülfirik asit ile durdurma sonrası, c) 450nm dalga boyutunda okuma sonrası OD değerleri.

Tablo 4.5. Antijen ELISA testi optimizasyonu sonucu OD değerlerine göre cut-off değerleri.

pAb Konjugat	1/1000	1/2000	1/3000	1/4000	1/5000	1/6000
1/50	6.727	6.011	3.218	0.963	0.867	1.481
1/100	1.879	0.695	0.394	0.329	0.231	0.442
1/200	0.221	0.289	0.206	0.207	0.18	0.284
1/400	0.177	0.126	0.163	0.149	0.142	0.162

Bu sonuçlara göre;

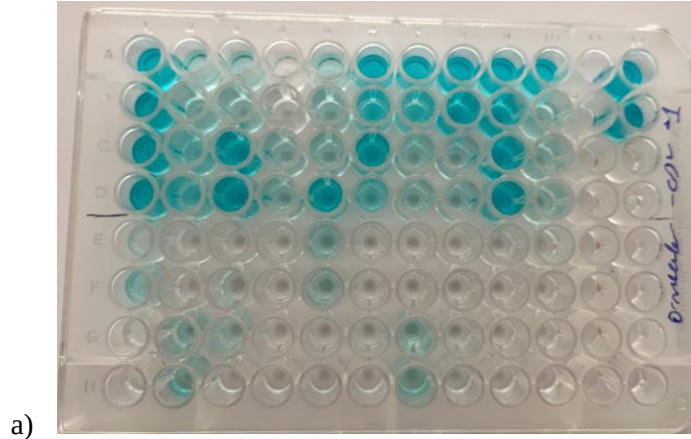
1/50 ve 1/100 konjugat oranı tüm pAb oranlarında negatif kuyucuklarda arka plan (background) olduğu görülmüştür ve OD değerleri pozitiflerden yüksek çıkmıştır. Bu yüzden bu oranlar testte kullanılmamıştır.

1/200 ve 1/400 oranında konjugat, pAb 1/1000, 1/2000 ve 1/3000 oranlarında cut-off değerinden fazla çıktığı için pozitif olarak kabul edilmiştir.

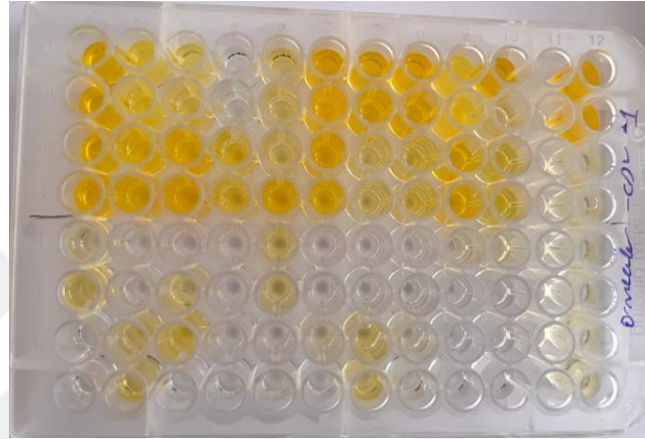
OD değerleri bakımından karşılaştırıldığında pozitif örnekte 1/200 oranı 1/400'den daha fazla olduğu için örneklerin taranmasında 1/200 ün kullanımının uygun olduğuna karar verilmiştir.

4.9. Antijen ELISA ile Örneklerin Taranması

RT-PCR ile pozitif olarak belirlenen 29 adet saha örneği (Tablo 4.1.) ve 11 adet farklı hücre kültürü izolatu olmak üzere toplam 40 pozitif örnek kullanılmıştır. Laboratuvar farklı zamanlardan gelen RT-PCR ile negatiflikleri belirlenen 40 farklı örnek negatif olarak kullanılmıştır. Toplam 80 farklı örnek Antijen-ELISA ile taranılmıştır. Her örnek alt alta gelecek 2 kopya olarak eklenilmiştir (Şekil 4.31.a., 4.31.b.). ELISA pleytlerinin Cut-off değerleri ayrı ayrı hesaplanılmıştır.



a)



b)

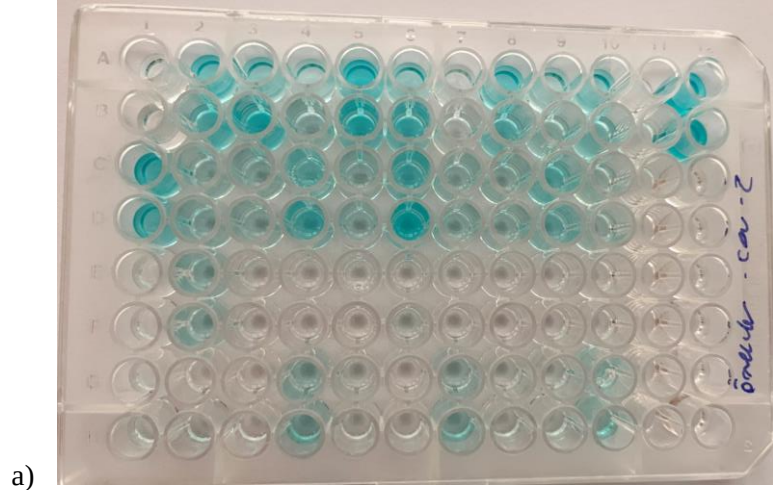
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.063	1.254	0.788	0.055	0.453	2.921	2.229	2.719	1.941	2.762	0.063	3.639
B	2.592	1.284	0.859	0.059	0.480	2.958	2.344	2.648	2.391	0.461	0.059	3.318
C	1.281	1.731	2.601	0.994	0.444	2.776	0.452	0.725	2.001	1.105	0.064	0.473
D	2.719	2.164	2.918	0.989	2.647	1.745	0.529	0.773	2.011	1.161	0.062	0.665
E	0.256	0.070	0.072	0.073	0.461	0.057	0.063	0.057	0.214	0.206	0.056	0.324
F	0.621	0.068	0.332	0.060	0.416	0.062	0.087	0.117	0.054	0.061	0.059	0.308
G	0.068	0.493	0.916	0.080	0.085	0.205	0.545	0.199	0.056	0.057	0.054	0.368
H	0.069	0.516	0.059	0.063	0.092	0.072	0.530	0.145	0.060	0.057	0.064	0.407

c)

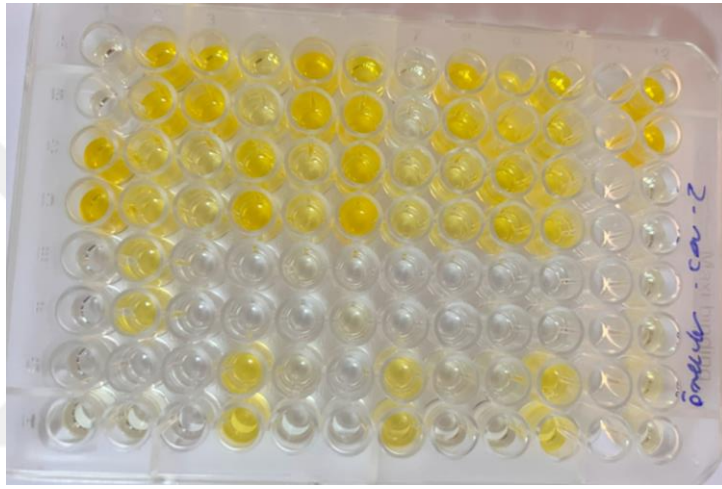
Şekil 4.31.a. Örneklerin geliştirilen Antijen ELISA yöntemi ile taranması, 1.pleyt. **a)** 15 dk karanlık saha inkübasyon sonrası, **b)** 2M sülfirik asit eklenme sonrası, **c)** 450 nm dalga boyutunda okuma sonrası.

ELISA sonrası elde edilen OD' lerle Cut-off değerleri hesaplanılmıştır.

- NK HK (FBS+DMEM): 1.13
- Bloklama Solüsyonu: 0.703



a)



b)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.158	1.490	1.029	0.057	0.892	2.863	2.192	2.688	1.859	2.737	0.063	3.529
B	0.463	1.486	1.170	0.059	1.067	2.927	2.307	2.615	2.409	0.887	0.056	3.227
C	1.253	1.710	2.568	1.010	0.587	2.733	1.038	0.886	1.978	1.064	0.065	0.432
D	2.674	2.136	2.869	0.952	2.606	1.723	1.139	0.933	1.989	1.084	0.063	0.793
E	0.165	0.071	0.075	0.075	0.958	0.058	0.067	0.060	0.213	0.204	0.057	0.321
F	0.206	0.068	0.041	0.060	1.405	0.065	0.091	0.117	0.055	0.061	0.060	0.324
G	0.070	0.954	0.040	1.198	0.092	0.115	1.614	0.199	0.058	0.057	0.055	0.311
H	0.070	0.941	0.059	1.191	0.094	0.072	1.424	0.145	0.062	0.059	0.062	0.367

c)

Şekil 4.31.b. Örneklerin geliştirilen Antijen ELISA yöntemi ile taranması, 2.pleyt. **a)** 15 dk karanlık saha inkübasyon sonrası, **b)** 2M sülfirik asit eklenme sonrası, **c)** 450 nm dalga boyutunda okuma sonrası.

ELISA sonrası elde edilen OD' lerle Cut-off değerleri hesaplanılmıştır.

- NK HK (FBS+DMEM): 1.22
- Bloklama Solüsyonu: 0.662

Vasat negatif kontrol olarak eklenilip herhangi bir arka plan oluşma durumu karşılaştırmak için yapılmıştır. Örneklerin pozitiflikleri veya negatifleri bloklama solüsyonu cut-off değerine göre hesaplanılmıştır.

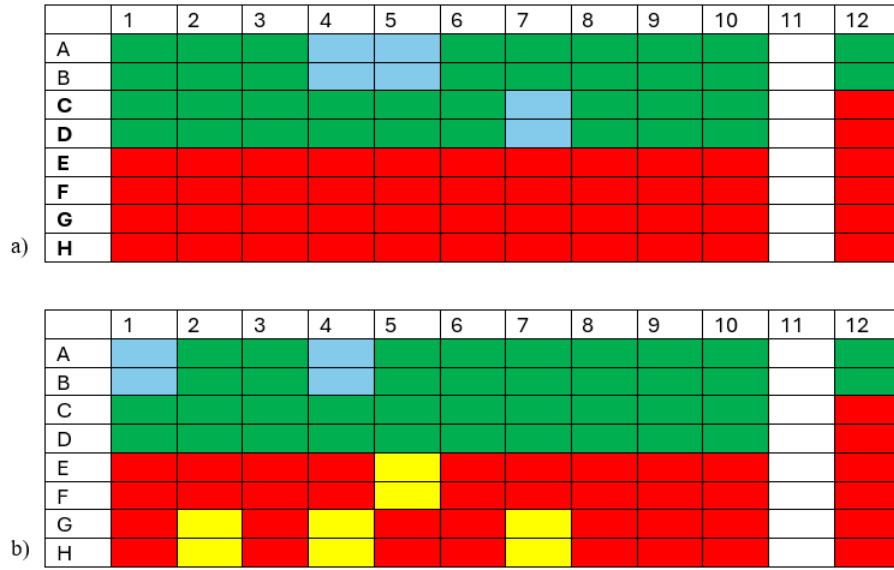
4.10. Antijen ELISA' nın İstatistiksel Sonuçları

RT-PCR ile elde edilen toplam 40 pozitif, 40 negatif örnek bulunmaktadır. Geliştirilen Antijen ELISA (Sandviç ELISA) testinde 37 pozitif 13 negatif olarak sonuç bulunmuştur.

2 farklı test yönteminde elde edilen sonuçlar ile hayvanların genel klinik bulgularının yüzdeleri hesaplanılmıştır.

Ayrıca Graphpad prism 10 programı ile Sensitivite (Duyarlılık), spesifite (özgünlük), Pozitif Olasılık Oranı, Negatif Olasılık Oranı, Pozitif Tahmini değer ve Negatif Tahmini Değer hesaplamaları yapılmıştır (Tablo 4.6).

Aşağıdaki şekilde çıkan örneklerin sonuçları belirlenilmiştir (Şekil 4.32.).



Şekil 4.32. ELISA sonuçlarına göre pozitif ve negatif örnekler. a) 1.pleyt, b) 2.pleyt. Kırmızı renkli kuyucuklar pozitif, mavi renkli kuyucuklar negatif örnekleri temsil etmektedir.

Tablo 4.6. RT-PCR ve Geliştirilen Antijen ELISA sonuçlarının karşılaştırılması.

		RT-PCR	SANDVIÇ ELISA	Güven Aralığı Anlamı	Toplam
Yeşil		Pozitif	Pozitif	Gerçek pozitif (a)	36
Mavi		Pozitif	Negatif	Yanlış Negatif (b)	5
Sarı		Negatif	Pozitif	Yanlış Pozitif (c)	4
Kırmızı		Negatif	Negatif	Gerçek Negatiflik (d)	35
Toplam					80

Köpeklerden elde edilen örneklerin RT-PCR ı sonucunda toplam 29’u pozitif ve 11’i negatif bulunurken, geliştirilen Antijen ELISA (Sandviç ELISA) testinde 28’i pozitif 12’si negatif olarak bulunmuştur (Tablo 4.1). Ancak RT-PCR’da pozitif çıkan 4 örnek yanlış negatif, 5 örnek yanlış pozitif örnek bulunmuştur. Bu veriler GraphPad Prism 10 programı üzerinde kullanılarak Tablo 9.5’teki istatistiksel sonuçlar elde edilmiştir.

Geliştirilen antijen ELISA testinin sensitivitesi %90, spesifitesi %87.50 olarak belirlenilmiştir. Ayrıca yapılan istatistiksel analiz sonucu pozitif tahmin değeri %87.80, negatif tahmin değeri ise %89.74 olarak belirlenilmiştir.

Fisher’s Exact test yöntemine göre ise p değeri anlamlı ($p < 0.05$) bulunmuştur (Tablo 4.7.).

Tablo 4.7. Graphpad Prism 10 programında RT-PCR ve geliştirilen Antijen ELISA testine göre istatistiksel sonuçlar.

İstatistik parametre	Değer	95% CI
Sensitivite	0.9000	0.7695 – 0.9604
Spesifisite	0.8750	0.7389 - 0.9454
Pozitif Tahmin Değeri	0.8780	0.7446 – 0.9468
Negatif tahmin değeri	0.8974	0.7642 – 0.9594
Benzerlik oranı	7.200	0.7695 - 0.9604
p değeri	<0.0001	

5. TARTIŞMA

Köpek gençlik hastalığı tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde yaygın görülen viral bir hastalıktır. Hastalık hem evcil köpekler hem de yaban hayvanlarında oldukça tehlikeli ve ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. *Paramyxoviridae* ailesinde, *Morbillivirus* genusunda yer alan CDV, *Canidae* ailesi ile birlikte *Mustelidae*, *Ursidae*, *Ailuridae* gibi birçok aileyi de etkilemektedir. Kızamık, Küçük ruminant vebası ve Sığır vebası gibi önemli viral hastalıklar ile birlikte aynı genusta yer almaktadır. Ayrıca 2012 yılında ortaya çıkan *Kedi morbillivirus*'u ile birlikte çoğu insan ve hayvan türlerini etkileyebildiği, türler arası geçiş yapabildiği de tekrar ortaya çıkarmıştır.

Birçok viral hastalık gibi KGH' nin de spesifik tedavisi olmadığı için hızlı ve erken teşhis ile birlikte sekonder enfeksiyonlara karşı immun sistemi güçlendirmek tedavide başarıyı arttırabilmektedir. Özellikle CDV' nin merkezi sinir sistemine ulaşarak sinirsel bulgular ortaya çıkmadan erken teşhis ile birlikte tedaviye başlanması köpeklerin tedavi edilme şansının yanı sıra yaşlı köpek ensefalitin engellenmesinde önemli olabilmektedir. (Blancou, 2004; Martella ve ark., 2008; A. Beineke ve ark., 2009).

Ülkemizde CDV tespitine yönelik bazı çalışmalar bulunmaktadır. Farklı bölgelerden alınan örnekler genellikle RT-PCR taramaları ile CDV pozitiflikleri belirlenilmiştir. 1933-1958 yılları arası Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne gelen toplam 617 köpeğe yapılan otopsi sonucu 159 (%25) köpekte Gençlik Hastalığını tespit etmiştir (Ertürk, 1960). Çalışkan ve Burgu; 2007 yılında yaptıkları RT-PCR çalışmasında 157 köpeğin 51'inde (%32.4) CDV pozitiflik tespit etmişlerdir (Çalışkan ve Burgu, 2007). Can Sahna ve ark. başka bir çalışmada klinik olarak ishal tablosu gösteren 34 yavru köpekte viral etken olarak CDV nin RT-PCR ile varlığı %44.1 olarak tespit edilmiştir (Can Sahna ve ark., 2008). Saltık ve Kale yaptıkları çalışmada 50 adet sokak köpeğinde Real Time PCR 31 köpekte (%62) pozitiflik gömüşlerdir (Saltık ve Kale, 2021).

Hasircioğlu ve Aslım 2021 yılında yaptıkları real-time RT-PCR çalışmasında 65 köpekten 33'ünün (%50.76) CDV pozitif olduğunu belirlemişlerdir (Hasircioğlu ve Aslım, 2021). Ülkemizde yapılan CDV çalışmalarında CDV pozitiflik oranı %25-%63 arası değişmektedir. Bizim çalışmamızda ise klinik şüpheli örneklerde RT-PCR sonucu %72.5 (n=40) pozitif örnek belirlenilmiştir. Ancak toplanılan örnekler sınırlı bölgelerden olması nedeniyle, ülkemizdeki CDV prevalansını belirlemek için daha yüksek sayıda örneklem ve farklı bölgelerden örnekler toplanılarak çalışma yapılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

1950'lerde HeLa hücre kültürü keşfinden itibaren birçok virusun izolasyon çalışması, geliştirilen primer ve/veya ölümsüz hücre hatları ile yapılmıştır. Paramyxoviruslar hücre kültüründe çoğalırken sinsityum, vakuol oluşumu ve yuvarlaklaşma benzeri CPE'ler gösterir. Paramyxovirusların spesifik CPE'si olan sinsityumlar SLAM reseptörü ifade edilen hücre hatlarında görülmektedir (Seki ve ark., 2003; Lan ve ark., 2005; Woma ve Van Vuuren, 2009). CDV özelinde tüm Morbillivirusların hücre kültürüne ekimlerinde spesifik CPE görüntüsü sinsityumların görülme ve viral titrenin artması için SLAM reseptörü ifade eden rekombinant hücre hatları kullanılmaktadır. VeroSLAM veya MDCKSLAM gibi hücre hatları kullanılarak sinsityum benzeri CPE oluşturduğu birçok çalışmada belirtilmiştir. Bizim çalışmamız kapsamında elde edilen örnekler SLAM reseptörü ifade etmeyen MDCK hücre kültüründe 7. günden itibaren yuvarlaklaşma ve vakuol oluşumu şeklinde CPE'ler görülürken sinsityum benzeri CPE'ler görülmemiştir. Kör pasajlama sonucunda 15 farklı örnekte hücre yuvarlaklaşması ve vakuol benzeri CPE'ler görülmüştür. Lednicky ve ark. yaptıkları çalışma rakunlardan elde ettikleri CDV'leri MDCK, Vero ve Mv 1 LU (Amerikan Mink kökenli hücre hattı) hücrelerine ekim yaptıklarında MDCK hücresinde ilk virus üremesini gördüklerini ancak Vero hücresinde daha belirgin CPE'ler oluştuğunu gördüklerini belirtmişlerdir. Mv 1 Lu hücre hattında ise virus üremesi daha geç oluştuğunu ve CPE oluşmadan virusun ürediğini tespit etmişlerdir (Lednicky ve ark., 2004). Benzer şekilde Saltık ve Kale (2021) MDCK hücre hattında sinsityum içermeyen CPE'ler görmüşlerdir ve köpeklerden ilk izolasyon için MDCK hücre hatlarının kullanımının uygun olacağını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamız ve bahsedilen çalışmalar sonucunda; SLAM reseptörü ifade edilen hücrelerde daha yüksek miktarda CDV üretilmesi, CPE'lerin daha belirgin ve spesifik olması virus izolasyonu açısından önem arz ettiği düşünülmüştür. SLAM

reseptörü ifade etmeyen hücre hatlarında virusun üretilmediği, birçok çalışmayla birlikte bu çalışmada da gösterilmiştir. Ancak CPE'nin geç oluşması, spesifik sınırsız CPE'lerin oluşmaması izolasyon koşullarını sınırlayabilmektedir. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak virusa özgü reseptörleri ifade eden hücre hatlarının varlığı veya köpeklerden elde edilen primer hücre kültürü ile izolasyon çalışmalarının bu sınırlandırmayı ortadan kaldırabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada CPE pozitif izolatlardan MDCK34388 izolatı hem hizmet alımıyla Sanger sekansı yapılmış hem de monoklonal-poliklonal antikor üretiminde kullanılmıştır. Sanger sekans analizi sonrası filogenetik ağaçlandırma MEGA 11 programı ile Maximum Likelihood yöntemi ve Tamura 3 parametrelili model kullanılarak oluşturulmuştur. Filogenetik analiz sonucuna göre izolat Asya 1 suşunda bulunmuştur. Türkiye'de daha önce yapılan sekans analizlerinde H genine göre Arktik benzeri (Koç ve ark., 2021) ve Avrupa-Güney Amerika 1 (Saltık ve Atılı, 2023) suşları bulunmuştur. F genine göre ise Saltık ve Atılı yine Avrupa-Güney Amerika 1 suşlarını bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda F geni dizilimine göre Asya 1 suşunun bildirimi ilk olma özelliğini taşımaktadır.

Virus izolasyon çalışmalarını takiben hücre kültürlerinden virusların konsantre edilmesi ve pürifiye edilmesi çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmada MDCK hücre kültüründe kör pasajlama sırasında 1.pasajda en belirgin CPE gösteren ve PCR güçlü pozitif çıkan 34388 numaralı örnek filogenetik analiz ve monoklonal-poliklonal antikor üretimi için kullanılmıştır. MDCK34388 örneği Berber (2014)' deki çalışmasındaki PEG 8000 (%50 w/v) ile konsantre edilmiştir. Ancak Azkur ve ark. Scmallenberg virusu için yaptıkları çalışmada PEG 8000 %30 (w/v) oranının %50 (w/v) oranı ile karşılaştırdıklarında ELISA pleyt tabanına bağlanılan antijen için daha iyi sonuç verdiğini görmüşlerdir (Azkur ve ark., 2020).

Çalışmamızda Bradford (1976) yöntemine göre protein miktarı ölçülmüştür ve 0.25 mg/ml bulunmuştur. Bradford metodu toplam protein miktarını ölçtüğü için elde edilen miktarın tamamının virus olmayabileceği düşünülmektedir. Genellikle daha ileri tekniklerle (ultra santrifuj, süroz gradient vb.) saf virus elde edilmesi tercih edilmektedir. Bu aşamada virion miktarında bir sınırlama getirmemesi için mAb

amacıyla farelere 50 µg/immunizasyon, tavşanlar için 100 µg/immunizasyon tercih edilmiştir (Greenfield, 2020)

Birçok virus gibi Paramyxovirus'lar da UV ışınlarından direkt etkilenmektedir (MacLachlan ve ark., 2016). Bu çalışmada konsantrasyon sonrası örnekler Heaney ve ark. (2002) çalışmasındaki gibi nükleik asit inaktivasyonu için UV altında 10 dk bekletildikten sonra 3., 5., 7., 9. ve 12. günlerde ayrı ayrı kaldırılıp dondur çöz yapılarak RT-PCR yapılmıştır. 12. güne kadar herhangi bir CPE görülmemiştir ve RT-PCR 'da negatif görülmüştür.

Köhler ve Milstein'in monoklonal antikoru keşfetmesinden (1975) sonra birçok antijene karşı mAb üretilmiştir. Hibridoma teknolojisi ile birlikte hem teşhis hem de tedaviye yönelik çalışmalarda mAb kullanımı artmıştır (Buss ve ark., 2012). mAb'lar genelde teşhis yöntemleri için kullanılmaktayken 1986 da ilk defa FDA onaylı kanser tedavisi için mAb kullanılmıştır (murinomab) (Rodgers ve Chou, 2016). Daha sonra kanser, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar gibi farklı hastalıklarda terapötik amaçlı mAb'lar geliştirilmiştir (Buss ve ark., 2012; Bussel ve ark., 2007; Ecker ve ark., 2015) Bu çalışma kapsamında mAb üretmek için inaktive edilen CDV izolatu ile 8 haftalık dışı BALB/c fareler immunize edilmiştir. İkişer hafta ara ile immunize edilen farelerden her immunizasyon öncesi serum alınarak antikor titresi bakılmıştır. Aynı immunizasyon oranlarında 2 farklı grup yapılmış ancak ilk gruptaki farelerde immunizasyon ve füzyon aşamalarında bazı problemler çıkmıştır ve bu nedenle ilk grup çalışmadan çıkarılmıştır. Sırası ile bu sorunlar belirlenilerek ikinci grup için çalışma yapılmıştır. İlk gruptaki farelerden; bir numaralı farede yeterli immun yanıt oluşmamış ve bunun nedeni olarak immun tolerans gelişmesi düşünülmüştür. Aynı doğum tarihli diğer farelerde ise immun tolerans görülmeyip bireysel olduğu gözlenmiştir. İki numaralı fare de füzyon aşaması gerçekleşmemiş olup füzyon ajanı olarak PEG 1500 yerine PEG 4000 seçilerek optimize edilmiştir. Üç numaralı fare de ise yeterli klonlar oluşmuş ancak antikor yanıtları bir sonraki pasajda negatife dönmüştür. mAb üretimi amacıyla 2. gruptaki farelerde 3. immunizasyon sonrası 2 numaralı fare de 1/64000'den fazla antikor dilüsyonu görüldüğü için farklı çalışmalarda önerildiği gibi (Chowdhury ve ark., 2024; Yücel ve Çirakoğlu, 1999) PEG 4000 (%50 w/v) ile füzyona girilmiştir. Bu çalışma da fare immunizasyonları sonucunda en az 1/30000 üzeri antikor dilüsyon yeterli oranda olup füzyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği düşünülmektedir. PEG kimyasal füzyon

metodu olup bunun yerine elektro füzyon yöntemi de kullanılabilir (Lane, 1985). Song ve ark yaptıkları çalışmada elektro füzyonun PEG 1500 ile karşılaştırıldığında 4 kat daha fazla klon oluşturduğunu göstermişlerdir (Song ve ark., 2022).

F0 miyeloma hücreleri füzyona girmeden yaklaşık 24 saat öncesinde pasajlama yapılmıştır. Çünkü, Hurrell miyeloma hücrelerinde G2+M fazının füzyon işleminde önemli olduğunu belirtmiştir (Hurrell, 1982). Logaritmik olarak çoğalan miyeloma hücrelerinin 24 saat öncesinden pasajlanması füzyon gerçekleşme olasılığını arttırdığı görülmüştür. Ayrıca miyelomaların füzyon gününe kadar 8-Azaguanine içeren vasat ortamında büyümesi sonrası füzyon için eklenen HAT ortamına uygun hale getirilmesini sağlamıştır (Ganguly ve Wakchaure, 2016).

Füzyon işlemi için gerekli olan splenosit ve F0 miyeloma hücreleri elde edildikten sonra 5/1- splenosit/F0 miyeloma oranında 108×10^6 splenosit/ 21×10^6 F0 miyeloma füzyon işlemi gerçekleştirilmiştir. mAb üretim çalışmalarında füzyon için bu hücrelerin oranı 3/1 ile 10/1 arasında değişmektedir (Yucel, 2010). Bizim çalışmamızda 1/64000 oranında antikor dilüsyonu ve 5/1 oranında füzyon işlemi başarı ile gerçekleşmiş olup 2. günden itibaren klonlar oluşmaya başlamış ve 6. günden sonra belirgin şekilde füzyona giren klonlar büyürken diğer hücreler beklenildiği gibi ölmüştür. 11 adet 96 kuyucuklu hücre kültür pleytinde 1000'den fazla klon günlük olarak ters mikroskop altında tarama yapılmıştır. Toplam 129 klon oluşmuş ve klonlar antikor-ELISA ile antikor yönünden tarama yapılmıştır. 129 klondan antikor pozitif olan (cut-off değerinin üzerinde) 62 klon (%48.06) pozitif görülmüş ve 24 kuyucuklu hücre kültür pleytinde çoğaltılmıştır. Bu klonlar tekrar antikor yönünden tarandığında yalnızca 4 farklı (%16) klon (2F6, 1G10, 3D8, 1B4) pozitif olarak görülmüştür. Büyüyen klonlar seri dilüsyon ile farklı kuyucuklara bölünmüştür. Klonların 3 gün inkübasyonu sonrası tekrar antikor ELISA tarama sonrası 2F6 ve 3D8 negatif olarak görülürken 1G10 tüm alt klonlarında (16 adet) pozitiflik görülmüştür. Bunun yanı sıra 3B4 klonundan yalnızca 2B ve 2C alt klonları pozitif olarak kaydedilmiştir. CDV antikor pozitifliklerini devam ettiren 1G10 alt klonları ve 3B4-2B ve 3B4-2C alt klonları 25 cm^2 hücre kültür flasklarında çoğaltılıp tekrar ELISA ile kontrol edildiğinde 3B4 alt klonları da antikor üretmeyi bıraktıkları görülmüştür. 1G10 alt klonları pozitiflikleri korumaya devam etmişlerdir ve dondurulup -80°C 'de depolanılmıştır. Önce antikor pozitif olup daha sonra negatife dönen klonların stabilitesini sağlamamasının birçok nedeni olabilmektedir. Bunun en önemli nedeni;

fare dalak hücresi ve miyeloma hücresi gibi farklı hücrelerin birleştirilmesiyle oluşan hibridomaların kromozom istikrarsızlığından dolayı antikor salgılamayı bırakıp eski hallerine dönebilmesi olduğu bildirilmiştir (Parray ve ark., 2020). Ayrıca füzyon yönteminin de etki olabildiğini Wu ve ark. yaptıkları çalışmada göstermişlerdir. Füzyon için kimyasal yöntem (PEG) yerine elektro füzyon kullanılmasının hibridomaların daha stabil kalmasını sağlayacağını belirtmişlerdir (Wu ve ark., 2022). Bu nedenlerden dolayı çalışmada elde edilen klonlardaki pozitiflik her pasajlamada tekrar antikor yönünden test edilmiştir.

Monoklonal antikor üretmek için kullanılan Köhler ve Milstein'in klasik hibridoma yönteminin yanısıra farklı yöntemlerle rekombinant monoklonal antikorlar da üretilmektedir. Ancak Bradbury ve ark. Rekombinant monoklonal antikor çalışmasında rastgele taradıkları 185 hibridomadan 126 (%68.1)sının klasik yapıda antikor üretirken, 59 hibridomanın (%31.9) ise bir veya daha fazla ağır veya hafif zincir içeren antikor ürettiğini keşfetmişlerdir. Yaptıkları çalışmada ek zincirlerin, antikorların immunojenik özelliklerini bozduklarını görmüşlerdir (Bradbury ve ark., 2018). Bu bağlamda bu çalışma da monoklonal antikor üretmek için ağır ve hafif zincirlerinin rekombinant olarak değil klasik hibridoma teknoloji kullanılarak üretilmesi hedeflenilmiştir.

CDV'ye karşı bazı araştırmacılar da mAb geliştirmişlerdir. Örvell ve ark. yaptıkları çalışmada H, F, P ve N proteinlerine karşı mAb'lar üretip bunları karşılaştırmışlardır (Örvell ve ark., 1985). Ancak hücre klonlarını immunizasyon sonrası farelerin intraperitoneal asites sıvısından direkt elde etmişlerdir. Bi ve ark. H proteinine karşı mAb üretmişlerdir ve elde ettikleri mAb'ların nötralizan etkilerini araştırmışlar, herhangi bir test geliştirilmesinde kullanmamışlardır (Bi ve ark., 2015). Liu ve ark. yaptıkları çalışmada CDV'ye karşı Synder Hill suşuna karşı mAb üretmişler ancak bu mAb'ların H proteinine karşı olduğunu tanımlamışlar ve ELISA test geliştirilmesinde kullanmamışlar sadece nötralizan etkisine bakmışlardır (Liu ve ark., 2017). Zhang ve ark. CDV rekombinant F proteinine karşı mAb üretip sandviç ELISA testi geliştirmişlerdir (Zhang ve ark., 2020). Bu tez çalışmasında ise F proteinine karşı mAb üretilmiş olup daha sonra mAb HRP enzimi ile işaretlenerek antijen ELISA testinde tespit edici antikor olarak kullanılmıştır. Bu amaçla 1 mg/ml oranında mAb 1 mg HRP ile işaretlenmiştir. Geliştirilen Antijen ELISA testinde konjugat olarak bu işaretli

1AHRP mAb kullanılmıştır. Elde edilen mAb Western blot yöntemi ile araştırılmış ve yaklaşık 73 kDa değerinde olan füzyon proteinine spesifik monoklonal antikor olduğu tespit edilmiştir. F proteinine karşı mAb geliştirilmesi, virusun hücrelere giriş mekanizmasındaki kritik rolü nedeniyle CDV nin tanısal etkinliğinde önemli olduğu düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında hedeflenen antijen ELISA için sandviç ELISA yöntemi tercih edilmiştir. Çünkü sandviç ELISA da iki farklı antikor (yakalayıcı ve tespit edici) kullanıldığı için hastalık tespit oranı artmaktadır. Poliklonal antikorun yakalayıcı antikor (capture) olarak ELISA'a pleytinin tabanına bağlanmasının tercih edilmesi üzerlerindeki epitopik bölgelerin farklı ve çeşitli olması sayesinde antijeni yakalama ihtimalini arttırmasıdır. Tespit edici antikor olarak mAb kullanılması ise pAb' a bağlanmış olan antijene spesifikliğı sayesinde testin özgüllüğünü arttırmaktadır (Leenaars ve ark., 1999). Cui ve ark. yaptıkları çalışmada hedef antijenin düşük konsantrasyonda olduğu veya epitop sınırlandırması olduğu durumlarda sandviç ELISA için pAb'ın monoklonal antikorlardan daha faydalı olabileceğı gösterilmiştir (Cui ve ark., 2015) .

Bu çalışmada Greenfield' in (2020) belirttiğı şekilde adjuvanlar kullanılarak Yeni Zelanda ırkı tavşana immunizasyonlar yapılmış ve her immunizasyon öncesi serum alınmıştır. 3. immunizasyonları tamamlandıktan sonra ELISA ile antikor titresi ölçülmüştür. 3. immunizasyon sonrası pAb dilüsyonu 1/64000'den fazla çıkmıştır. Daha sonra 1 ay boyunca her hafta tekrar serum alınarak serumlar birleştirilmiş ve Protein G kolonu ile saflaştırma işlemi yapılmıştır.

Antijen ELISA testinin geliştirilmesi için pAb ve işaretli 1AHRP mAb optimize edilmiştir. Optimizasyon sonucu 1/1000, 1/2000 ve 1/3000 oranlarında pAb; 1/200 ve 1/400 oranlarında konjugat sonuç vermiştir. Zhang ve ark. (2020) geliştirdikleri sandviç ELISA testinde benzer şekilde 3 farklı mAb' ı 1/100, 1/200 ve 1/400 oranlarında bulmuşlardır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada yakalayıcı ve tespit edici antikor olarak mAb kullanmalarına rağmen konjugat oranları bu çalışmada gerçekleştirilen antijen ELISA ile benzer sonuçlar çıkmıştır. Bizim çalışmamızda komple virion kullanılıp pAb ve mAb üretilmiş olmasından dolayı CDV için ilk çalışma olma özelliğı taşımaktadır.

Ayrıca optimizasyon sırasında bloklama solüsyonu olarak BSA kullanılırken sonuçları etkilendiği, örneklerde sürekli arka plan bırakıp konjugatın bağlanmasını engellediği görülmüştür. Bir çalışmada BSA kalitesinin düşük olmasının sonuçları etkilediği görülmüştür (Ma ve ark., 2020). Bu nedenle bu çalışmada yağsız süt tozu bloklama için kullanılmıştır.

Geliştirilen test ile RT-PCR sonuçları karşılaştırılmıştır. In-house antijen ELISA testinde 40 (n=80) pozitif çıkmıştır. Pozitif örneklerin 4 tanesi yanlış pozitif (RT-PCR negatif), 36 tanesi gerçek pozitif olarak değerlendirilmiştir. Toplam 40 örnek (n=80) negatif çıkmıştır. Negatif örneklerin 5 tanesi yanlış pozitif (RT-PCR pozitif) olarak değerlendirilmiştir. GraphPad Prism 10 programında yapılan istatistiksel analize göre Sensitivite oranı %90, Spesifite oranı ise %87.5 olarak belirlenmiştir ve p güven aralığı ($p < 0.05$) anlamlı çıkmıştır. Zhang ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada rekombinant CDV F proteinine karşı 3 farklı mAb geliştirmişlerdir. Daha sonra ticari kolloidal altın testi (lateral flow) ile ELISA testini karşılaştırdıklarında serumda %100 benzerlik, dışkıda ise %96.4 benzerlik bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda elde edilen mAb konjugat olarak ve pAb yakalayıcı antikor olarak kullanılmıştır. RT-PCR testi ile yapılan bazı çalışmalarda Sensitivite ve Spesifite değerleri düşük bulunmuştur. *Cryptosporidium* için yapılan ELISA test geliştirilmesi çalışmasında RT-PCR sonuçlarına göre sensitivitesini %40.9 spesifitesini %78.9 olarak hesaplamışlardır (Danišová ve ark., 2018). Danish ve ark. H1N1 için yaptıkları çalışmada ise sensitivitesini %87 ve spesifitesini %73 olarak hesaplamışlardır (Danish ve ark., 2018). Jeewandara ve ark. SARS CoV-2 için iki farklı hızlı antijen test kiti ile RT-qPCR test sonuçlarını karşılaştırdıklarında sensitiviteyi %36.2 ve %52.6 çıkarken spesifiteyi sırasıyla %99.6 ve %97.6 oranlarında bulmuşlardır (Jeewandara ve ark., 2022). Bu tez çalışmasında elde edilen mAb bölge suşundan izole edilen virus kaynaklı olduğu için oranların bu çalışmalardan daha yüksek olduğu görülmüştür ve CDV'ye karşı etkin bir antijen ELISA testi geliştirilmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Köpek gençlik hastalığı hem ülkemizde hem de tüm dünyada oldukça yaygın bir hastalıktır. Bu nedenle virusa spesifik teşhis metotları, tedavi yöntemleri ve yeni nesil aşılarda geliştirilmesi koruyucu veteriner hekimlik açısından önemlidir.

Bu proje çalışmasında sahadan toplanılan örnekler izole edildikten sonra CDV izolatına karşı hem monoklonal hem de poliklonal antikorlar üretilmiştir. Elde edilen monoklonal antikorlar HRP enzimi ile işaretlenerek tespit (deteksiyon) antikoru olarak kullanılmıştır. Poliklonal antikorların ise yakalayıcı antikor olarak kullanılması tercih edilmiştir. Daha sonra pAb, izolat ve mAb kullanılarak in house antijen ELISA geliştirilmiştir. Pozitif örnekleri %90 oranında, negatif örnekleri %87.5 oranında tespit ederek çoğu ticari kitin sensitivite ve spesifite oranları yakalanmıştır. Bu proje çalışması ile teorik, pratik ve bilimsel altyapı oluşturulmuş ve ileri seviye yeni projelerin geliştirilmesi bakımından yetkinlik kazanılmıştır.

CDV'nin yaygınlığı, spesifik tedavisinin olmaması ve/veya aşılamalara rağmen hastalık insidensinin yüksek olması veteriner hekimlik açısından önem arz etmektedir. Monoklonal antikorlar keşiflerinden (1975) itibaren CDV gibi yaygın hastalıkların teşhisi ve tedavisinde kullanımları da artmıştır. Bu nedenle de bu çalışmada CDV'ye spesifik monoklonal antikor geliştirilmesi hedeflenilmiş olup F proteinine karşı mAb geliştirilmiş ve başarıyla kullanılmıştır. Bu bağlamda yerli üretim mAb'ların geliştirilmesinin, mevcut veya gelecekte ortaya çıkacak olası hastalıkların teşhisinde veya tedavisinde kritik rol oynayacağı düşünülmektedir.

ELISA gibi birden fazla örneklemeye dayalı test yöntemleri, büyük çaplı saha taramalarında aynı anda birçok hayvandan elde edilen örneklerle uygulanarak, bölgesel antijen/antikor tespitinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Bu testlerde kullanılan

antijen/antikorun yerel suşlardan elde edilmesi, bölgesel çalışmalarda testlerin doğruluk oranını önemli ölçüde artırma potansiyeline sahiptir. Bunun yanı sıra özellikle ELISA gibi testlerin uzman kişiler tarafından ülkemiz kaynaklarıyla geliştirilmesi hem mevcut hem de gelecekte oluşabilecek viral hastalıkların tanı ve tedavi yöntemlerinde kritik roller oynayacağı düşünülmektedir. Bu bağlamda ise yerli antijen ve antikor üretimi, bölgesel ve ulusal düzeyde etkili bir hastalık izleme ve kontrol stratejisi geliştirilmesinde önemli katkılar sağlayacaktır.



7. KAYNAKLAR

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Basic Immunology: Functions and Disorders. Elsevier Press (Fourth Edition), Philadelphia 2016.
- Aksoy B. Derinin doğal bağışıklık sistemi. Turkderm Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi, 2013; 47; 2–11.
- Appel M, Robson DS. A microneutralization test for *Canine distemper virus*. Am J Vet Res, 1973; 34(11); 1459-1463.
- Appel MJG. Forty Years of Canine Vaccination. Adv Vet Med, 1999; 41; 309–324.
- Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. Peptides, 2015; 72; 4–15.
- Azkur AK, Aksoy E, Yıldırım M, Yıldız K. Optimisation of indirect ELISA by comparison of different antigen preparations for detection of antibodies against Schmallenberg virus. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 2020; 26(6); 1795-800.
- Bamford DH, Zuckerman M. Encyclopedia of Virology, Elsevier Press (Fourth Edition), Philadelphia 2020 (Vol. 1–5).
- Beauchemin C, Moerke NJ, Faloon P, Kaye KM. Assay development and high-throughput screening for inhibitors of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus n-terminal latency-associated nuclear antigen binding to nucleosomes. J Biomol Screen, 2014; 19(6); 947-958.
- Becker AS, Silva Júnior JVJ, Weiblen R, Flores EF. An appraisal of gene targets for phylogenetic classification of Canine distemper virus: Is the hemagglutinin the best candidate? Virus Res, 2023; 325.
- Beineke A, Baumgärtner W, Wohlsein P. Cross-species transmission of canine distemper virus-an update. One Health, 2015; 49-59.

- Beineke A, Puff C, Seehusen F, Baumgärtner W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009; 127 (1-2); 1-18.
- Berber E. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığına Karşı Koruyucu Aşı Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ 2014; s.: 60-62.
- Bi Z, Xia X, Wang Y, Mei Y. Development and characterization of neutralizing monoclonal antibodies against canine distemper virus hemagglutinin protein. *Microbiol Immunol*, 2015; 59(4); 202–208.
- Blancou J. Dog distemper: imported into Europe from South America? *Hist Med Vet*, 2004; 29(2); 35–41.
- Bloyet LM. The nucleocapsid of paramyxoviruses: Structure and function of an encapsidated template. *Viruses*, 2021; 13(12); 2465.
- Bradbury ARM, Trinklein ND, Thie H, Wilkinson IC, Tandon AK, Anderson S, Bladen CL, Jones B, Aldred SF, ...Dübel S. When monoclonal antibodies are not monospecific: Hybridomas frequently express additional functional variable regions. *MAbs*, 2018; 10(4).
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976; 72(1–2).
- Bringolf F, Herren M, Wyss M, Vidondo B, Langedijk JP, Zurbriggen A, Plattet P. Dimerization Efficiency of Canine Distemper Virus Matrix Protein Regulates Membrane-Budding Activity. *J Virol*, 2017; 91(16); 1–20.
- Brunelle JL, Green R. Coomassie Blue Staining. In: Jon Lorsch (ed), *Methods in Enzymology*. Elsevier Press, Philadelphia 2014; p.:161-167.
- Buss NAPS, Henderson SJ, McFarlane M, Shenton JM, De Haan L. Monoclonal antibody therapeutics: History and future. *Curr Opin Pharmacol*, 2012; 12(5); 615–622.
- Bussel JB, Giulino L, Lee S, Patel VL, Sandborg C, Stiehm ER. Update on Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 2007; 37(4); 118–135.

- Cabasso VJ, Cox HR. A distemper like strain of virus derived from a case of canine encephalitis: its adaptation to the chick embryo and subsequent modification. *Jour Biol Chem*, 1952; 96-107.
- Çalışkan E, Burgu İ. Köpek gençlik hastalığı virusunun prevalansı ve seroepidemiolojisi. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 2007; 18(1); 5-10.
- Can Sahna K, Gencay A, Atalay O. Viral etiology of diarrhoea in puppies from a same shelter in Turkey: Presence of mixed infections. *Rev Med Vet (Toulouse)*, 2008; 159(6).
- Chen F, Guo Z, Zhang R, Zhang Z, Hu B, Bai L, Zhao S, Wu Y, Zhang Z, Li Y. Canine distemper virus N protein induces autophagy to facilitate viral replication. *BMC Vet Res*, 2023; 19(1); 60.
- Chinnakannan SK, Nanda SK, Baron MD. Morbillivirus V Proteins Exhibit Multiple Mechanisms to Block Type 1 and Type 2 Interferon Signalling Pathways. *PLoS One*, 2013; 8(2)
- Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, 2006; 1(2); 581–585.
- Chowdhury MMI, Kabir N, Ahmed R, Yokota K, Mullins R, Reza HM. Generation of monoclonal antibody against 6-Keto PGF1 α and development of ELISA for its quantification in culture medium. *Biochem Biophys Rep*, 2024; 39.
- Cohen, S. Antibody structure. *J Clin Pathol Suppl*, 1975;6; 1–7.
- Colman PM, Lawrence MC. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003.
- Çomakli S, Özdemir S, Değirmençay Ş. Canine distemper virus induces downregulation of GABAA, GABAB, and GAT1 expression in brain tissue of dogs. *Arch Virol*, 2020; 165(6); 1321–1331.
- Cui Y, Li D, Morisseau C, Dong JX, Yang J, Wan D, Rossotti MA, Gee SJ, González-Sapientza GG, Hammock BD. Heavy chain single-domain antibodies to detect native human soluble epoxide hydrolase. *Anal Bioanal Chem*, 2015; 407(24).
- Danish MT, Aslam HMM, Dur-E-Zahra. The comparison of sensitivity and specificity of ELISA-based microneutralization test with hemagglutination inhibition test

- to evaluate neutralizing antibody against influenza virus (H1N1). *PJMHS*, 2018: 12(3); 1690.
- Danišová O, Halánová M, Valenčáková A, Luptáková L. Sensitivity, specificity and comparison of three commercially available immunological tests in the diagnosis of *Cryptosporidium* species in animals. *BJM*, 2018: 49(1); 177-183.
- Deem SL, Spelman LH, Yates RA, Montali RJ. Canine distemper in terrestrial carnivores: A review. *J Zoo Wildl Med*, 2000: 31(4); 441-451.
- Devaux P, Cattaneo R. Measles virus phosphoprotein gene products: conformational flexibility of the p/v protein amino-terminal domain and c protein infectivity factor function. *J Virol*, 2004: 78(21); 11632-11640.
- Dunn LA, Upcroft JA, Fowler EV, Matthews BS, Upcroft P. Orally administered *Giardia duodenalis* extracts enhance an antigen-specific antibody response. *Infect Immun*, 2001: 69(10); 6503-6510.
- Duque-Valencia J, Sarute N, Olarte-Castillo XA, Ruíz-Sáenz J. Evolution and interspecies transmission of canine distemper virus—an outlook of the diverse evolutionary landscapes of a multi-host virus. *Viruses*, 2019: 11(7); 582.
- Dutton JW, Artwohl JE, Huang X, Fortman JD. Assessment of pain associated with the injection of sodium pentobarbital in laboratory mice (*mus musculus*). *JAALAS*, 2019: 58(3); 373-379.
- Echeverry-Bonilla DF, Buriticá-Gaviria EF, Orjuela-Acosta D, Chinchilla-Cardenas DJ, Ruiz-Saenz J. the first report and phylogenetic analysis of Canine distemper virus in *cerdocyon thous* from colombia. *Viruses*, 2022: 14(9); 1947.
- Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs*, 2015: 7(1); 9–14.
- El Najjar F, Schmitt AP, Dutch RE. Paramyxovirus glycoprotein incorporation, assembly and budding: A three way dance for infectious particle production. *Viruses*, 2014: 6(8); 3019-3054.
- Elia G, Camero M, Losurdo M, Lucente MS, Larocca V, Martella V, Decaro N, Buonavoglia C. Virological and serological findings in dogs with naturally occurring distemper. *J Virol Methods*, 2015; 213: 127-30.

- Elia G, Camero M, Losurdo M, Lucente MS, Larocca V, Martella V, Decaro N, Buonavoglia C. Virological and serological findings in dogs with naturally occurring distemper. *J Virol Methods*, 2015: 213; 127-130.
- Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 1971: 8(9); 871–874.
- Ertürk E. Ankara köpeklerinde görülen gençlik hastalığı ve epidemiolojisi üzerine araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 1960: 7(4); 249–274.
- Esin C, Cetiner H, Ozkilic GN, Pekmezci D. Canine distemper virus infection in two badgers (meles meles) from the black sea region of Türkiye. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2022: 28(4); 533-534.
- Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985: 39(4).
- Feng N, Liu Y, Wang J, Xu W, Li T, Wang T, Wang L, Yu Y, Wang H, Zhao Y, Yang S, Gao Y, Hu G, Xia X. Canine distemper virus isolated from a monkey efficiently replicates on Vero cells expressing non-human primate SLAM receptors but not human SLAM receptor. *BMC Vet Res*, 2016: 12(1); 1-7.
- Frisk AL, König M, Moritz A, Baumgärtner W. Detection of Canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J Clin Microbiol*, 1999: 37(11); 3634-3643.
- Ganguly S, Wakchaure R. Hybridoma technology: a brief review on its diagnostic and clinical significance. *Pharmaceut Biol Eval*, 2016: 3(6); 554-555.
- Gassen U, Collins FM, Duprex WP, Rima BK. establishment of a rescue system for Canine distemper virus. *J Virol*, 2000: 74(22); 10737–10744.
- Gencay A, Oncel T, Karaoglu T, Sancak AA, Demir AB, Ozkul A. Antibody prevalence to Canine distemper virus (CDV) in stray dogs in Turkey. *Rev Med Vet*, 2004: 155(8–9); 432-434.
- Giacinti JA, Pearl DL, Ojkic D, Campbell GD, Jardine CM. Genetic characterization of canine distemper virus from wild and domestic animal submissions to diagnostic facilities in Canada. *Prev Vet Med*, 2022: 198; 105532.

- Ginkel FW van, Wahl SM, Kearney JF, Kweon M-N, Fujihashi K, Burrows PD, Kiyono H, McGhee JR. Partial IgA-deficiency with increased th2-type cytokines in TGF- β 1 knockout mice. *Journal Immunol*, 1999: 163(4); 1951-1957.
- Gradauskaite V, Inglebert M, Doench J, Scherer M, Dettwiler M, Wyss M, Shrestha N, Rottenberg S, Plattet P. LRP6 is a functional receptor for attenuated Canine distemper virus. *MBio*, 2023: 14(1); e03114-22.
- Green TJ, Luo M. Structure of the vesicular stomatitis virus nucleocapsid in complex with the nucleocapsid-binding domain of the small polymerase cofactor, P. *Proc Natl Acad Sci*, 2009: 106(28); 11713-11718.
- Greenfield EA. Selecting for and checking cells with HGPRT deficiency for hybridoma production. *Cold Spring Harb Protoc*, 2021: (9).
- Greenfield EA. Standard immunization of mice, rats, and hamsters. *Cold Spring Harb Protoc*, 2020: (3).
- Haig DA. Canine distemper - immunisation with avianised virus. University of Pretoria:1956.
- Hanack K, Messerschmidt K, Listek M. Antibodies and selection of monoclonal antibodies. *Protein Targeting Compounds: Prediction, Selection and Activity of Specific Inhibitors*. 2016:11-22.
- Harlow ED, Lane David. Antibodies: A laboratory manual. *Trends Biochem Sci*, 1989: 14(10).
- Hasircioğlu S, Pelin ASLIM H. Detection of Canine distemper virus from ocular swab and blood samples in dog by real-time RT-PCR method. *Kocatepe Vet J*, 2021: 14(4); 415–421.
- Heaney J, Barrett T, Cosby SL. Inhibition of in vitro leukocyte proliferation by Morbilliviruses. *J Virol*, 2002: 76(7); 3579–3584.
- Hoffman W, Lakkis FG. ve Chalasani G. B cells, antibodies, and more. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2016: 11(1); 137–54.
- Horikami SM, Curran J, Kolakofsky D, Moyer SA. Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. *J Virol*, 1992: 66(8); 4901-4908.
- Hornbeck P V. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Curr Protoc Immunol*, 2015: 110(1); 2.1.

- Hughes CE, Benson RA, Bedaj M, Maffia P. Antigen-presenting cells and antigen presentation in tertiary lymphoid organs. *Front Immunol*, 2016: 7; 481.
- Hurrell JG, editor. *Monoclonal hybridoma antibodies: techniques and applications*. Boca Raton, FL: CRC press; 1982 Jul 1.
- ICTV. Taxonomy. Erişim: <https://ictv.global/taxonomy>. Erişim Tarihi: 05 Kasım 2024.
- Iwasaki M, Takeda M, Shirogane Y, Nakatsu Y, Nakamura T, Yanagi Y. The Matrix Protein of Measles Virus Regulates Viral RNA Synthesis and Assembly by Interacting with the Nucleocapsid Protein. *J Virol*, 2009: 83(20); 10374-10383.
- Jeewandara C, Guruge D, Pushpakumara PD, Madhusanka D, Jayadas TT, Chaturanga IP, Aberathna IS, Danasekara S, Pathmanathan T, Jayathilaka D, Ogg GS, Malavige GN. Sensitivity and specificity of two WHO approved SARS-CoV2 antigen assays in detecting patients with SARS-CoV2 infection. *BMC Infect Dis*, 2022: 22(1); 276.
- Kajita M, Katayama H, Murata T, Kai C, Hori M, Ozaki H. Canine distemper virus induces apoptosis through caspase-3 and -8 activation in vero cells. *J Vet Med B*, 2006: 53(6); 273-277.
- Kapil S, Yearly TJ. Canine distemper spillover in domestic dogs from urban wildlife. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2011: 41(6); 1069–1086.
- Karapınar Z, İlhan F, Usta M, Timurkan MÖ. Pathological and molecular investigation of canine distemper virus: Phylogenetic analysis of co-circulating genetic lineages in Türkiye. *Acta Vet Hung*, 2023: 71(1); 54-64.
- Karki M, Rajak KK, Singh RP. Canine morbillivirus (CDV): a review on current status, emergence and the diagnostics. *VirusDis*, 2022: 33(3); 309-321.
- Kato K, Hamaguchi Y, Okawa S, Ishikawa E, Kobayashi K, Katunuma N. Use of rabbit antibody IgG bound onto plain and aminoalkylsilyl glass surface for the enzyme-linked sandwich immunoassay. *J Biochem*, 1977: 82(1); 261-266.
- Koç BT, Akkutay-Yoldar Z, Oğuzoğlu TÇ. New members to Arctic-like lineage of Canine distemper virus from Turkey. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2021: 78; 101678.
- Köhler G, Milstein C. Cultivos continuos de células fusionadas que secretan anticuerpos de especificidad predefinida. *Nature*, 1975: 256(21); 495–497.

- Koutinas AF, Baumgärtner W, Tontis D, Polizopoulou Z, Saridomichelakis MN, Lekkas S. Histopathology and immunohistochemistry of Canine distemper virus-induced footpad hyperkeratosis (hard pad disease) in dogs with natural Canine distemper. *Vet Pathol*, 2004; 41(1); 2-9.
- Laidlaw PP, Dunkin GW. Studies in dog-distemper. *J Comp Pathol*, 1926; 39; 222–230.
- Laksono BM, Tran DN, Kondova I, van Engelen HGH, Michels S, Nambulli S, de Vries RD, Duprex WP, Verjans GMGM, de Swart RL. Comparable infection level and tropism of measles virus and canine distemper virus in organotypic brain slice cultures obtained from natural host species. *Viruses*, 2021; 13(8); 1582.
- Lan NT, Yamaguchi R, Kai K, Uchida K, Kato A, Tateyama S. The growth profiles of three types of Canine distemper virus on Vero cells expressing canine signaling lymphocyte activation molecule. *JVMS*, 2005; 67(5); 491–495.
- Lane RD. A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas. *J Immunol Methods*, 1985; 81(2); 223-228.
- Lanszki Z, Tóth GE, Schütz É, Zeghibib S, Rusvai M, Jakab F, Kemenesi G. Complete genomic sequencing of Canine distemper virus with nanopore technology during an epizootic event. *Sci Rep*, 2022; 8;12(1):4116.
- Lanszki Z, Zana B, Zeghibib S, Jakab F, Szabó N, Kemenesi G. Prolonged infection of Canine distemper virus in a mixed-breed dog. *Vet Sci*, 2021; 8(4); 61.
- Lednický JA, Meehan TP, Kinsel MJ, Dubach J, Hungerford LL, Sarich NA, Witecki KE, Braid MD, Pedrak C, Houde CM. Effective primary isolation of wild-type Canine distemper virus in MDCK, MV1 Lu and Vero cells without nucleotide sequence changes within the entire haemagglutinin protein gene and in subgenomic sections of the fusion and phosphoprotein genes. *J Virol Methods*, 2004; 118(2); 147–157.
- Lee MS, Tsai KJ, Chen LH, Chen CY, Liu YP, Chang CC, Lee SH, Hsu WL. The identification of frequent variations in the fusion protein of Canine distemper virus. *Vet J*, 2010; 183(2); 184–190.
- Leenaars PPAM, Hendriksen CFM, De Leeuw WA, Carat F, Delahaut P, Fischer R, Halder M, Hanly WC, Hartinger J, Hau J, Lindblad EB, Nicklas W,

- Outschoorn IM, Stewart-Tull DES. The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. *Altern Lab Anim*, 1999: 27(1); 79-102.
- Li Z, Zhang Y, Wang H, Jin J, Li W. Sandwich-dot enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine distemper virus. *CJVR*, 2013: 77(4); 303-308.
- Liang B, Li Z, Jenni S, Rahmeh AA, Morin BM, Grant T, Grigorieff N, Harrison SC, Whelan SPJ. Structure of the l protein of Vesicular stomatitis virus from electron cryomicroscopy. *Cell*, 2015: 162(2); 314-327.
- Lindenmann J. Origin of the terms antibody and antigen. *Scand J Immunol*, 1984;19(4); 281-285.
- Lindström, P., Wager, O. IgG autoantibody to human serum albumin studied by the ELISA-Technique. *Scand J Immunol*, 1978: 7(5); 419-425.
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J. and Weis-Garcia, F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J*, 2005: 46(3); 258–68.
- Liu L. *Fields Virology (6th ed) Clinical Infectious Diseases*, Lippincott Williams & Wilkins, 2014: 59(4); 613–613.
- Liu Y, Hao L, Li X, Wang L, Zhang J, Deng J, Tian K. Development and characterization of Canine distemper virus monoclonal antibodies. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 2017: 36(3); 119–123.
- Lozada C, Barlow TMA, Gonzalez S, Lubin-Germain N, Ballet S. Identification and characteristics of fusion peptides derived from enveloped viruses. *Front Chem*, 2021: 9; 689006.
- Ma GJ, Ferhan AR, Jackman JA, Cho NJ. Conformational flexibility of fatty acid-free bovine serum albumin proteins enables superior antifouling coatings. *Commun Mater*, 2020: 1(1); 45.
- MacLachlan NJ, Dubovi EJ, Barthold SW, Swayne DE, Winton JR(eds). *Fenner's Veterinary Virology: Fifth edition Fenner's Veterinary Virology.*, Academic Press, USA. 2016.
- Mahy BWJ, van Regenmortel MHV. *Encyclopedia of Virology*. Elsevier Press, Philadelphia, 2021.
- Martella V, Elia G, Buonavoglia C. Canine distemper virus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2008: 38(4); 787–797.

- Martinez-Gutierrez M, Ruiz-Saenz J. Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: A systematic review and data synthesis. *BMC Vet Res* ,2016: 12(1); 1-11.
- Mitra S, Tomar PC. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *J Genet Eng Biotechnol*, 2021: 19; 1-12.
- Morrison TG. Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *BBA Biomembranes*, 2003: 1614(1); 73–84.
- Mühlebach MD, Mateo M, Sinn PL, Prüfer S, Uhlig KM, Leonard VHJ, Navaratnarajah CK, Frenzke M, Wong XX, Sawatsky B, Ramachandran S, McCray PB, Cichutek K, Von Messling V, Lopez M, Cattaneo R. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for Measles virus. *Nature*, 2011: 480(7378); 530–533.
- Nandita D. Diagnosis and management of canine distemper in indigenous dog. Clinical report, faculty of Veterinary Medicine, Chittagong Veterinary and Animal Sciences University, 2016.
- Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rabourdin-Combe C, Gerlier D. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol*, 1993: 67(10); 6025-6032.
- Nikolin VM, Wibbelt G, Michler FUF, Wolf P, East ML. Susceptibility of carnivore hosts to strains of canine distemper virus from distinct genetic lineages. *Vet Microbiol*, 2012: 156(1–2); 45-53.
- Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, Lin LT, Sisson G, Tsao MS, Richardson CD. Tumor Cell Marker PVRL4 (Nectin 4) Is an epithelial cell receptor for Measles Virus. *PLoS Pathog*, 2011: 7(8); e1002240.
- Örvell C, Sheshberadaran H, Norrby AE. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against four structural components of Canine Distemper virus. *J Gen Virol* 1985: 66(3); 443-456.
- Otsuki N, Nakatsu Y, Kubota T, Sekizuka T, Seki F, Sakai K, Kuroda M, Yamaguchi R, Takeda M. The V protein of Canine distemper virus is required for virus replication in human epithelial cells. *PLoS One*, 2013: 8(12); 2–9.
- Oyedele OI, Oluwayelu DO, Cadmus SIB, Odemuyiwa SO, Adu FD. Protective levels of Canine distemper virus antibody in an urban dog population using plaque

- reduction neutralization test. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 2004; 71(3); 227-230.
- Pandey S. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. J Pharm Sci Rev Res, 2010; 1(2); 88–94.
- Pardo IDR, Johnson GC, Kleiboeker SB. Phylogenetic Characterization of Canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. J Clin Microbiol, 2005; 43(10); 5009.
- Parray HA, Shukla S, Samal S, Shrivastava T, Ahmed S, Sharma C, Kumar R. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. Immunopharmacol, 2020; 85; 106639.
- Piccinini F, Tesei A, Arienti C, Bevilacqua A. Cell counting and viability assessment of 2d and 3d cell cultures: expected reliability of the trypan blue assay. Biol Proced Online, 2017; 19(1); 1-12.
- Pillet S, von Messling V. Canine distemper virus selectively inhibits apoptosis progression in infected immune cells. J Virol, 2009; 83(12); 6279-6287.
- Plattet P, Alves L, Herren M, Aguilar HC. Measles virus fusion protein: Structure, function and inhibition. Viruses, 2016; 8(4): 112.
- Pomeroy LW, Bjørnstad ON, Holmes EC. The evolutionary and epidemiological dynamics of the paramyxoviridae. J Mol Evol, 2008; 66(2); 98-106.
- Pratakpiriya W, Seki F, Otsuki N, Sakai K, Fukuhara H, Katamoto H, Hirai T, Maenaka K, Techangamsuwan S, Lan NT, Takeda M, Yamaguchi R. Nectin4 is an epithelial cell receptor for Canine distemper virus and involved in neurovirulence. J Virol, 2012; 86(18); 10207–10210.
- Rendon-Marin S, Da Fontoura Budaszewski R, Canal CW, Ruiz-Saenz J. Tropism and molecular pathogenesis of Canine distemper virus. Virol J, 2019; 16(1); 1–15.
- Rima B, Balkema-Buschmann A, Dundon WG, Duprex P, Easton A, Fouchier R, Kurath G, Lamb R, Lee B, Rota P, Wang L. ICTV Virus Taxonomy Profile: Paramyxoviridae. J Gen Virol, 2019; 100(12); 1593-1594.
- Rockborn G. A preliminary report on efforts to produce a living distemper vaccine in tissue culture, 1960; 53-55.

- Rodgers KR, Chou RC. Therapeutic monoclonal antibodies and derivatives: Historical perspectives and future directions. *Biotechnol Adv*, 2016; 34(6); 1149–1158.
- Romanets-Korbut O, Kovalevska LM, Seya T, Sidorenko SP, Horvat B. Measles virus hemagglutinin triggers intracellular signaling in CD150-expressing dendritic cells and inhibits immune response. *Cell Mol Immuno*, 2016; 13(6); 828-838.
- Romanutti C, Gallo Calderón M, Keller L, Mattion N, La Torre J. RT-PCR and sequence analysis of the full-length fusion protein of Canine distemper virus from domestic dogs. *J Virol Methods*, 2016; 228; 79–83.
- Saltık HS, Atılı K. Approaches to identify Canine distemper virus with neurological symptoms on the basis of molecular characterization of hemagglutinin and fusion genes. *Virus Genes*, 2023; 59(4); 591-603.
- Saltık HS, Kale M. Rapid molecular detection and isolation of Canine distemper virus in naturally infected dogs. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 2021; 70(1); 49-56.
- Sawatsky B, Wong X-X, Hinkelman S, Cattaneo R, von Messling V. Canine distemper virus epithelial cell infection is required for clinical disease but not for immunosuppression. *J Virol*, 2012; 86(7); 3658–3666.
- Sayın Y, Erol N. Investigation of Canine distemper virus infection in dogs in the Antalya province. *Anim Health Prod Hyg*, 2021; 10(2); 45-51.
- Schuhmann KM, Pfaller CK, Conzelmann K-K. The Measles virus v protein binds to p65 (RelA) to suppress NF- κ B activity. *J Virol*, 2011; 85(7); 3162-3171.
- Seki F, Ono N, Yamaguchi R, Yanagi Y. Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. *J Virol*, 2003;77(18); 9943-50.
- Selimoğlu SM, Kasap M, Akpınar G, Karadenizli A. Monoklonal antikor teknolojisinin dünü, bugünü ve geleceği. *KOU Sag Bil Derg*, 2016; 2(1); 6–14.
- Siering, O., Sawatsky, B. and Pfaller, C. K. C protein is essential for Canine distemper virus virulence and pathogenicity in ferrets. *J Virol*, 2021; 95(4).
- Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int J Parasitol*, 2003; 33(5-6); 469-478.
- Song G, Huang L, Huang Y, Liu W, Wang M, Hua X. Electrofusion preparation of anti-triazophos monoclonal antibodies for development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods*, 2022; 500; 113184.

- Songu M, Kat H. Enfeksiyondan korunma ve immün sistem. *J Med Updat*, 2012: 2(1); 31–42.
- Stills HF. Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J*, 2005: 46(3); 280-293.
- Sultan S, Lan NT, Ueda T, Yamaguchi R, Maeda K, Kai K. Propagation of Asian isolates of Canine distemper virus (CDV) in hamster cell lines. *Acta Vet Scand*, 2009: 51; 1-5
- Summers BA, Appel' MJG. Aspects of Canine distemper virus and Measles virus encephalomyelitis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1994: 20(6); 525-534.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol Biol Evol*, 2021: 38(7); 3022-7.
- Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. *Mol Biol Evol*. 1992: 9(4); 678-87.
- Tao R, Chen J, Zhao T, Gong C, Pan H, Akhtar RW, Li X, Shah SAH, Li Q, Zhao J. Comparison of growth characteristics and genomics of two Canine distemper virus strains isolated from minks in China. *Front Vet Sci*, 2020: 7; 570277.
- Terio KA, Craft ME. Canine distemper virus (CDV) in another big cat: should CDV be renamed carnivore distemper virus? *MBio*, 2013: 4(5); e00702-13.
- Valle C, Martin B, Debart F, Vasseur JJ, Imbert I, Canard B, Coutard B, Decroly E. The C-terminal domain of the Sudan Ebolavirus L protein is essential for RNA binding and methylation. *J Virol*, 2020: 94(12); 1-14.
- Viralzone. Erişim: https://viralzone.expasy.org/86?outline=all_by_species. Erişim Tarihi: 05 Kasım 2024.
- Von Messling V, Milosevic D, Cattaneo R. Tropism illuminated: Lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proc Natl Acad Sci*, 2004: 101(39); 14216-14221.
- von Messling V, Oezguen N, Zheng Q, Vongpunsawad S, Braun W, Cattaneo R. Nearby clusters of hemagglutinin residues sustain SLAM-dependent Canine distemper virus entry in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol*, 2005: 79(9); 5857–5862.

- von Messling V, Zimmer G, Herrler G, Haas L, Cattaneo R. The Hemagglutinin of Canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J Virol*, 2001; 75(14); 6418–6427.
- Wimer-Mackin S, Hinchcliffe M, Petrie CR, Warwood SJ, Tino WT, Williams MS, Stenz JP, Cheff A, Richardson C. An intranasal vaccine targeting both the *Bacillus anthracis* toxin and bacterium provides protection against aerosol spore challenge in rabbits. *Vaccine*, 2006; 24(18); 3953-3963.
- Woma TY, Van Vuuren M. Isolation of canine distemper viruses from domestic dogs in South Africa using Vero.DogSLAM cells and its application to diagnosis. *Afr J Microbiol Res*, 2009; 3(3); 111–118.
- Woo PCY, Lau SKP, Wong BHL, Fan RYY, Wong AYP, Zhang AJX, Wu Y, Choi GKY, Li KSM, Hui J, Wang M, Zheng BJ, Chan KH, Yuen KY. Feline morbillivirus, a previously undescribed paramyxovirus associated with tubulointerstitial nephritis in domestic cats. *Proc Natl Acad Sci*, 2012; 109(14); 5435-5440.
- Wu M, Ke Q, Bi J, Li X, Huang S, Liu Z, Ge L. Substantially Improved Electrofusion Efficiency of Hybridoma Cells: Based on the combination of nanosecond and microsecond pulses. *Bioengineering*, 2022; 9(9); 450.
- Yadav AK, Rajak KK, Kumar A, Bhatt M, Chakravarti S, Muthu S, Dubal ZB, Khulape S, Yousuf RW, Rai V, Kumar B, Muthuchelvan D, Gupta PK, Singh RP, Singh R. Replication competence of Canine distemper virus in cell lines expressing signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) of goat, sheep and dog origin. *Microb Pathog*, 2021; 156; 104940.
- Yeşilbağ K. Genel Viroloji (2.baskı). Medyay Kitabevi, Ankara 2017; s.: 297.
- Yorde DE, Sasse EA, Wang TY. Competitive enzyme linked immunoassay with use of soluble enzyme/antibody immune complexes for labeling. I. Measurement of human choriogonadotropin. *Clin Chem*, 1976; 22(8); 1372-1377.
- Yücel F, Çirakoğlu B. Production of Monoclonal Antibodies specific for Progesterone. *Türk J of Biol*, 1999; 23(4); 393-400.
- Yucel F. Hibridoma Teknolojileri. In: *Modern Biyoteknoloji Uygulamaları*, Erciyes Üniversitesi Yayınları. 2010.

Zhang Y, Xu G, Zhang L, Zhao J, Ji P, Li Y, Liu B, Zhang J, Zhao Q, Sun Y, Zhou EM.
Development of a double monoclonal antibody–based sandwich enzyme-linked
immunosorbent assay for detecting canine distemper virus. *Appl Micro
Biotechnol*, 2020: 104(24); 10725–10735.





Tarih: 05.05.2021

Toplantı Sayısı: 05

Karar No:21/107

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 05.05.2021 tarihinde Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi
Vehbi GÜNEŞ	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Yusuf KONCA	Prof. Dr.	Ziraat Fakültesi
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
M. Betül AYCAN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Ayşe EKEN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Zühal HAMURCU	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi
İbrahim KARAMAN	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi
Zeynep CAFEROĞLU	Dr.Öğr.Üyesi	Sağlık Bilimleri Fakültesi
İzzet Burçin SATICIOĞLU	Arş. Gör. Dr.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERÜ
Umut ALPMAN	Arş. Gör.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)
Mustafa ERMİŞ	Veteriner Hekim	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye
Mehmet TAV	Dernek Üyesi (Avukat)	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi/Klinik Öncesi Bilimler Bölümü'nden **Doç.Dr. Ayşe GENÇAY GÖKSU** tarafından sunulan "Köpeklerde Canine Distemper Virus (CDV) Enfeksiyonunun Araştırılması, Virusa Karşı Monoklonal Antikor Üretimi ve Antijen-ELISA Geliştirilmesi" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 05.05.2021

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Gültekin ATALAN

İmza :

4% Genel Benzerlik

Her veri tabanı için çıkarılan kaynaklar da dâhil tüm eşleşmelerin kombine toplamı.

Ön Sıradaki Kaynaklar

- 3%  İnternet kaynakları
- 3%  Yayınlar
- 1%  Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

Bütünlük Bayrakları

İnceleme için 1 Bütünlük Bayrağı



Değiştirilen Karakterler

24 sayfada 82 şüpheli karakter

Harfler başka bir alfabeden benzer karakterlerle değiştirilir.

Sistemimizin algoritmaları bir belgede, onu normal bir gönderiden ayırmak için her türlü tutarsızlığı derinlemesine inceler. Tuhaf bir şey fark edersek incelemeniz için bayrak ekleriz.

Bir Bayrak mutlaka bir sorun olduğunu göstermez. Ancak daha fazla inceleme için dikkatinizi vermenizi öneririz.

ÖZGEÇMİŞ

Eğitim

Lisansüstü: Erciyes Üniversitesi Veteriner Mikrobiyoloji Doktora (2019 – 2024)

Lisans: Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2013-2018

Staj Yeri/İş Deneyimi

- Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi- Araştırma Görevlisi- 2020
- Pandoğa Sanayi ve Ticaret A.Ş Çiftliği
- 2017 yılında Erciyes Üniversitesi Hayvan Hastanesi'nde ‘‘Kısmi Zamanlı Öğrenci’’
- Klonbiyotek ARGE Personeli (Mart 2020 – 2021)

Kurs/Seminerler ve Aldığım Sertifikalar

- VetANKA Ulusal Öğrenci Kongresi katılımcı olarak – 2016
- VetEBA Ulusal Öğrenci Kongresi Kurucu Başkanlığı – Şubat 2017 ve Mart 2018
- VetANKA Ulusal Öğrenci Kongresi sunucu olarak – Mart 2018

Sertifikalar

- Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

Beceriler

- Lateral Flow
- Monoklonal Antikor Teknolojisi
- PCR
- ELISA
- Western Blot / SDS PAGE
- Virüs İzolasyonu / Titrasyonu
- Hücre Kültürü
- Biyoinformatik
- Adobe CS6 /Office Programları