



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



AT YETİŞTİRİCİLİĞİ İŞLETMELERİNDE EHV-2 VE EHV-5 ENFEKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI VE TANISAL EHV-5 REAL TIME PCR TEKNİĞİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Ayşe Zeynep AKKUTAY

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Feray ALKAN

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Kerstin BORCHERS

2012 - ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AT YETİŞTİRİCİLİĞİ İŞLETMELERİNDE EHV-2 VE
EHV-5 ENFEKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI VE
TANISAL EHV-5 REAL TIME PCR TEKNİĞİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Ayşe Zeynep AKKUTAY

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Feray ALKAN

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Kerstin BORCHERS

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 10B3338009 proje numarası ile desteklenmiştir.**

2012 - ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Viroloji Doktora **Programı**

Çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından

Doktora **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17/7/2012

Prof. Dr. Yılmaz AKÇA
Ankara Üniversitesi Veteriner Faköltesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Feray ALKAN
Ankara Üniversitesi Veteriner Faköltesi

Prof. Dr. Hakan YARDIMCI
Ankara Üniversitesi Veteriner Faköltesi

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL
Ankara Üniversitesi Veteriner Faköltesi

Prof. Dr. Mehmet ÇABALAR
Harran Üniversitesi Veteriner Faköltesi

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Etiyoloji ve EHV-2, EHV-5 Genom Yapısı	2
1.2. Epidemiyoloji	8
1.3. Patogenez ve Klinik Semptomlar	10
1.4. Teşhis	13
1.5. Bağışıklık	16
1.6. EHV-2 ve EHV-5 Enfeksiyonlarının Türkiye’deki Durumu	17
2. GEREÇ VE YÖNTEM	20
2.1. Gereç	20
2.1.1. Hücre Kültürü	20
2.1.2. Referans Viruslar	20
2.1.3. Tanı Materyalleri	20
2.1.4. Dana Serumu	22
2.1.5. Nested PCR	22
2.1.6. EHV-5 TaqMan Real Time PCR ve Klonlama	23
2.2. Yöntem	25
2.2.1. Test Materyallerinin Hazırlanması	25
2.2.2. Virus İzolasyonu	25
2.2.3. Nested PCR	26

2.2.3.1 DNA Ekstraksiyonu	26
2.2.3.2. Nested PCR Spesifisite	27
2.2.3.3. Nested PCR Ürün Eldesi	28
2.2.3.4. PCR Ürünlerinin AgaroZ Jel Elektroforez Yöntemi ile Görüntülenmesi	29
2.2.4. EHV-5 TaqMan Real Time PCR	30
2.2.4.1 EHV-2 ve EHV-5 PCR Ürünlerinin Klonlanması	30
2.2.4.2. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Primer Tasarımı	31
2.2.4.3. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Spesifisite	33
2.2.4.4. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Relatif Sensitivite	33
2.2.4.5. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Tespit Limiti Belirlenmesi	33
2.2.4.6. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Ürün Eldesi	34
3. BULGULAR	35
3.1. Virus İzolasyonu	35
3.2. Nested PCR	37
3.2.1. DNA Ekstraksiyonu	37
3.2.2. Nested PCR Spesifisite	37
3.2.3. Nested PCR Sonuçları	39
3.2.4. Nested PCR Sonuçlarının Kokültivasyon Verileriyle Karşılaştırılması	45
3.3. EHV-5 TaqMan Real Time PCR	45
3.3.1. EHV-2 ve EHV-5 PCR Ürünlerinin Klonlanması	45
3.3.2. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Primer Tasarımı	47
3.3.3. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Spesifisite	47
3.3.4. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Relatif Sensitivite	48
3.3.5. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Tespit Limiti Belirlenmesi	50
3.3.6. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Sonuçları	53
4. TARTISMA	62
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	70
ÖZET	73
SUMMARY	74
KAYNAKLAR	75

EK-1 Malatya ve Bursa'dan sağlanan materyallere ait dsDNA'ların 260 nm dalga boyunda ölçümleri	85
EK-2 Etik kurul kararı	87
ÖZGEÇMİŞ	89

ÖNSÖZ

Tüm dünyada yaygınlık gösteren Equine Herpes Virus 2 ve Equine Herpes Virus 5 enfeksiyonları erişkin at ve taylarda özellikle bazı bakteriyel hastalıklara predizpozisyon oluşturabilmektedir. Her iki etken üst solunum yolu semptomu gösteren ya da göstermeyen atlardan izole edilebilmektedir. Patogenezleri tam olarak bilinmemekle beraber özellikle EHV-2'nin solunum sisteminin önemli patojenleri ile birlikte bildiriliyor olması etiyolojik ajan olarak EHV-2 ve EHV-5 bağlamında bir sorgulama yapılması gereğini doğurmaktadır.

Ülkemizde Malatya, Eskişehir ve Bursa illerinde yerleşik, kamuya ait üç işletme Türkiye ve Ortadoğu'da Arap atı yetiştiriciliğinde en önemli yetiştirici durumundadır. Bu işletmelerde yetiştirilen atlar her yıl yarış atı olarak kullanılmak üzere, bu alanda faaliyet gösteren yetiştiricilere arz edilmektedir. Söz konusu işletmelerde pneumoni olguları ve buna bağlı tay ölümlerinin olduğu ya da tedavi sonrasında yarış atı olma yeteneğini kaybeden atların olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada EHV-2 ve EHV-5 enfeksiyonlarının ülkemizde bir sektör halini alan ve önemli bir ekonomik boyutu olan yarış atı yetiştiriciliği yapılan işletmelerde varlığı/yaygınlığı ilk kez sorgulanmış olup, izolasyon çalışması sonunda izole edilen saha virusları, daha sonra yapılması planlanan moleküler karakterizasyon ve aşı geliştirme çalışmaları için kullanılabilir niteliktedir. Bu çalışma kapsamında geliştirilen EHV-5 real-time PCR tanıda hızlı ve hassas bir yöntem olarak kullanılabilir ve geliştirilecek benzeri teşhis metotları için örnek teşkil edecektir. Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından 10B3338009 proje numarası ile desteklenmiştir.

Bu çalışmanın her aşamasında özveri, olumlu yönlendiriciliği, sabır ve yapıcı eleştirilerinden dolayı, Danışman Hocam Prof. Dr. Feray ALKAN'a ve Doç. Dr. Kerstin BORCHERS'e, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nın tüm olanaklarından faydalanmamı sağlayan ve tez izleme komitesi çalışmalarında olumlu yönlendirmeleri ile katkıda bulunan kıymetli Hocam Prof. Dr. İbrahim BURGU ve Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yılmaz AKÇA'ya; yardım ve desteklerini gördüğüm, Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Aykut ÖZKUL, Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP, Doç. Dr. M. Taner KARAOĞLU ve Doç. Dr. T. Çiğdem OĞUZDOĞLU ile tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. Hakan YARDIMCI'ya, doktora tez çalışmam boyunca birlikte görev yaptığım araştırma görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma, tez çalışmama büyük katkıda bulunan Prof. Dr. Klaus OSTERRIEDER, Dr. Armando DAMIANI ve Dr. Karsten TISCHER'e teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bp : Base pair
BSA : Bovine Serum Albumin
°C : Santigrat derece
cm² : Santimetrekare
CO₂ : Karbondioksit
CPE : Cytopathic effect
CpA : Cytosine-phosphate-adenine
CpG: Cytosine-phosphate-guanine
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP : Deoksinükleotid triphosphate
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
ED : Equine Dermal hücre hattı
Eff%: qPCR reaksiyon verimliliği
EHV-2 : Equine Herpes Virus-2
EHV-5: Equine Herpes Virus-5
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FDS : Fötal Dana Serumu
Fw : Forward
gB : Glikoprotein B
GC : Guanine, cytosine
GpC : Guanine-phosphate-cytosine
IEG: Immediate Early Genes
Kbp : Kilobase pair
µl : Mikrolitre
MGB: Minor Groove Binding
MgCl₂ : Magnezyum klorür
ml: mililitre
NFQ: Nonfluorescent Quencher Dye

nm: Nanometre

ORF: Open Reading Frame

PCR : Polymerase Chain Reaction

PBS : Phosphate Buffered Saline

PBMC: Periferal Blood Mononuclear Cells

q PCR : Real Time PCR

R^2 : qPCR tespit faktörü

Rev: Reverse

RK-13 : Rabbit Kidney-13 hücre hattı

ROX (6-carboxy-X-rhodamine): Pasif referans boya

slope: qPCR eğrisi

Taq : Thermus aquaticus

TpG : Timin-phosphate-guanine

VP : Viral Protein

y-inter: qPCR y-kesişimi

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1.1. Herpesviridae ailesi filogenetik ilişkiler	3
Şekil 2.1. EHV-2 ayrımı açısından spesifisite sağlanacağı düşünülen gB bölgesinde yapılan hizalama	32
Şekil 3.1. EHV-2 olarak identifiye edilen saha virusunun ED hücre hattında oluşturduğu CPE	35
Şekil 3.2. EHV-2 olarak identifiye edilen saha virusunun RK-13 hücre hattında oluşturduğu CPE	36
Şekil 3.3. RK ve ED kontrol hücre hatları	36
Şekil 3.4. EHV-2 için spesifisite tespiti amacıyla uygulanan nested PCR sonucu	38
Şekil 3.5. EHV-5 için spesifisite tespiti amacıyla uygulanan nested PCR sonucu	38
Şekil 3.6. EHV-5 nested PCR sonucu oluşan ürünlerin agaroz jel görüntüsü	39
Şekil 3.7. EHV-2 nested PCR sonucu oluşan ürünlerin agaroz jel görüntüsü	40
Şekil 3.8. EHV-2 koloni PCR sonucu oluşan ürünlerin agaroz jel görüntüsü	46
Şekil 3.9. EHV-5 plazmid DNA'sı restriction endonükleaz enzimleriyle kesim sonucu oluşan ürünlerin agaroz jel görüntüsü	46
Şekil 3. 10. EHV-5 TaqMan real time PCR için spesifisite tespiti amplifikasyon görüntüsü	48
Şekil 3.11. EHV-5 TaqMan real time PCR plazmid sulandırılmaları nested PCR sensitivitesi agaroz jel görüntüsü	49
Şekil 3.12. Relatif sensitivite agaroz jel görüntüsü	49
Şekil 3.13. EHV-5 TaqMan real time PCR tespit limiti belirlenmesi sonucu oluşan ürünlerin amplifikasyon görüntüsü	51

Şekil 3.14. EHV-5 TaqMan real time PCR tespit limiti belirlenmesi sonucu oluşan standart eğri	52
Şekil 3.15. EHV-5 TaqMan real time PCR reaksiyonuna alınan örneklerin standart eğrilerinin oluşturulması amacıyla hazırlanan sulandırılmalara ait amplifikasyonlar	56
Şekil 3.16. EHV-5 TaqMan real time PCR reaksiyonu eşik değerin belirlenmesi	57
Şekil 3.17. EHV-5 TaqMan real time PCR reaksiyonuna alınan örneklerin standart eğri üzerindeki yerleşimi	58

ÇİZELGELER

	Sayfa No
Çizelge 1.1. Tüm dizin analizi bilinen gammaherpesviruslar	5
Çizelge 2.1. Araştırmada örneklenen at popülasyonuna ait bilgiler	21
Çizelge 2.2. EHV-2 ve EHV-5 tip spesifik nested PCR’da kullanılan primerler	23
Çizelge 2.3. EHV-5 TaqMan real time PCR ve klonlamada kullanılan probe ve primerler	24
Çizelge 2.4. Çalışmada kullanılan PCR karışım bileşenleri ve miktarları	28
Çizelge 2.5. Çalışmada kullanılan TaqMan real time PCR karışım bileşenleri ve miktarları	34
Çizelge 3.1. I nolu işletmeden sağlanan materyallerin nested PCR sonuçları	41
Çizelge 3.2. II nolu İşletmeden sağlanan materyallerin nested PCR sonuçları	42
Çizelge 3.3. III nolu İşletmeden sağlanan materyallerin nested PCR sonuçları	43
Çizelge 3.4. Araştırma süresince örneklenen atlara ait nested PCR sonuçları	44
Çizelge 3.5. EHV-2 nested PCR sonuçlarının kokültivasyon verileriyle karşılaştırılması	45
Çizelge 3.6. Logaritma on tabanına göre hazırlanan plazmid sulandırılmalarının applied biosystems 7500/7500 fast real-time PCR sisteminde hespalanan eşik değerleri ve kopya sayıları	50
Çizelge 3.7. Eşik değer tespiti amacıyla logaritma on tabanına göre hazırlanan plazmid sulandırılmalarının ve viral yükü tespit edilmek istenen örneklerin applied biosystems 7500/7500 fast real-time PCR sisteminde hespalanan eşik değerleri ve kopya sayıları	54
Çizelge 3.8. TaqMan real time PCR ve nested PCR testinde EHV-5 pozitifliği araştırılan örneklerin karşılaştırmalı sonuçları	60
Çizelge 3.9. TaqMan real time PCR ve nested PCR reaksiyonuna alınan örneklerin viral DNA yükleri ng/μl	61

1. GİRİŞ

Equine Herpesvirus 2 (EHV-2) ve Equine Herpesvirus 5 (EHV-5) yarış atı endüstrisinde kayıplara yol açan, patogenezi tam olarak bilinmeyen enfeksiyonların etkenidirler (Nordengrahn ve ark 2002, Wilcox, 2004). Bu iki gammaherpesvirustan EHV-2'nin direkt olarak ya da sekonder viral ve bakteriyel patojenlere predispozisyon oluşturarak üst solunum yolu hastalıklarına yol açtığı bilinmektedir (Kershaw ve ark. 2001; Craig ve ark. 2005). EHV-5'in solunum sistemi enfeksiyonlarındaki rolü halen tartışılmakta olmasına karşın multinodüler fibrozis ve dermatit olgularında tespit edilmiştir (Verryken ve ark., 2010; König ve ark 2011; Marenzoni ve ark., 2011).

Equine Herpesvirus 2 dünyadaki at popülasyonunun büyük bir çoğunluğunda tespit edilmiş olup, bazen %80-%90 oranında seropozitifliğe ulaşabilmektedir. EHV-5 enfeksiyonu da yaygın olarak görülmekle beraber, EHV-2 enfeksiyonuna oranla daha düşük prevalansa sahiptir (Borchers ve ark., 1999; Craig ve ark., 2005).

Equine Herpesvirus-2 ilk defa 1963 yılında üst solunum yolu semptomu gösteren bir attan izole edilmiş olup, LK suşu olarak isimlendirilmiştir (Plummer ve ark., 1963). Önceleri cytomegaloviruslarla benzer sitopatoloji ve in vitro konakçı spesifitesi göstermesi sebebiyle betaherpesvirus ailesine dahil edilen virusun daha sonra yapılan sekans analizi çalışmaları, EHV-2 ve EHV-5'in antijenik olarak yakın ilişkili gammaherpesviruslar olduğunu ortaya çıkarmıştır (Telford ve ark., 1993).

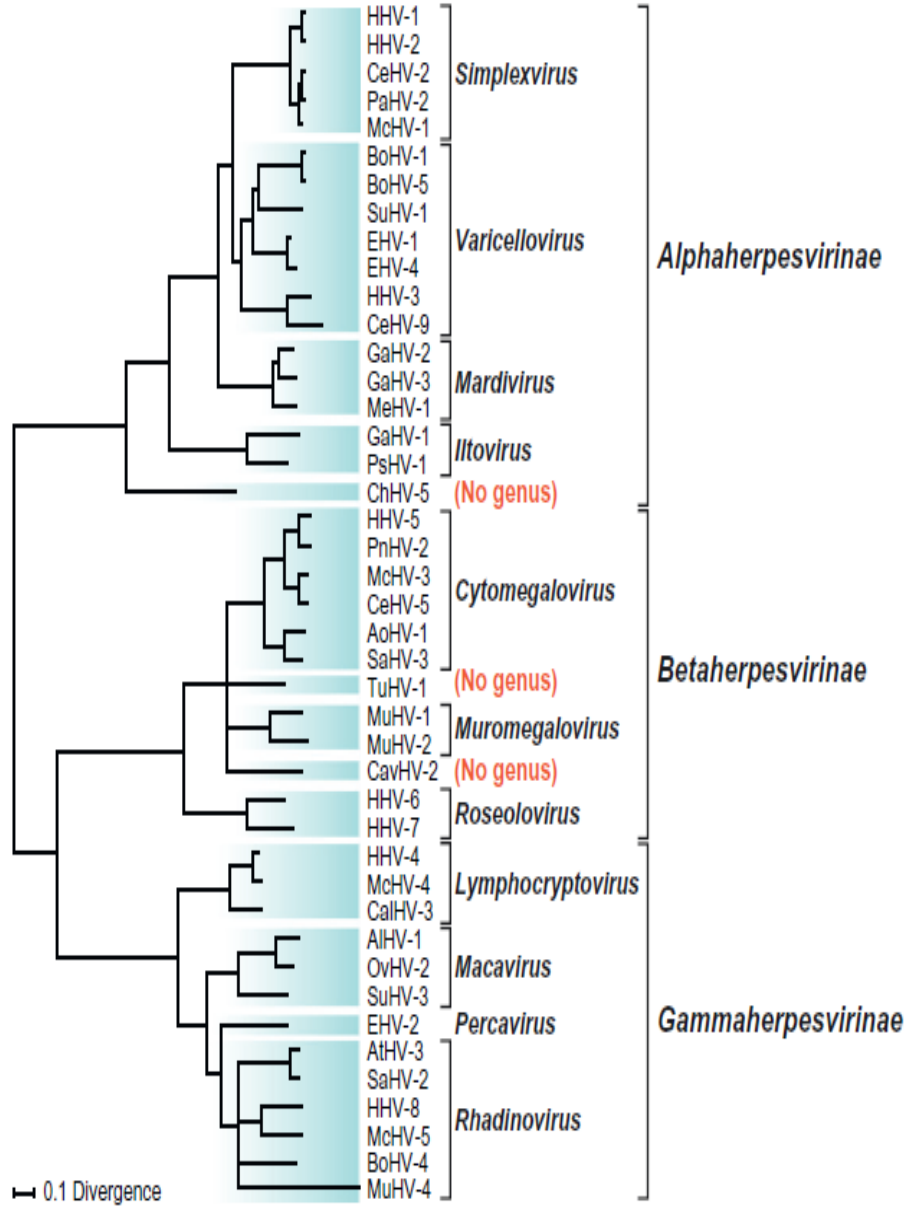
EHV-2 izolasyonundan 24 yıl sonra 1987'de diğer bir gammaherpesvirus olan EHV-5 izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Browning ve ark., 1987). EHV-2 ile benzer guanin-sitozin içeriği ve guanin fosfat sitozin yayılımı göstermektedir (Telford ve ark., 1993).

1.1. Etiyoloji ve EHV-2, EHV-5 Genom Yapısı

Tek tırnaklı hayvanların solunum sistemi enfeksiyonlarında bazı bakterilerin (*Streptococcus zooepidemicus*, *Rhodococcus equi*, vb.) yanısıra adenoviruslar, equine influenzavirus, equine arteritisvirus ve alpaherpesviruslar (EHV-1 ve EHV-4) önemli yer alan etiyolojik ajanlardır (Borchers ve ark., 2005; Dynon ve ark., 2001; Nordengrahn ve ark., 1996 ve Nordengrahn ve ark., 2002). Bunlardan başka bir gammaherpesvirus olan EHV-2 de son yıllarda solunum sisteminin patojenleri içinde değerlendirilmeye başlanmıştır. EHV-2 ile aynı alt ailede bulunan EHV-5 ise diğer bazı etkenler ile gelişen solunum sistemi enfeksiyonlarının predispoze faktörü olarak tanımlanmaktadır (Agius ve ark., 1994; Bell ve ark., 2006).

Herpesviridae ailesi, viruslar içerisinde kompleks ve geniş bir ailedir. Bu aile şimdiye kadar tanımlanan 120 türün dışında başka türleri de barındırmaktadır (Minson ve ark., 2000). Herpesvirusların virionları 200-250 nm çapındadır ve yaklaşık 125 çapındaki ikozahedral kapsidle çevrelenmiş linear çift sarmal DNA içerir (Davison ve Clements, 1997). DNA büyüklüğü 125-290 kbp arasında değişiklik gösterir. DNA'yı saran ikozahedral kapsid T=16 simetrisine sahiptir. İkozahedral kapsid birçok proteini içeren tegümente gömülü ve çeşitli viral glikoproteinleri içeren lipid membranla sarılmış durumdadır (Pellet ve Roizman, 2006).

Herpesviruslar temel olarak 3 alt aileye ayrılmışlardır. Bu alt aileler alfa, beta ve gammaherpesvirinae alt aileleridir (Davison ve ark., 2009; Domingo ve ark., 2008) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Herpesviridae ailesi filogenetik ilişkiler.

H, human; Ce, cercopithecine; Pa, panine; Mc, microtus; Ma, macropodid; Bo, bovine; Su, suid; E, equid; Ga, gallid; Me, meleagrid; Ps, psittacid; Ch, chelonid; Pn, panine; Ao, Aotine; Sa, saimiriine; Tu, tupaiid; Mu, murid; Cav, caviid; Cal, callitrichine; Al, alcelaphine; Ov, ovine; At, ateline (Domingo ve ark., 2008).

Tek tırnaklı hayvanlarda bugüne kadar 11 herpesvirus tanımlanmış olup, bunlar *alphaherpesvirinae* ve *gammaherpesvirinae* alt ailelerinde yer almaktadır (Fortier ve ark., 2010). Alphaherpesviruslardan olan Equine Herpes Virus tip 1

(Equine Abort Virus) atlarda respiratorik enfeksiyon, abort ve nörolojik olgularda izole ve karakterize edilmiş; EHV-4 (Rhinopneumonitis Virus) ise respiratorik enfeksiyon ve abort olgularına ilgili olarak tanımlanmıştır (Patel ve Heldens, 2005). Equine Herpes Virus Tip 3 genital sistem enfeksiyonu (Equine Coital Exanthema Virus) patojeni olarak bilinmektedir (Gleeson ve ark., 1976). Son yıllarda doğal konakçısı kesin olarak bilinmeyen EHV-9 virusu vahşi atlarda tespit edilmiştir. Eşeklerde ise EHV-1 homoloğu (Asinine Herpes Virus tip 3, AHV-3) ve EHV-3 homoloğu (Asinine Herpes Virus tip 1, AHV-1) olan alphaherpesviruslar ile gammaherpesviruslardan olan Asinine Herpes Virus tip 2, Asinine Herpes Virus tip 4, Asinine Herpes Virus tip 5 tespit edilmiştir (Browning ve ark., 1988; Borchers ve ark., 2005 ve Bell ve ark., 2008).

Gammaherpesvirinae alt ailesinde yer alan atlarda enfeksiyon oluşturan viruslar ise Equine Herpesvirus 2 ve Equine Herpesvirus 5'dir. Önceleri cytomegaloviruslarla benzer sitopataloji ve in vitro konakçı spesifisitesi göstermesi sebebiyle betaherpesvirus ailesine dahil edilen bu herpesviruslar, sitopatojenik equine orphan viruslar olarak adlandırılmışlar; daha sonra yapılan sekans analizi çalışmaları EHV-2 ve EHV-5'in antijenik olarak yakın ilişkili viruslar olduğunu ortaya koymuş ve söz konusu bu etkenler gammaherpesvirinae alt ailesi percavirus genusunda sınıflandırılmışlardır (Telford ve ark., 1993; Plummer ve ark., 1969; Davison, 2010) (Çizelge 1.1.). Her iki virusun yanısıra B-hücre lenfoması ve nasofarengeal karsinomaya yol açan Epstein-Barr virusu da içeren gammaherpesvirinae alt ailesi, diğer herpesviridae alt ailelerinde görüldüğü gibi latentlik özelliği gösteren bir alt ailedir (Gleeson ve ark., 1985; Drummer ve ark., 1996; Borchers ve ark., 1999 ve McGeoch, 2011).

Çizelge 1.1. Tüm dizin analizi bilinen gammaherpesviruslar (McGeoch 2011)

Virus Türü	Virus Adı Kısaltması	Genom Büyüklüğü (kbp)	Baz Kompozisyonu (G+C) b	Referans ve aksesyon numarası
Epstein-Barr Virus (Human HV-4)	EBV	154	59 b	Baer ve ark. (1984); VO1555 Parker ve ark. (1990); M35547
Human HV-8 (Kaposi's Sarcoma-ilişkili herpesvirus)	HHV-8 (KSHV)	141	54	Russo ve ark. (1996); U75698 Neipel ve ark. (1997); U93872
Rhesus Rhadinovirus (cercopithecoid HV-17)	RRV	131	52	Searles ve ark. (1999); AF083501 Alexander ve ark.(2000); AF210726
Mouse HV-68 (Murine HV-4)	MHV-4	118	46	Virgin ve ark. (1997); U97553 Nash ve ark.2011); AF105037
Herpesvirus ateles (ateline HV-3)	HVA	108	37	Albrecht (2000); AF083424
Herpesvirus saimiri (saimiriine HV-2)	HVS	113	35	Albrecht ve ark. (1992); X64346
Equine HV-2	EHV-2	149	58	Teldford ve ark. (1995); U20824
Wildebeest herpesvirus (alcephaline HV-1)	AHV-1	131	46	Ensser ve ark. (1997); AF005370

EHV-2, diğer gammaherpesviruslar gibi B lenfositleri latent olarak enfekte etmektedir. Bundan başka üst solunum yolunda, merkezi ve periferel sinir sisteminde, lenf nodüllerinde de etken tespit edilmiştir (Drummer ve ark., 1996; Rizvi ve ark., 1997).

EHV-2 ve EHV-5 biyolojik özellikleri sebebiyle geçici olarak cytomegaloviruslar olarak değerlendirilip (Plummer ve ark., 1969), beta herpesvirinae ailesinde klasifiye edilmiştir. EHV-5'in EHV-2'den ayrımıysa betaherpesvirusların genomik heterojenitesinin araştırıldığı çalışmada gerçekleşmiş, izole edilen 4 suş southern blot hibridizasyonu ve genom büyüklüğü açısından farklılık göstererek yeni betaherpesviruslar olarak tanımlanmışlardır (Browning ve ark., 1987a). Daha sonraları her iki virusun genomlarından elde edilen sekans analizleri EHV-2 ve EHV-5'in kesin bir şekilde gammaherpesviruslar olduğunu ve aminoasit kodlayan 25 EHV-2 ve 28 EHV-5 geninin diğer herpesviruslarla belirgin homoloji gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (Telford ve ark., 1993; Telford ve ark., 1995).

İlk karakterize edilen EHV-2, LK suşu olup linear, çift iplikçikli genom 184,427 bp büyüklüğünde ve %57,7 G+C içeriğine sahiptir. LK suşunun tüm sekansı daha sonra yayımlanmış olup, EHV-2 genomunun araştırılmasıyla bu virusun sahip olduğu ve konakçı immun cevabının aşağı regülasyonuna yol açan interleukin-10'u da içeren birçok genin varlığını ortaya çıkarmıştır (Telford ve ark., 1995). Bu genlerden kemokine reseptörü benzeri E1, E6 ve ORF 74 tarafından G proteini olarak da bilinen üç homolog *hücreyel yedi transmembran reseptör* kodlanmaktadır (Rode ve ark., 1994, Telford ve ark., 1995). EHV-5 ise 179 kbp büyüklüğünde, EHV-2'ye göre daha kısa bir genoma sahip olmakla beraber her iki virusun G+C içerikleri benzerdir. Her iki virusun birçok ortak epitoplari yanı sıra tip spesifik epitoplari da mevcuttur. EHV-2 terminal ve kısa iç tekrarlarina sahipken, EHV-5'e ait tekrarlayan sekans bulunamamıştır (Agius ve ark.,1992; Telford ve ark., 1995).

EHV-2 ve EHV-5 korunmuş sekansları arasında, hem DNA hem de aminoasit seviyeleri arasında %60 benzerlik bulunmakta olup, bu yakınlıkları diğer

herpesviruslara olduğundan daha yüksektir (Gleeson ve Studdert, 1977; Agius ve ark., 1994b). Takacs ve ark. (2001) 20 adet tam sekansı çıkarılmış herpesvirus genomundaki dinükleotid frekansını incelemiş; EHV-2 ve EHV-5’de de CpG dinükleotidlerini diğer gammaherpesviruslardaki gibi eksik bulmuşlardır. TpG ve komplementeri CpA ise rhesus rhadinovirusun iki suşu hariç, diğer lenfotropik gammaherpesviruslarda olduğu gibi fazla bulunmuştur. EHV-5’in tüm genomunun dizin analizi sonucunda tüm herpesviruslar tarafından paylaşılan ve moleküler tanı aracı olarak kullanılabilecek korunmuş bir bölge tespit edilmiştir (Agius ve ark., 1992).

EHV-2 ve EHV-5 genomları, Herpesvirus saimiri (HVS) ve Epstein Barr Virus (EBV) gammaherpesviruslarıyla genetik benzerlik göstermektedir. EHV-2 ile HVS arasında ortalama %52, EHV-2 ve EBV arasında ise %46 aminoasit sekans benzerliği vardır. EHV-5 ile HVS ve EBV arasında ise sırasıyla %51 ve %44 benzerlik bulunmaktadır. EHV-2’nin sekiz proteini HVS ile benzerlik gösterirken sadece bir proteini EBV ile benzerlik göstermektedir (Agius ve Studdert, 1994b).

Herpesvirusların oldukça korunaklı bir bölgesi olan ve iki disülfid bağından oluşan glikoprotein B enfektivite için gerekli olup, virionun füzyonunda rol almaktadır (Pereira, 1994; Holloway ve ark., 1998). Holloway ve ark. (1998), öncelikle EHV-2’nin gB karakterizasyonunu gerçekleştirip gB’nin virion zarında 320 kDa büyüklüğünde bir dimer olarak varolduğunu western blot analizi ile ortaya koymuşlardır. Sonrasında EHV-5 gB’nin sekans analizi ve karakterizasyonunu tamamlamış ve EHV-2 ile aminoasit sekansı karşılaştırmasını gerçekleştirmişlerdir (Holloway ve ark., 1999).

Franchini ve ark.’ın (1997) oligonükleotid primerlerinin kombinasyonuna dayalı olarak yaptıkları çalışmada, PCR reaksiyonu sonucunda EHV-2 spesifik, EHV-5 spesifik ve tek başına ya da diğer iki virusa ait bantlarla beraber oluşan bir fragman gözlemlenmiştir. Bu fragmanı veren dört farklı izolatin klonlanmasını ve takip eden dizin analizi sonucunda EHV-2 delesyon ya da insersiyon mutasyonları tespit edilmiştir. Bu mutasyona uğramış EHV-2’nin bahsedilen üç fragmanın tespit

edildiği bir kültürden plak purifikasyonu da gerçekleştirilmiştir. Bu fragman diğer ürünlerden farklı bir amplifikasyon olup bir PCR amplifikasyonuna bağlı nonspesifik bir bant değildir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar equine gammaherpesvirusların tahmin edilenden daha yüksek heterojeniteye sahip olduğunu göstermiştir.

Equine gammaherpesvirusların heterojenitesinin araştırıldığı bir başka çalışmada Dunowska ve ark. (2000) tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 17 adet Yeni Zelanda EHV-5 izolatu Avustralya prototip suşuyla karşılaştırılarak EHV-5'in genetik değişkenliği araştırılmıştır. Bu amaçla EHV-5 gB geni çoğaltılmış ve restriction fragment length polymorphism tekniği kullanılarak klonlanan PCR ürünleri arasındaki farklılıklar gözlemlenmiştir. Farklı atlardan sağlanan EHV-5 izolatları arasında yüksek heterojenite gözlenirken, aynı attan daha sonra yapılan örneklemelerde homojenite saptanmıştır. Viruslardaki mutasyona bağlı bu heterojenite atların farklı suşlarla enfeksiyonuna yol açmaktadır.

1.2. Epidemiyoloji

EHV-2 enfeksiyonu tespiti, Almanya (Borchers ve ark. 1999), İzlanda (Torfasen ve ark., 2008). İngiltere (Rizvi ve ark., 1997), Avustralya (Reubel ve ark., 1995) Yeni Zelanda (Plummer ve Waterson, 1963), Amerika (Kemeny ve Pearson, 1970), Türkiye (Ataseven ve ark. 2010a) gibi birçok ülkede bildirilmiştir. EHV-2 enfeksiyonu erişkin at popülasyonunda endemik olup, Kemeny, L ve Pearson, JE (1970) atların, kan lökositlerinin %88,7'sinden EHV-2 izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. EHV-2 tüm dünyada gösterdiği yaygınlık, sağlıklı ve semptom gösteren hayvanlardan izole edilebilmesi ve sekonder enfeksiyonlara predispozisyon oluşturması açısından önem arz eden bir etkindir. Üst solunum yolu enfeksiyonuna bağlı ekonomik kayıp yaşayan bir işletmedeki 2-4 aylık tay ve annelerinde yapılan epizootiyolojik bir çalışmada, EHV-2'nin 2 ile 6 aya kadar persiste olarak kaldığı ve yaşlı taylarda viral enfeksiyona bağlı sekonder enfeksiyonların tespitinin daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır (Fu ve ark., 1986). Taylarda yüksek titrelerde maternal antikor bulunmasına rağmen enfeksiyon şekillenebilmektedir (Turner ve

Studdert, 1970; Wilks ve Studdert, 1974; Nordengrahn ve ark., 2001; Bell ve ark., 2006a).

EHV-2 enfeksiyonu dünyada oldukça yaygın olmasına karşın, arap atlarında EHV-2'nin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma vardır (Nordengrahn ve ark. 2002; Amer ve ark. 2011). Amer ve ark. (2011) ilk defa mısır arap yarış atlarında equine herpesvirusları araştırmış, poliklonal antikor havuzu sistemiyle çalışan hücre-ELISA sistemini kullanarak materyaller arasında EHV-1, 2 ve 4'e karşı %36.56 pozitiflik saptamışlardır. Daha sonra pozitif örnekler semi-nested PCR testiyle tiplendirilerek, 3 örnek EHV-1, 17 örnek EHV-2, 7 örnek EHV-4, bir örnekse hem EHV-1 hem de EHV-4 yönünden pozitif olarak tespit edilmiş ve dünyada arap atlarında equine herpesvirus enfeksiyonlarının araştırıldığı ilk çalışma gerçekleştirilmiştir (Amer ve ark. 2011).

EHV-5 dünyanın çeşitli bölgelerinde üst solunum sistemi bulguları gösteren ve göstermeyen 3 aylıktan yetişkin atlara kadar farklı yaşlardaki hayvanlarda burun akıntısı ve organlarda tespit edilmiştir (Agius ve Studdert, 1994; Reubel ve ark., 1995; Borchers ve ark., 1999; Nordengrahn ve ark., 2002; Bell ve ark. 2006; Torfason ve ark., 2008; Herder ve ark. 2012). Fransız atlarında bronkoalveoler ve tracheal lavaj sıvısında varlığı PCR ile gösterilen EHV-5'in İsviçre ve Almanya'da da tespiti yapılmıştır (Franchini ve arkl., 1997; Borchers ve ark., 1999; Fortier ve ark., 2008). Virusun Amerika'da ilk izolasyonu ise 2006 yılında gerçekleştirilmiş olup, 2-6 yaşındaki 47 yarış atından toplanan burun akıntılarında PCR ile %64 oranında pozitiflik tespit edilmiştir (Bell ve ark. 2006).

İtalya'da tesadüfi olarak seçilmiş sağlıklı Lippizzaner atları üzerinde yaşa bağlı EHV-5 prevalansının araştırıldığı bir çalışmada, 4-17 yaşlarında 25; 1-3 yaşlarında ise 30 at örneklenmiş; yaş dağılımının düşük olduğu gruba ait nasal akıntı ve kan örneklerinde prevalans (%73 ve %80) yüksek olan gruba kıyasla (%40 ve %20) daha yüksek olarak belirlenmiştir (Marenzoni ve ark., 2010). Evcil atların yanı sıra vahşi Przewalski atlarında da EHV-5'e karşı seropozitiflik gösterilmiş ve bu atlardan EHV-5 izolasyonu kokültivasyon tekniğiyle gerçekleştirilmiştir (Borchers

ve ark., 1999). Aynı çalışmada EHV-2 ve EHV-5 viruslarının tek bir atta beraber tespiti de gerçekleştirilmiştir. Benzer olarak koenfeksiyon, equine multinodüler pulmoner fibrozis olgusu gösteren 24 atta da tespit edilmiştir (Williams ve ark., 2007). Avustralya’da yarış atı ve damızlık kısıraklarda equine gammaherpesvirusların multipleks PCR tekniği ile sorgulandığı bir araştırmada da %8 oranında koenfeksiyon olgusu saptanmıştır (Reubel ve ark.1995).

Birçok çalışma EHV-5 enfeksiyonunun EHV-2 enfeksiyonuna kıyasla daha düşük prevalansa sahip olduğunu göstermektedir (Borchers ve ark., 1999; Nordengrahn ve ark., 2002; Bell ve ark., 2006; Torfason ve ark., 2008). Bununla birlikte örneklenen populasyonlarda %3 ile %64 arasında tespitleri gerçekleşen EHV-5 daha az sayıda çalışmada EHV-2 enfeksiyonuna kıyasla daha yüksek oranda tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2007; Diallo ve ark., 2008; Fotier ve ark. 2009; Richter ve ark., 2009; Ataseven ve ark., 2010). Bazı bilim adamları EHV-5’in prevalansının düşük olmasının alternatif bir hücre rezervuarının varlığıyla ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (Reubel ve ark., 1995). Bununla birlikte EHV-5 izolasyonu son yıllarda yaygınlık göstermiştir (Borchers ve ark. 1999; Dunowska ve ark. 1999; Dunowska ve ark., 2000; Bell ve ark. 2006).

1.3. Patogenez ve Klinik Semptomlar

EHV-2 enfeksiyonu immünsüpresyon, yarış atlarında verim düşüklüğü, lenfadenopati, keratokonjunktivit, faranjit, oral mukozada ülseratif lezyonlar ve üst solunum yolu semptomları ve aborta yol açmakta olup, tay ve atlardan izole edilmiştir (Thein ve Böhm, 1976; Kershaw ve ark., 2001, Nordengrahn ve ark., 1996; Borchers ve ark. 2002; Allen and Murray, 2004; Galosi ve ark., 2005; Vengust ve ark., 2008). Son yapılan çalışmalar taylarda görülen ateşin lenfositosisiz, lenfosit morfolojisindeki değişiklikler, sitokin ekspresyonu ya da viral yük ile ilişkili olmadığını, fakat periferik kan mononükleer hücrelerin EHV-2 spesifik cevabıyla ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur (Braut ve ark. 2010). EHV-2 enfeksiyonunun patogenezinin tam olarak bilinmemesi tüm dünyadaki at popülasyonunda her an ve

çok yaygın olarak görülmesinden kaynaklanmaktadır (Allen ve Murray, 2004). EHV-5 enfeksiyonu ile ilişkili klinik semptomlar daha az bilinmesine karşın, bu enfeksiyon üst solunum yolu semptomları, ateş, faranjit, genişlemiş lenf nodülleri ve multinodüler fibrosiz olgularına yol açmaktadır. (Franchini ve ark., 1997; Williams ve ark., 2007; Hart ve ark., 2008, Verryken ve ark. 2010). Son yıllarda hem EHV-2 hem de EHV-5'in dermatit olgularında da tespiti gerçekleştirilmiştir (Sledge ve ark., 2006; Herder ve ark. 2012).

Hücre kültürlerindeki üreme karakteristikleri ayırt edilemeyen EHV-2 ve EHV-5, sağlıklı atlarda da tespit edilebilmekte olup, tüm dünyada yüksek prevalansa sahiptirler (Nordengrahn ve ark. 2002; Diallo ve ark. 2008, Reubel ve ark., 1995). Atlarda durgunluk, seröz-mukopurulent nazal akıntı, şişkin lenf nodülleri, öksürük ve hafif ateşle seyreden ve morbiditesi %100'e ulaşan salgınlara yol açmaktadırlar (Fu ve ark., 1986., Dunowska ve ark. 2002). Bu iki gammaherpesvirus yaşa bağlılık göstermeyerek atlarda dermal ve pulmoner semptomlara yol açabilmektedir (Sledge ve ark., 2006; Williams ve ark., 2007; Soare ve ark., 2011; Herder ve ark. 2012).

EHV-5 son zamanlarda yapılan bir çalışmada, Kuzey Almanya'da bir aygırda her iki gözün çevresi, ağız kenarı ve burun çevresinde bir yıldır süren ve intranükleer inklüzyon cisimciklerinin gözlemlendiği deri lezyonunda tespit edilmiştir. Bu çalışma EHV-5 ile ilişkili dermatitise yönelik ilk çalışma olup, insanlarda görülen herpesvirus ilişkili eritema multiforma ile benzerliği vurgulanmıştır (Herder ve ark. 2012).

EHV-2'ye yönelik olarak yapılan deneysel bir çalışmada virus semptom şekillendirmeden ya da hafif üst solunum yolu semptomları gözlenen enfeksiyona neden olmuştur (Borchers ve ark., 1998). Özellikle genç taylarda daha yaygın olarak görülen EHV-2 aynı zamanda persiste enfeksiyon şekillendirebilmekte, persiste enfekte bir at genetik olarak farklı olan başka bir EHV-2 suşu ile yeniden enfekte olabilmektedir (Blakeslee ve ark. 1975; Browning ve Studdert, 1987a; Drummer ve ark., 1996).

Lökosit, lenfoid doku, trigeminal ganglia, merkezi ve periferel sinir sisteminden izole edilebilen EHV-2'nin *Strep. zooepidemicus*, *S.equi* gibi bakteriler ve alphaherpesviruslar (EHV-1 ve EHV-4) ile dual enfeksiyonlarını bildiren çalışmalar vardır (Dynon ve ark., 2001, Edington ve ark., 1994, Rizvi ve ark.1997). EHV-2 transaktivatörlerinin EHV-1 gen ekspresyonunu modüle edebildiği bilinmektedir (Purewal ve ark., 1992). Ayrıca taylor için şiddetli seyreden *R. equi* patojeninin üst solunum yolu mukozasına invazyonunda predispoze faktör olarak rol oynamaktadır (Nordengrahn ve ark., 1996). Nitekim Banbura ve ark. (2004) 3 atta bakteriyel nedenli solunum sistemi enfeksiyonu ve nörolojik bozuklukların şiddetinin belirlenmesinde EHV-2'nin önemli rol oynadığını belirtmişlerdir.

EHV-2, primer enfeksiyondan sonra B-lenfositlerde kalarak, latentlik şekillendirebilmekte olup, B lenfositlerdeki IL-10 ve G proteininin viral üretimi latent virusun reaktivasyonunda rol oynamaktadır (Drummer ve ark., 1996). EHV-2 periferel sinir sisteminde (%50) merkezi sinir sistemine oranla (%11) daha yüksek oranlarda tespit edilebilmektedir. Bu nedenle, trigeminal ganglionun nazal epiteli innervasyonu da göz önünde bulundurularak, bu ganglionun EHV-2'nin latentliğinde biyolojik olarak önemli olabileceği düşünülmüştür (Rizvi ve ark., 1997).

Fu ve ark. (1986) tarafından EHV-2 enfeksiyonu epizootiyolojisinin araştırıldığı bir çalışmada üst solunum yolu hastalıklarına bağlı olarak ekonomik kayıplar görülen bir işletmedeki safkan taylor örneklenmiştir. Seçilen 16 çift anne ve tайдan 2-4 aylık olanların hepsi EHV-2 ile enfekte olmuşlar; yapılan ELISA testiyle serolojik olarak pozitif bulunmuşlardır. EHV-2 enfeksiyonu bu taylorlarda 2 ile 6 ay arasında kalıcı ya da aralıklı olarak virus saçılımına yol açarak persistans göstermiştir. Persiste enfeksiyon EHV-2'ye karşı devamlı antikor üretilmesine yol açmakta; 5. ve 6. aylarda antikor seviyesi en üst düzeye ulaşmaktadır (Fu ve ark. 1986). Ayrıca primer hamster embriyo hücrelerinin de invitro olarak EHV-2 ile persiste enfekte olabilecekleri gösterilmiştir (O'Callaghan ve ark., 1981; Staczek ve ark., 1984).

EHV-2'nin sağlıklı atlardan izole edilmesi virus izolasyonu ve klinik semptomlar arasındaki ilişkinin incelenmesini güçleştirmektedir. Ayrıca EHV-2 antikorlarının, EHV-2 enfeksiyonuna karşı koruma sağlamadığı; onun yerine varolan EHV-2 yükünü yansıttığı görülmüştür (Wilks ve Studdert 1974; Gleeson ve Coggins 1985).

1.4. Teşhis

EHV-2 ve EHV-5 viruslarının tanısında DNA amplifikasyonuna dayalı yöntemler, hücre kültürü teknikleri, elektron mikroskop ve serolojik metotlardan faydaniılmaktadır.

Franchini ve ark.'ın (1977) yaptıkları bir çalışmada, equine gammaherpesvirusların tespitinde kullanılan en güvenilir metodun kan hücrelerinin duyarlı hücrelerle kokültivasyonu olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmada izolasyon amacıyla kokültivasyonu yapılan örneklerin işlem öncesi bir kısmından DNA ekstrakte edilmiş, fakat yapılan PCR sonrasında gammaherpesvirusların tespiti gerçekleştirilememiştir. Buna karşın ilerleyen pasajlarda virus izole edilmiştir (Franchini ve ark. 1997). Nitekim hem EHV-2 hem de EHV-5 için 3-4 pasaj sonrası virus miktarı artacağından PCR ile tespitin bu aşamada yapılması direkt olarak izolasyon materyaline uygulanmasından daha başarılı bulunmuştur (Wang ve ark., 2007). Equine gammaherpesvirusların kanda yüksek oranda tespit edilmesine karşın EHV-2'nin burun akıntılarında da yüksek miktarda tespiti ve tayların yaşları arasında ilişki gözlenmiştir. Üç aylık taylara ait burun akıntılarında en yüksek miktarda viral DNA tespiti gerçekleştirilmiştir (Brault ve ark. 2010).

EHV-2'nin teşhisi amacıyla equine dermal, equine fetal kidney, equine fibroblast ve RK-13 kullanılan hücre hatlarıdır (Plummer ve Waterson, 1963; Hsiung ve ark., 1969; Fu ve ark. 1987; Gleeson ve Coggins, 1985; Franchini ve ark. 1997; Borchers ve ark. 1999). EHV-5 izolasyonu amacıyla da equine dermal, primer fotal at böbrek, tavşan böbrek ve vero hücre kültürleri kullanılmaktadır (Borchers ve ark. 1999;

Dunowska ve ark. 2000; Bell ve ark., 2006a; Ataseven ve ark. 2010). Bir çalışmada toplanan burun akıntıları ve lökositler equine fetal böbrek, tavşan böbrek ve vero hücre hücre kültürlerine inokule edilerek sitopatolojik etki gözlenmiştir. İzolatlar PCR testine tabi tutularak EHV-5 olarak karakterize edilmiştir (Dunowska ve ark. 2000).

EHV-2 ve EHV-5 yakın antijenik ilişkileri sebebiyle bu iki virus kros reaksiyon vermekte olup, serolojik ayrımı çok zayıftır (Telford ve ark., 1993, Agius ve ark., 1994). Bu nedenle geniş spektrumlu antikor testleriyle ayrımı yapılamadığından gammaherpesviruslar olarak tanımlanırlar. EHV-2 ve EHV-5 proteinleri arasındaki kros reaksiyon ve immunojeniteyi araştırmak amacıyla western blot ve ELISA testleri uygulanmış ve testler sonunda iki virusun tip spesifik epitoplarla beraber bir çok ortak epitop paylaştıkları ortaya çıkmıştır (Agius ve ark., 1994). EHV-2'nin serolojisinde kullanılan bir diğer yöntem bloklayıcı ELISA testidir. Monoklonal antikor temelli test, taylarda şekillenen akut enfeksiyonları başarılı bir şekilde tespit etmektedir (Nordengrahn ve ark., 2001). Amer ve ark.'da (2011) hücre ELISA yöntemiyle, poliklonal antikor havuzu yardımıyla EHV-1, EHV-2 ve EHV-4 tespitleri gerçekleştirmişlerdir.

Deneyssel olarak EHV-2 LK suşuyla beş atın enfekte edildiği bir çalışmada, iki tayda kronik faranjit gözlenmiş, enfekte hayvanlardan elde edilen virusun EHV-2 ile ilişkili olduğuna büyüme karakteristikleri, cpe, inkluzyon cisimciği oluşumu, eter duyarlılığı ve immunfloresans analizler yapılarak karar verilmiştir. Yetişkin atlarda yapılan komplement fiksasyon ya da virus nötralizasyon testinde antikor cevabı gözlenmemekle birlikte kronik faranjit tespiti yapılan iki tayda komplement fiksasyon antikor titresinde artış görülmüştür. Nötralizasyon testinde ise sadece taylardan birinde antikor titresinde artış saptanmıştır (Blakeslee 1975). Yapılan bir başka serum nötralizasyon testinin titreleri ile latent enfekte hücre oranları direkt olarak ilişkili bulunmuştur (Gleeson ve Coggins, 1985).

Equine gammaherpesvirusların tespitinde ve prevalansının belirlenmesinde kullanılan diğer bir test de hassas bir yöntem olan PCR'dır. Periferik kan

mononükleer hücrelerinde ve burun akıntılarında viral DNA tespiti PCR testi ile gerçekleştirilmiştir (Reubel ve ark., 1995; Franchini ve ark., 1997; Dynon ve ark., 2001; Nordengrahn ve ark., 2002; Bell ve ark. 2006a; Wang ve ark., 2007). En çok çalışılan gen bölgesi glikoprotein B (gB) olmasına karşın glikoprotein H (gH) de oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok araştırmacı virus tespitinde güvenilirliği arttırmak amacıyla her iki gen bölgesine yönelik primerlerle de virusun amplifikasyonunu önermektedirler (Nordengrahn ve ark., 2002; Bell ve ark., 2006a; Marenzoni ve ark.2010). EHV-5 virusunun timidine kinaz gen bölgesi de PCR’da amplifikasyonu tercih edilen gen bölgelerindendir (Reubel ve ark. 1995). Aynı zamanda virusun korunmuş bölgelerinden olan IL-10 benzeri protein geni ve ORF64’e yönelik çalışmalar da bulunmaktadır (Borchers ve ark., 1997; Rizvi ve ark., 1997).

Herpesvirus DNA polimeraz geni PCR reaksiyonuyla tespiti yapılan gen bölgelerinden birisidir. Equine gammaherpesviruslar ile equine multinodüler fibrozis ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Williams ve ark., 2007) DNA polimeraz gen bölgesi amplifikasyonu temeline dayalı olarak enfekte atların %79.2’si, kontrol grubunun ise %8.7’si pozitif bulunmuştur. Yine aynı gen bölgesi, hayvanat bahçesi ve vahşi doğadaki equidealarda herpesvirusların tesptinin gerçekleştirilebilmesi amacıyla kullanılmıştır. Zebra, vahşi eşek ve tapire (yakın akrabası at ve gergedan olan memeli) ait kan örneklerinde konsensus PCR analizi sonucunda elde edilen amplikonlar gammaherpesvirusların DNA polimeraz genleriyle yüksek oranlarda (%50) sekans benzerliği göstermişlerdir. Vahşi eşek ve zebra sekansları EHV-2 ve EHV-5 ile %80 sekans benzerliği göstermiştir (Ehlers ve ark., 1999).

Hassas ve spesifik bir test olan multipleks PCR da bu iki gammaherpesvirus amplifikasyonunda kullanılan yöntemlerden olup, Avustralya’da bulunan yarış atlarında ve Türkiye’de üst solunum yolu semptomu gösteren atlarda EHV-2 ve EHV-5 tespiti için kullanılmıştır (Reubel 1995; Dynon ve ark., 2001; Wang ve ark. 2007; Ataseven ve ark. 2010). Metot daha az iş gücü gerektirmesi ve daha az reaksiyon bileşimi kullanılmasını sağladığı için tercih edilmektedir. Son yıllarda

sınırlı sayıda araştırma olsa da EHV-2 tanısında kullanılmaya başlayan bir diğer yöntem ise real-time PCR'dır (Brault ve ark. 2010; Dunowska ve ark. 2011).

EHV-5'in equine multinodüler fibrozis olgusu gösteren atlarda tespitini göstermek amacıyla in situ hibridizasyon testinden faydalanılmıştır. Bu amaçla gH gen bölgesine spesifik dioxigenin işaretli oligonükleotid problemler kullanılmıştır (Williams 2007).

Elektron mikroskopi her iki virusun teşhisinde kullanılmakta olup, negatif kontrast elektron mikroskopide tipik herpesvirus morfolojisi gözlenmektedir. Virusla ilişkili intranükleer ve intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri tespit edilebilmektedir (Plummer ve Waterson, 1963; Bell ve ark., 2006a; Sledge ve ark. 2006; Williams ve ark. 2007).

1.5. Bağışıklık

Atlarda yaygın olarak seropozitif tespit edilen EHV-2 ve EHV-5 kros reaksiyon gösteren gammaherpesviruslardır (Agius ve ark. 1994). Süt emen tayların kan serumlarında bulunan EHV-2 maternal antikorlar ilk iki ay azalırken, bu dönemin sonunda başlayan antikor üretimi 5-6. ayda en üst seviyeye ulaşır (Fu ve ark., 1986; Fu ve ark., 1987). Taylarda EHV-2 prevalansının araştırıldığı bir çalışmada, 2-7 ay aralıkla iki örnekleme gerçekleştirilmiş; ilk örnekleme zamanında antikor saptanamayan bir tay, ikinci örneklemede EHV-2 spesifik antikor yönünden pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu tay dışında her iki örneklemede de diğer tüm taylarda antikor varlığı pozitif olarak tespit edilmiştir. 1 ile 7 aylık taylara uygulanan virus nötralizasyon testi titrelerine ait regresyon analizleri, antikor titrelerinin yaş ile pozitif ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Murray ve ark. 1996).

Dunowska ve ark.'ın (2011) safkan atlarda EHV-2 kinetiğini araştırdığı bir çalışmada ve Brault ve ark.'ın (2010) 5 ay boyunca takip ettikleri 9 taydaki EHV-2 viral yüklerine benzer şekilde EHV-2 viral yükü 1 ve 2 aylık taylarda az farkla daha

yüksek olarak tespit edilmiştir. Her iki çalışma tayların büyük çoğunluğunun hayatlarının ilk iki ayında EHV-2 ile enfekte olduğunu göstermiştir. Enfeksiyon tespit edilen aynı grubun içinde büyük olasılıkla maternal antikor barındıran 2-4 günlük taylarda bulunmaktadır (Dunowska ve ark. 2011). Bu çalışmaya benzer şekilde 2 haftalık tayların örneklediği bir çalışmada (Murray ve ark., 1996) 27 taydan 10'u EHV-2 pozitif tespit edilmiş yine birçok çalışmada 1 aylık taylardan EHV-2 izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Fu ve ark., 1986; Nordengrahn ve ark., 2002; Bell ve ark., 2006b; Brault ve ark., 2010). Yapılan bu çalışmalar maternal antikorların tayları EHV-2 enfeksiyonuna karşı korumadığını göstermiştir.

Equine gammaherpesviruslara karşı IgG alt sınıf cevabına ilişkin bu güne kadar bildirilen tek bir çalışma bulunmakta olup, 1/800 dilusyonunda IgG3/5, IgG1 titresine göre daha yüksek bulunmuştur. 7 erişkin, 2 adet 10 aylık tay IgG3/5 yönünden pozitif bulunmuş olup, genç taylar değişen titrelerde çoğunlukla IgG4/7 ile cevap vermişlerdir (Svansson ve ark., 2009). EHV-2'nin biyolojik özellikleri üzerine yapılan moleküler çalışmalarda (Purewal ve ark., 1992; Purewal ve ark., 1993) EHV-2'nin, EHV-1 ve EHV-4 virus replikasyon ve regülasyonunda rol oynayan immediate early genlerini modüle ettiği gösterilmiş, EHV-1, EHV-2 ve HHV-1'in IEG arasında homoloji bulunmuştur.

1.6. EHV-2 ve EHV-5 Enfeksiyonlarının Türkiye'deki Durumu

Türkiye'de equine alfa herpesviruslara yönelik çalışmalar (Gür ve Yapıcı 2008; Ataseven ve ark. 2009, Ataseven ve ark. 2010b) bulunmasına karşın EHV-2 ve EHV-5 enfeksiyonu ile ilgili çalışmalar (Ataseven ve ark., 2010a) sınırlı sayıdadır. İlk defa 2009 yılında equine herpesvirusların sorgulanması amacıyla yapılan çalışmaya ait bir bildiride, EHV-1 ve EHV-4'ün yanı sıra EHV-2 ve EHV-5 tespitleri de bildirilmiştir (Bilge-Dağalp ve ark., 2009).

Bunun dışında Türkiye’de equine gamaherpesvirusların sorgulandığı tek çalışma 2010 yılında yayınlanmıştır (Ataseven ve ark., 2010a). Üst solunum yolu semptomu gösteren atların örneklendiği söz konusu çalışmada, EHV-2 ve EHV-5 viruslarının yaygınlığı multipleks nested PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Tanı materyalleri olarak kan ve burun akıntılarının kullanıldığı bu çalışmada 127 adet materyalin %19,2’si EHV-2; %21,9’u ise EHV-5 yönünden pozitif bulunmuştur. Pozitif bulunan örneklerden 6 adet EHV-2, 3 adet de EHV-5 suşunun sekans analizi gerçekleştirilmiş, fonksiyonel olmayan gB gen bölgesi filogenisi Avrupa şuşlarından belirgin farklılık göstermiştir.

Bildirilen çalışmada iki EHV-2 izolatu (EHV-2-TR-L1-1 ve EHV-2-TR-L1-3) Sharp ve ark. (2007) tarafından tanımlanan 1. altgrup içersine dahil edilmiş; sekansı çıkarılan diğer dört izolat (EHV-2-TR-NS28, EHV-2-TR-NS3, EHV-2-TR-NS41, ve EHV-2-TR-NS46) Avrupa şuşlarından belirgin bir şekilde farklı bulunarak 2. altgrup içerisinde ayrı bir dalda yer almıştır. EHV-2 ve EHV-5 gB genlerinin sekans karşılaştırmaları kendi içlerinde ve Avrupa şuşları arasında heterojenite göstermiştir (Ataseven ve ark., 2010a).

Bu alışmada, Türkiye’de varlığı, yaygınlığı konusunda sınırlı sayıda araştırma (Bilge-Dağalp ve ark., 2009; Ataseven ve ark., 2010a) ile bilgi sahibi olduğumuz, ancak arap atı yetiştiriciliğinde önemli yetiştirici durumda olan işletmelerde bulunan arap yarış atlarındaki varlığı/yaygınlığı konusunda herhangi bir bildirim bulunmayan, EHV-2 ve EHV-5 enfeksiyonlarının prevalansının, solunum sistemi enfeksiyonu klinik bulguları gösteren ya da bu hayvanlar ile aynı işletmede yetiştirilen tay ve erişkin atlardan alınan kan, burun ve gözyaşı akıntısı örnekleri kullanılarak belirlenmesi, EHV-5 enfeksiyonunun tanısı için hızlı ve güvenilir bir yöntem olan TaqMan real time PCR tekniği geliştirilmesi ve yapılması planlanan moleküler karakterizasyon ve aşı geliştirme çalışmaları için saha viruslarının izolasyonu hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Hücre Kültürü

Kontrol virusların üretilmesinde ve test materyallerinden (kan, burun ve gözyaşı akıntısı) virus izolasyonu çalışmasında Equine Dermal ve Rabbit Kidney-13 hücre hatları kullanıldı. Söz konusu hücre hatları Freie Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Enstitüsü hücre koleksiyonu Berlin, Almanya'dan sağlandı.

EHV-2 ve EHV-5 saha izolatlarının üretilmesi amacıyla hücre kültürlerinde idame vasat olarak; 25000 U/ml Penisilin ve 20 mg/ml Streptomisin ve %10 Fötal Dana Serum (FDS, Biochrom, Almanya) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biochrom, Almanya), virus üretme vasatı olarak ise %2 FDS içeren DMEM kullanıldı.

2.1.2. Referans Viruslar

Araştırma kapsamında yapılan tip spesifik PCR ve TaqMan real time PCR uygulamalarında referans viruslar olarak Freie Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Enstitüsü virus koleksiyonundan temin edilen EHV-2 T400 ve EHV-5 P48 suşu kullanıldı.

2.1.3. Tanı Materyalleri

Araştırma kapsamında Türkiye ve Ortadoğu'da Arap atı yetiştiriciliğinde önemli yetiştirici durumunda olan 3 işletmedeki klinik olarak üst solunum sistemi enfeksiyonu bulguları gösteren ve bu hayvanlar ile birlikte barındırılan toplam 165

attan (tay ve erişkin atlar) alınan burun, gözyaşı akıntısı ve kan örnekleri olmak üzere toplam 495 materyal kullanıldı. Örneklenen 165 at; 17 aygır, 5 emziren kısırak, 49 kısırak, 61 (1-3 yaşlarında) tay ve 33 süt emen taydan oluştu. Araştırmada kullanılan tanı materyallerine ait bilgiler Çizelge 2.1’de sunuldu. Tanı materyallerinin tümünde EHV-2 ve EHV-5 enfeksiyonları nested PCR ile araştırılırken, virus izolasyonu için 165 adet kan örneğinin ED ve RK-13 hücre kültürleriyle kokültivasyonu gerçekleştirildi. Ayrıca nested PCR testiyle 17’si pozitif, 34’ü negatif olarak belirlenen toplam 51 örnek ise bu araştırma kapsamında geliştirilen real time PCR testinde kullanıldı.

Sözkonusu üç işletmede zaman zaman özellikle genç yaştaki hayvanlarda solunum sistemi bulguları gözlemlendiği bildirilmiş; bu işletmelerde solunum sistemi enfeksiyonu ajanlarından *R. equi* tespitleri yapıldığı işletme yetkililerinden öğrenilmiştir.

Çizelge 2.1. Araştırmada örneklenen at popülasyonuna ait bilgiler

İşletme No		I	II	III	Toplam
Yer		Eskişehir	Malatya	Bursa	
	Aygır	5	5	7	17
Materyal Sağlanan	Kısırak	9	15	30	54
At Popülasyonu	Tay	26	20	15	61
	(1-3 yaşında)				
	Süt emen Tay	5	13	15	33
Toplam		45	53	67	165

Bu çalışmada materyal temini Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun 06/01/2010 gün ve 2009-266 nolu kararı kapsamında gerçekleştirildi (Ek 2).

2.1.4. Dana serumu

Virus izolasyonu ve hücrelerin üretilmesinde ticari olarak temin edilen f tal dana serumu (FDS, Biochrom S-0113, Almanya) kullanıldı.

2.1.5 Nested PCR

Çalışmada tip spesifik i  ve dış nested PCR primerleriyle pozitif saha örneklerinin tespit edilebilmesi amacıyla Taq Polimeraz Enzimi (MBI, Fermentas, Lithuania) PCR protokolleri Biometra  Thermocycler, Thermal Cycler PTC 200, Thermal Cycler (Techne) TC-3000 marka cihazlarda gerçekleştirildi ve sonuçların görüntülenmesinde 100 bp DNA merdiveni (MBI, Fermentas, Lithuania) kullanıldı.

Araştırmada nested PCR ile EHV-2 ve EHV-5 tanısı için kullanılan gB genine yönelik olarak tasarlanan primer dizinlerine ilgili bilgiler  izelge 2.2’de sunuldu.

Çizelge 2.2. EHV-2 ve EHV-5 Tip Spesifik Nested PCR’da kullanılan primerler

Virus	Prosedür	Primer (5' → 3')*	Lokasyon (bp)	Ürün büyüklüğü (bp)	Referans
EHV-2	1.TUR				
	Fw	ATCAACCCCACCAGCGTCA	33677 - 33697		Borchers et al 2006
	Rev	TTTTTACTTCTTCCTCTCGTC	34605 - 34625	947	
	2.TUR				
	Fw	CCCAGGAACGAGATTGTGCT	33899 - 33919		Borchers et al 2006
	Rev	GCTATGATGAGGACTATGAG	34391 -34411	512	
EHV-5	1.TUR				
	Fw	CAGACTATGGTGTGGGG	897 - 924		Agius et al 1994
	Rev	GCTGGCCACGTTCACTA	2224 - 2241	1328	
	2.TUR				
	Fw	GGACCAAGAGAGCGTGTGTTGTG	1681 - 1722		Agius et al 1994
		TCCCCCAAGAACTGGATAAAGC		492	
	Rev		2172 - 1294		

2.1.6. EHV-5 TaqMan Real Time PCR ve Klonlama

Çalışmada EHV-5 TaqMan real time PCR yöntemiyle virusun tespitine yönelik primer ve prob tasarlanmasında Primer Express Software v3.0 (Applied Biosystems, ABD) programından yararlanıldı ve virusa spesifik Minor Groove Binding TaqMan probe sentezletirildi. Probe 5’ ucunda VIC, 3’ ucunda ise nonfluorescent quencher (NFQ) boya ile işaretlendi. Standart eğri oluşturulması amacıyla vektör primerler ve Taq polimeraz enzim (Fermentas, Lithuania) aracılığıyla elde edilen EHV-5 PCR ürünü ve spesifisite reaksiyonunda kullanılması planlanan EHV-2 PCR ürünleri plazmide klonlandı (pGEM-T Easy Vector System Promega, ABD). Araştırmada

EHV-5 real time PCR tanısı ve klonlanması amacıyla kullanılan primer ve probe dizinlerine ilgili bilgiler Çizelge 2.3’de sunuldu.

EHV-5 pozitifliği araştırılan saha örnekleri Applied Biosystems7500/7500 Fast Real-Time PCR Sisteminde Perfecta qPCR superMix (Quanta Biosciences, ABD) kullanılarak Real-time PCR reaksiyonuna alındı.

Çizelge 2.3 EHV-5 TaqMan real time PCR ve klonlamada kullanılan probe ve primerler

Virus	Primer (5' → 3')	Lokasyon (bp)	Ürün büyüklüğü (bp)
	VIC-NFQ		
EHV-5 Fw	TCGCTGCCATTGACAAACTTGA	1649-1670	
EHV-5 Rev	TGGACCAAGAGAGCGTGTTTG	1565-1585	63
EHV-5 Probe	CCCGGGACCCTTAG	1597-1610	
EHV-5 Vector	CAGACTATGGTGTGGGG	897 - 924	
Primer Fw			1328
EHV-5 Vector	GCTGGCCACGTTCACTA	2224 - 2241	
Primer Rev			

2.2. Yöntem

2.2.1. Test materyallerinin hazırlanması

Sitratlı tüplere (K_3EDTA , Greiner bio-one, Almanya) alınan kanlardan 1.077g/ml yoğunlukta izotonik Biocoll solüsyonu (Biochrom AG) yardımıyla periferik kan mononükleer hücreleri elde edildi. Bu amaçla plazma uzaklaştırıldıktan sonra kan hücrelerinin üzerine toplam hacim 10 ml olacak şekilde phosohate buffer saline (PBS) ilave edildi. Eşit miktarda Biocoll (10 ml) ve kan (10 ml) kullanılarak birbirine karışmayacak tek katmanlı bir tabaka haline getirildi. Karışım 1900 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) toplandı ve 1500 rpm’de 5 dakika süreyle PBS ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından süpernatant atıldı ve pellet haline getirilen kan hücreleri 2 ml PBS ile sulandırılıp 2 ayrı 1 ml’lik tüpe bölündü. Tüplerin biri kokültivasyon yönteminde kullanılırken diğeri ise 1000 rpm’de santrifüj edildikten sonra, süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından PCR’da kullanılmak üzere $-20^{\circ}C$ ’de saklandı.

Gözyaşı ve burun akıntıları örnekleri ise, 3000 rpm’de santrifüj edilmelerinin ardından PCR’da kullanılmak üzere $-20^{\circ}C$ ’de bekletildi.

2.2.2. Virus izolasyonu

Kan örneklerinin virus izolasyonu için hazırlanmasından 2-3 saat önce ED ve RK-13 hücreleri ($1 \times 10^5/ml$) 6 gözlü tabletlere her bir gözde 4 ml olacak şekilde konuldu. Biocoll solüsyonu yoğunluk farkıyla kanlardan periferik kan mononükleer hücreleri hazırlandı ve tryphan blue (%0,4) ile boyanarak canlı lenfosit hücreleri sayıldı [200’lük büyütme (10X20) (Olympus CKX41)]. Daha sonra hazırlanan lenfositler her bir tablet göz için ED ve RK-13 hücreleriyle aynı miktarda olacak şekilde (toplam 4×10^5 hücre) kokültivasyon için ayrıldı. Lenfositler hücre kültürlerine konulmadan önce tablet gözlerinden 3 ml hücre sıvısı alındı. Bu şekilde lenfositlerin ED ve RK-13 hücreleriyle kontakt kurması sağlandı. Bu şekilde 1 gün $37^{\circ}C$ ’de %5 CO_2 ’li

etüvde inkube edildi ve ertesi gün üzerlerine 3 ml vasat ilave edildi. Ekim yapılan hücreler dört gün arayla 3 kez pasajlandı. Her ekime ait pasaj sıvıları saklandı ve CPE görülen gözler 25 cm²'lik hücre kültürü şişelerine geçildi. Ekim yapılmış hücre kültürlerinin %80'inde CPE görülmesini takiben, hücre kültürleri 3 kez -80°C'de dondurulup 37°C lik su banyosunda hızla çözündürölme işlemi uygulandı. Kültür sıvıları +4°C de, 3000 rpm' de, 20 dakika santrifüj edilmelerinin ardından porsiyonlanarak -80°C'ye kaldırıldı. Daha sonra izolatların identifikasyonu işlemi, 2.2.3'de tanımlanan şekilde, Nested PCR yöntemi ile yapıldı.

2.2.3. Nested PCR

2.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu

Eskişehir'de yerleşik işletmede bulunan atlardan sağlanan gözyaşı ve burun akıntısı örnekleri için Sambrook ve ark. (1989) tarafından tanımlanan DNA ekstraksiyon metodu; Bursa ve Malatya'da bulunan işletmelerden sağlanan tüm materyaller ve Eskişehir'den sağlanan kan örnekleri için Viral Nükleik Asit kiti (High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Roche, Almanya) yardımıyla ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi.

Kit yardımıyla yapılan ekstraksiyon metodunda 200 µl klinik örnek üzerine, içerisine poly (A) ve proteinase K ilave edilmiş 200 µl bağlayıcı solüsyon konuldu. Hızla karıştırılmalarının ardından 10 dakika 72°C'de inkube edildi ve inkubasyon süresinin sonunda tekrar 100 µl bağlayıcı solüsyon ile karıştırıldı. High Pure filtre tüplere alınan karışım 8.000 x g' de 1 dakika süreyle santrifüj edildi ve santrifüj sonunda toplama tüpünde biriken sıvı dökülerek üzerine 500 µl uzaklaştırıcı solüsyon eklendi. Tüp 8.000 x g' de 1 dakika süren santrifüjün ardından iki kez 450 µl yıkama solüsyonu kullanılarak yıkandı ve en yüksek hızda 10 sn süreyle santrifüj edildi. Toplama kabı atıldı ve 1.5 ml'lik tüpler (Greiner Kat No:616201) içerisine yerleştirilen filtrelere 50 µl elüsyon solüsyonu konularak, 8.000 x g' de 1 dakika süreyle santrifüj edilmelerinin ardından elde edilen DNA'lar nested ve real-time PCR reaksiyonlarında kullanılmak amacıyla -20°C'de saklandı.

Konvansiyonel ekstraksiyon metodunda 300µl klinik örnek ve 300 µl solüsyon D (4.2 M Guanidin tiyosiyonat, 0.75M Sodyum Sitrat dihidrat, 0.33M N-Lauril sarcosin ve 360 µl 2-merkaptoetanol) karışımı 1.5 ml’lik tüp (Greiner Bioone Kat No:616201) içerisinde biraraya getirildi ve 10-15 saniye vorteks (Hedolph, Almanya) ile karıştırıldı. Karışımın üzerine 325 µl alkali fenol (pH 4), 325 µl kloroformizoamilalkol [Ch/IsoA (24:1)] ilave edildi ve homojen bir karışım elde edilene kadar 15 saniye süre ile karıştırıldı. Tüpler masaüstü santrifüjde, oda ısısında, 12000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan 3 fazın en üst fazından 700 µl yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine eşit hacimde -20°C’ye soğutulmuş 2-izopropanol ve 100 µl 3 M sodyum asetat (pH 5.2) ilave edildi ve karıştırıldı. Nükleik asit presipitasyonu için karışım en az 1 saat süre ile -80°C de bekletildi. Süre sonunda donmuş olan karışımlar oda ısısında eritildikten sonra, 14000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Çöken DNA pelleti, %70’ lik etanol ile yıkandı ve 37°C’ lik etüvde kurutuldu. Kurutulan pelletler 20 µl deiyonize su (18Mohm/cm, Applichem, Almanya) ile çözüldü. Elde edilen DNA’lar öncelikle nested daha sonrasında da real-time PCR reaksiyonlarında kullanılmak amacıyla -20°C’de saklandı.

2.2.3.2. Nested PCR Spesifisite

Çalışma için tasarlanan EHV-2 ve EHV-5 primerlerinin spesifikliğini kontrol etmek amacıyla EHV-2 viral DNA ile birlikte EHV-5, EHV-1, EHV-4 viruslarının DNA’ları ve EHV-5 viral DNA ile birlikte EHV-2, EHV-1, EHV-4 viruslarının DNA’ları Borchers ve ark. (1999) tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek nested PCR reaksiyonuna alındı (Çizelge 2.4).

2.2.3.3. Nested PCR Ürün Eldesi

EHV-2 ve EHV-5 virus şüpheli erişkin at ve taylardan alınan kan, gözyaşı ve burun akıntısı örnekleri EHV-2 ve EHV-5 viruslarının gB gen bölgesine spesifik primerler (Çizelge 2.2) kullanılarak, Borchers ve ark. (1999) tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek nested PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 2.4. Çalışmada kullanılan PCR karışım bileşenleri ve miktarları

Bileşen	Miktar (μ l)
Taq DNA polymerase (5 U/μl)	0.3 μ l
(NH₄)₂ S0₄ içeren 10 X Taq Buffer (1.25ml)	3 μ l
25mM MgCl₂	1.8 μ l
10mM dNTP mix	1 μ l
EHV-2 (gB) ex/ in Forward-Primer (10 pmol/ μl)	1 μ l
EHV-5 (gB) ex/ in Forward-Primer (10 pmol/ μl)	
EHV-2 (gB) ex/in Reverse-Primer (10 pmol/ μl)	1 μ l
EHV-5 (gB) ex/ in Reverse-Primer (10 pmol/ μl)	
DNase, RNase ari H₂O	18.90 μ l
DNA	3 μ l
Toplam	30 μ l

EHV-2 ve EHV-5 DNA amplifikasyonu için tanımlanan 30 μ l'lik PCR karışımının bileşimi Çizelge 2.4'de sunuldu. EHV-2 için laminal flow altında (esco iso 9001 quality, ABD) EHV-2 (gB) ex Forward-Primer (10 pmol/ μ l) ve EHV-2 (gB) ex Reverse-Primer (10 pmol/ μ l) ile birinci tur PCR reaksiyonunu takiben daha spesifik ürün elde edebilmek için, EHV-2 (gB) in Forward-Primer (10 pmol/ μ l) ve EHV-2 (gB) in Reverse-Primer (10 pmol/ μ l) primerleri ile ikinci tur PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. EHV-5 için EHV-5 (gB) ex Forward-Primer (10 pmol/ μ l) ve EHV-5 (gB) ex Reverse-Primer (10 pmol/ μ l) ile birinci tur PCR reaksiyonunu

takiben daha spesifik ürün elde edebilmek için, EHV-5 (gB) in Forward-Primer (10 pmol/ µl) ve EHV-5 (gB) in Reverse-Primer (10 pmol/ µl) primerleri ile ikinci tur PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyonun 1. turu EHV-2 ve EHV-5 için aynı reaksiyon ısı ve süresinde toplam 40 siklustan oluşmakta olup, denatürasyon aşaması 94 °C’de 30 saniye, çoğaltma aşaması 60°C’de 30 saniye, son uzama aşamasıysa 72 °C’de 1 dakika olarak uygulandı. 35 siklus süren 2.turda ise 1.turdan farklı olarak çoğaltma aşaması EHV-2 için 60°C, EHV-5 içinse 66 °C uygulandı. Birinci turda elde edilen PCR ürünleri 2.turda hedef DNA olarak kullanıldı.

2.2.3.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile Görüntülenmesi

PCR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla %1 yoğunlukta olacak şekilde 0.3 gr agaroz (Prona, EU), üzerine 30 ml 0.5X TAE (Tris-Asetik Asit-EDTA) elektroforez tampon solüsyonu ilave edildi ve karışım mikrodalga fırında kaynatılarak çözüldü. Agarozun 50-55°C ye soğuması beklendi ve 0.5 µg/ml etidyum bromide (Sigma, ABD) ilave edildi. Hazırlanan %1’lik agaroz, jel tarağı yerleştirilmiş jel taşıyıcısına döküldü. Agarozun donması için 15 dakika beklendi. Taraklar çıkartıldı ve jel taşıyıcısı ile birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. PCR ürünlerinin büyüklüklerinin tespit edilebilmesi amacıyla 1 µl DNA merdiveni (100 bp DNA merdiveni, Fermentas, Lithuania) konuldu. PCR ürünleri, 5 kısım ürün, 1 kısım 6X yükleme boyası (10 mM Tris-HCl, %0.03 bromophenol blue, %60 gliserol, 60mM EDTA) oranında karıştırılarak toplam 6µl hacminde jel tarakları yardımı ile açılan gözlemlere aktarıldı. Jel’e 8 volt/cm elektrik akımı uygulanarak 30 dakika süreyle ürünler yürütüldü. Süre sonunda agaroz jel CCD kamera bağlantılı UV transillüminatöre (Vilber Lourmat, Fransa) nakledildi ve jel görüntüleme sisteminde (Kodak, Gel Logic 100, ABD) görüntülenerek fotoğrafları kaydedildi.

2.2.4. EHV-5 TaqMan Real Time PCR

2.2.4.1. EHV-2 ve EHV-5 PCR Ürünlerinin Klonlanması

EHV-5 kontrol virusu P48 suşu EHV-5 Vector Fw-Rev primerleriyle ön denatürasyonu 94 °C’de 30 saniye, çoğaltma aşaması 60°C’de 30 saniye, son uzama aşamasıysa 72 °C’de 1 dakika olmak üzere 40 siklus süresince çoğaltılmasının ardından ticari pürifikasyon kiti (High Pure Cleanup Micro Kit, Kat. No: 04983912001, Roche, Almanya) kullanılarak firma tarafından önerilen prosedür uygulanarak saflaştırıldı. Aynı şekilde EHV-2 kontrol virusu nested PCR ikinci tur primerleriyle 94 °C’de 30 saniye, çoğaltma aşaması 60°C’de 30 saniye, son uzama aşamasıysa 72 °C’de 1 dakika olmak üzere 40 siklus süresince çoğaltılmasının ardından ticari pürifikasyon kiti (High Pure Cleanup Micro Kit, Kat. No: 04983912001, Roche, Almanya) yardımıyla firma tarafından önerilen prosedür uygulanarak saflaştırıldı. Saflaştırılan ürünler pGEMt Easy Vector sistemine klonlandı (Promega, USA). Bu amaçla 5µl 2X Rapid Ligasyon solüsyonu, 1µl T4 DNA Ligase Enzimi, 1µl pGEM-T Easy Vector (50ng) ve 3 µl PCR ürünü bir gece boyunca +4°C’de inkubasyona bırakılarak ligasyon gerçekleştirildi. Ligasyonu gerçekleştiren üründen 2 µl alınarak 50 µl JM 109 kompetan hücre ($> 10^8$ cfu / µg, Promega, Kat. No. L2001) içerisine aktarıldı ve buz içerisinde 30 dakika inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda 42°C’de 45 saniye termal ısı bloğunda bekletilmesinin hemen ardından 2 dakika süreyle tekrar buzda bekletilerek transfeksiyon gerçekleştirildi. PCR ürününü içeren kompetan hücrelerin üzerine 950 µl SOC medyum ilave edildi ve 37°C ısıda olan karıştırıcıda 1 saat bekletilmelerinin ardından, 8000 rpm’de 2 dakika süreyle santrifüj edildi. Geriye sadece 100 µl medyum bırakılarak hücre pelleti resüspanse edildi ve süspansiyonun; ampisilin, X-Gal ve IPTG içeren LB agara (LB Agar, Luria Bertani, LABM, Kat No:079948/323, UK) ekimi gerçekleştirildi. Ekim yapılan agarlar 1 gece boyunca 37°C’de bekletilmelerinin ardından ligasyon ürününü içeren her tüp için tek bir koloni olmak üzere beyaz bakteri kolonileri seçilerek koloni PCR’lar gerçekleştirildi. Pozitif bulunan koloniler 5 ml LB medyum içerisinde, 5 µl ampisilin ilavesiyle beraber 1

gece boyunca 37°C ısıda olan karıştırıcıda bekletildi. İnkubasyon sonrasında bakteri üretilmiş LB medyumun 4 ml'si 8000 rpm'de 2 dakika süresince santrifüj edildi ve elde edilen pelletin plazmid izolasyon kiti (Invisorb Spin Plazmid Mini Two, Kat No: 10101404, Invitek, Almanya) kullanılarak, firma tarafından önerilen prosedüre göre plazmid ekstraksiyonu gerçekleştirildi.

Elde edilen ürünlerde klonlamanın gerçekleşip gerçekleşmediği restriksiyon endonükleaz enzimleriyle çift ve tek kesim yapılarak kontrol edildi. Bu amaçla öncelikle 1 µl ApaLI enzimi (New England Biolabs), 2 µl, 3 numaralı enzim tamponu, 1 µl BSA, 2 µl DNA ve 14 µl su daha sonrada 1 µl NcoI (New England Biolabs) enzimi, 1 µl SmaI (New England Biolabs) enzimi 4 µl 4 numaralı enzim tamponu, 4 µl DNA ve 30 µl su reaksiyona sokuldu ve 2 saat 37°C' de bekletilmelerinin ardından, %1'lik oranında hazırlanmış agaroz jelde görüntülenerek kontrol edildi. Beklenen kesim patternini sağlayan EHV-5 kolonileri EHV-5 realtime PCR için pozitif kontrol olarak ve standart eğri oluşturulabilmesi amacıyla dilüsyonları yapılarak reaksiyonda kullanıldı. Doğru kesim dizilimine sahip EHV-2 kolonileri ise spesifisite reaksiyonunda kullanıldı.

2.2.4.2 EHV-5 TaqMan Real Time PCR Primer Tasarımı

Gen bankasında tam sekansı çıkarılmış gen bölgesi olan ve çok sayıda farklı EHV-5 suşunun tespit edilmesine olanak sağlayan EHV-5 gB gen bölgesi MGB probe ve primerlerin tasarımı amacıyla seçildi. Bu amaçla BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ile EHV-2 ayrımı açısından spesifisite sağlanacağı düşünülen bölgede hizalama yapıldı (şekil 2.1). Probe tasarımının uygun olacağı düşünülen bu bölgede istediğimiz MGB probe seçimi gerçekleştirilemedi. Bu sebeple aynı bölgede komplementer tasarıma karar verildi ve real-time için yüksek spesifisite sağlayan MGB probe'da 5 uyumsuz baz içeren bir kombinasyon seçilerek probe ve primerlerin sentezi gerçekleştirildi. Primer tasarımında lisanslı program olan Primer Express Software v3.0 kullanıldı (Applied Biosystems, ABD).

Şekil 2.1. EHV-2 ayrımı açısından spesifisite sağlanacağı düşünülen gB bölgesinde yapılan hizalama

	33131	33132	33143	33154	33165	33176	33187	33198	33209	33220	33231	33242	33253	33264	33275	33286	3329	
AF050671@1.5 GB COMP	1010	CTGGTGTGGAAGGGGTTCCCTAGCCCATACAGACCCAGCAGAGAAACTCAATTTATAGCAGATGCTGAACCGCTCTTTAACTTCCTCACTGATGAATCTCTACTTTAACACAAATATCATGTTGGGTGGCAGACATAGAGGTAAATTC	895	CTGGTGTGGAAGGGGTTCCCTAGCCCATACAGACCCAGCAGAGAAACTCAATTTATAGCAGATGCTGAACCGCTCTTTAACTTCCTCACTGATGAATCTCTACTTTAACACAAATATCATGTTGGGTGGCAGACATAGAGGTAAATTC	196	CTGGTGTGGAAGGGGTTCCCGAGCCCATACAGACCCAGCAGAGAAACTCAATTTATAGCAGATGCTGAACCGCTCTTTAACTTCCTCACTGATGAATCTCTCAATTTAATCAGTATACCCGTGGCTTGGCAGGCATAGAGGTAAATTC	196	CTGGTGTGGAAGGGGTTCCCGAGCCCATACAGACCCAGCAGAGAAACTCAATTTATAGCAGATGCTGAACCGCTCTTTAACTTCCTCACTGATGAATCTCTCAATTTAATCAGTATACCCGTGGCTTGGCAGGCATAGAGGTAAATTC	895	CTGGTGTGGAAGGGGTTCCCGAGCCCATACAGACCCAGCAGAGAAACTCAATTTATAGCAGATGCTGAACCGCTCTTTAACTTCCTCACTGATGAATCTCTCAATTTAATCAGTATACCCGTGGCTTGGCAGGCATAGAGGTAAATTC	196	CTGGTGTGGAAGGGGTTCCCGAGCCCATACAGACCCAGCAGAGAAACTCAATTTATAGCAGATGCTGAACCGCTCTTTAACTTCCTCACTGATGAATCTCTCAATTTAATCAGTATACCCGTGGCTTGGCAGGCATAGAGGTAAATTC	208	TGGATTTGGAAGGGGTTTCTATAGCTATACAGACCACTGACACACTCAATTTATTGGAATTCCTAATACCGCTCTTTAACTTCCTACAAATGGAATGACCAATTTAACAAAATACCTGTGTGTGGAGGACGTAGAAATTAATTC	1			
EHV-2 COMP GB HQ	919	CTGGTGTGGAAGGGGTTCTCAATATGCTATTCAGATCTCAACAGCAGACACTCAATTTCTTTACATGACATACAGCTGTCTTTAACTTCCTCACTGATGAATCTCTGAAATTTAACAAAATACCAATGTGTGTGGAGAGACATAGGGGAAATTC	919	CTGGTGTGGAAGGGGTTCTCAATATGCTATTCAGATCTCAACAGCAGACACTCAATTTCTTTACATGACATACAGCTGTCTTTAACTTCCTCACTGATGAATCTCTGAAATTTAACAAAATACCAATGTGTGTGGAGAGACATAGGGGAAATTC	907	CTGGTGTGGAAGGGGTTCTCTATATGCTATTCAGACCAAGCTGTAACACTCAATTTATTGTCATTAAGTAAACAGCTGTCTTTAACTTCCTCACTGATGAATCTCTCAATTTAATCAGTATACCCGTGGCTTGGCAGGCATAGAGGTAAATTC	907	CTGGTGTGGAAGGGGTTCTCTATATGCTATTCAGACCAAGCTGTAACACTCAATTTATTGTCATTAAGTAAACAGCTGTCTTTAACTTCCTCACTGATGAATCTCTCAATTTAATCAGTATACCCGTGGCTTGGCAGGCATAGAGGTAAATTC	1									
	1																	
	1																	
	1																	
	1																	
	379	GAGTTGAATGGCATTGAAAAACCCCTCCATAGAAATTCATGCTAGTAGGAGAGCTGTGTTTCAGTGTGGCTTCCAGCAGGGGAATAGTCCCAAAATATTGCAAGAGATCGGTAGCGTTATAGCGCTGCCCAACCCACACCGTACTTTGTGCAGCATAGTTT	401	GAGTTGAATGGCATTGAAAAACCCCTCCATAGAAATTCATGCTAGTAGGAGAGCTGTGTTTCAGTGTGGCTTCCAGCAGGGGAATAGTCCCAAAATATTGCAAGAGATCGGTAGCGTTATAGCGCTGCCCAACCCACACCGTACTTTGTGCAGCATAGTTT	414	GAGTTGAATGGCATTGAAAAACCCCTCCATAGAAATTCATGCTAGTAGGAGAGCTGTGTTTCAGTGTGGCTTCCAGCAGGGGAATAGTCCCAAAATATTGCAAGAGATCGGTAGCGTTATAGCGCTGCCCAACCCACACCGTACTTTGTGCAGCATAGTTT	414	GAGTTGAATGGCATTGAAAAACCCCTCCATAGAAATTCATGCTAGTAGGAGAGCTGTGTTTCAGTGTGGCTTCCAGCAGGGGAATAGTCCCAAAATATTGCAAGAGATCGGTAGCGTTATAGCGCTGCCCAACCCACACCGTACTTTGTGCAGCATAGTTT	421	GAGTTGAATGGCATTGAAAAACCCCTCCATAGAAATTCATGCTAGTAGGAGAGCTGTGTTTCAGTGTGGCTTCCAGCAGGGGAATAGTCCCAAAATATTGCAAGAGATCGGTAGCGTTATAGCGCTGCCCAACCCACACCGTACTTTGTGCAGCATAGTTT	1							
	1																	
	1																	
	916	GATTAATTTATGAAAGGGTTTCCCAATGCCATTCAAACTCAACCATATGACAGTTCCCAATTTATGGCAAAGATTTAAGCTCCTCTTAATCCTTTTACAGAGAGGCTGATTTTAAACCAAGTACCGCTGTATATGGACCAACCGCGAGAGAAATTC	1															
	1																	
	496	TTAATTTTAT																
	919	TTAATTTTATGGAAGGGGTTTCCATGCCCATCAAACTCAACCAATAGCAATCTCAATTTATTGCAATGATATACAGCTCTCTTTAACTTCCTTACAGAGAGGCTGATTTTAACTACAGTACGCGTGTATATGGAACACAGCGAGAGAAATTC	919	TTAATTTTATGGAAGGGGTTTCCATGCCCATCAAACTCAACCAATAGCAATCTCAATTTATTGCAATGATATACAGCTCTCTTTAACTTCCTTACAGAGAGGCTGATTTTAACTACAGTACGCGTGTATATGGAACACAGCGAGAGAAATTC	916	TTAATTTTATGGAAGGGGTTTCCATGCCCATCAAACTCAACCAATAGCAATCTCAATTTATTGCAATGATATACAGCTCTCTTTAACTTCCTTACAGAGAGGCTGATTTTAACTACAGTACGCGTGTATATGGAACACAGCGAGAGAAATTC	1											
	1																	
	220	TTAGTTTATGGAAGGGGTTTCCATGCCCATCAAACTCAACCAATAGCAATCTCAATTTATTGCAATGATATACAGCTCTCTTTAACTTCCTTACAGAGAGGCTGATTTTAACTACAGTACGCGTGTATATGGAACACAGCGAGAGAAATTC	220	TTAGTTTATGGAAGGGGTTTCCATGCCCATCAAACTCAACCAATAGCAATCTCAATTTATTGCAATGATATACAGCTCTCTTTAACTTCCTTACAGAGAGGCTGATTTTAACTACAGTACGCGTGTATATGGAACACAGCGAGAGAAATTC	220	TTAGTTTATGGAAGGGGTTTCCATGCCCATCAAACTCAACCAATAGCAATCTCAATTTATTGCAATGATATACAGCTCTCTTTAACTTCCTTACAGAGAGGCTGATTTTAACTACAGTACGCGTGTATATGGAACACAGCGAGAGAAATTC	1											
	1																	
	1																	
	220	TTAATTTTATGGAAGGGGTTTCCATGCCCATCAAACTCAACCAATAGCAATCTCAATTTATTGCAATGATATACAGCTCTCTTTAACTTCCTTACAGAGAGGCTGATTTTAACTACAGTACGCGTGTATATGGAACACAGCGAGAGAAATTC	220	TTAATTTTATGGAAGGGGTTTCCATGCCCATCAAACTCAACCAATAGCAATCTCAATTTATTGCAATGATATACAGCTCTCTTTAACTTCCTTACAGAGAGGCTGATTTTAACTACAGTACGCGTGTATATGGAACACAGCGAGAGAAATTC	220	TTAATTTTATGGAAGGGGTTTCCATGCCCATCAAACTCAACCAATAGCAATCTCAATTTATTGCAATGATATACAGCTCTCTTTAACTTCCTTACAGAGAGGCTGATTTTAACTACAGTACGCGTGTATATGGAACACAGCGAGAGAAATTC	1											
	1																	
	220	TTAATTTTATGGAAGGGGTTTCCATGCCCATCAAACTCAACCAATAGCAATCTCAATTTATTGCAATGATATACAGCTCTCTTTAACTTCCTTACAGAGAGGCTGATTTTAACTACAGTACGCGTGTATATGGAACACAGCGAGAGAAATTC	2															

2.2.4.3. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Spesifisite

Çalışma için tasarlanan primerler ve probe'un spesifikliğini kontrol etmek amacıyla EHV-5 plazmid ve EHV-5 viral DNA ile birlikte EHV-2 plazmid, EHV-2, EHV-1, EHV-4 viruslarının DNA'ları Çizelge 2.5'de belirtilen koşullarda reaksiyona alındı.

2.2.4.4. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Relatif Sensitivite

TaqMan real time PCR reaksiyonunda $3,54 \times 10^3$ kopya miktarı ile pozitif bulunan bir göz akıntısı örneği logaritma 10 tabanına göre sulandırılarak nested PCR reaksiyonuna alındı ve relatif sensitivite için kullanıldı.

2.2.4.5. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Tespit Limiti Belirlenmesi

pGEMt Easy Vector Sistemine klonlanan EHV-5 gB gen bölgesi real-time reaksiyonunda plazmid sulandırması olarak kullanılmadan önce klonlamanın doğruluğunun teyit edilmesi amacıyla yapılan kesim işlemlerinden sonra nanodrop yardımıyla μ l'deki plazmid DNA miktarı ölçüldü ve bu spektrofotometrik belirlemenin ardından standart DNA moleküllerinin kopya sayısı " $(X \text{ g/ul DNA} / [\text{plazmid length in basepairs} \times 660]) \times 6.022 \times 10^{23} = Y \text{ molecules/ul}$ " formülü kullanılarak belirlendi. 10^{10} standart DNA kopyası içeren plazmid 10^1 kopyaya kadar sulandırıldı ve sulandırmalar sonrası tekrar nanodrop yardımıyla ölçülerek sulandırma işleminin doğruluğu teyit edildi. Daha sonra bu sulandırmalardan 10^6 kopya ile 10^1 kopyaya kadar olan kısım tespit limitinin belirlenmesi için kullanıldı. Bu amaçla logaritma 10 tabanına göre sulandırılan 6 basamaklı sulandırma dizisi 4 kez olmak üzere negatif kontrollerle birlikte pleyt gözlerine konuldu. Hızlı real-time sisteminde uygun reaksiyon karışımı ile 40 dakikalık reaksiyona alınan sulandırmalardaki tespit limiti belirlendi ve örnekler reaksiyona alınırken sulandırmalar çift olarak konularak siklustaki eşik değer ve DNA kopya sayısı belirlendi.

2.2.4.6. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Ürün Eldesi

Applied Biosystems’de sentezlenen tasarladığımız primerler ve MGB probe Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR sisteminde Çizelge 2.3’de belirtilen g(B) gen bölgesine spesifik primerler ve probe kullanılarak, Perfecta qPCR superMix (Quanta Biosciences, ABD) yardımıyla hızlı çoğaltma reaksiyonuna tabi tutuldu. DNA amplifikasyonu için tanımlanan 20 µl’lik real-time PCR karışımının bileşimi Çizelge 2.5.’de sunuldu. EHV-5 Forward-Primer (10 pmol/ µl), EHV-5 Reverse-Primer (10 pmol/ µl) ve EHV-5 MGB Probe (10 pmol/ µl) ile Reaksiyonun 1. turu EHV-2 ve EHV-5 için aynı ve toplam 40 siklustan oluşmakta olup denatürasyon aşaması 94 °C’de 10 saniye, çoğaltma ve uzama aşaması 60°C’de 30 saniye olarak uygulandı ve elde edilen 63 bp’lik ürün yüksek spesifisite özelliğine sahip olan MGB probe ile floresans ışıltama verdi. Raportör boya sinyalini normalize etmek amacıyla reaksiyonlar ROX pasif boya varlığında gerçekleştirildi.

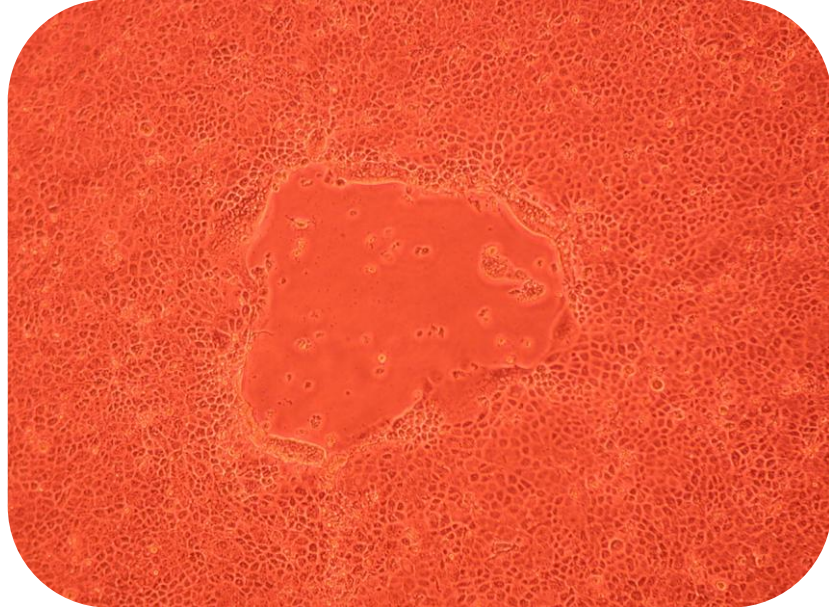
Çizelge 2.5. Çalışmada kullanılan TaqMan real time PCR karışım bileşenleri ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
Perfecta qPCR superMix	10 µl
EHV-5 Fw (10 pmol/ µl)	0.9 µl
EHV-5 Rev (10 pmol/ µl)	0.9 µl
EHV-5 MGB Probe (10 pmol/ µl)	0.2 µl
DNase, RNase ari H₂O	3 µl
DNA	5 µl
Toplam	20 µl

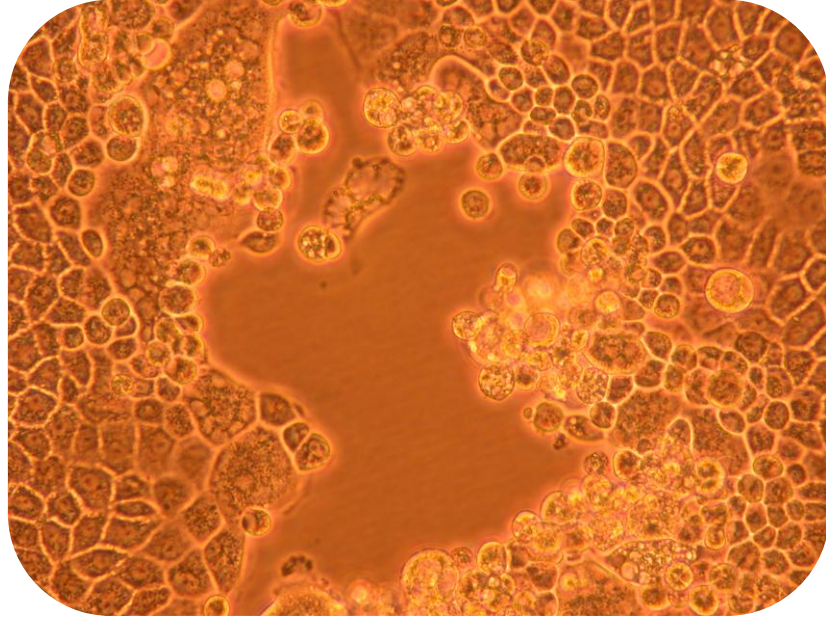
3. BULGULAR

3.1. Virus İzolasyonu

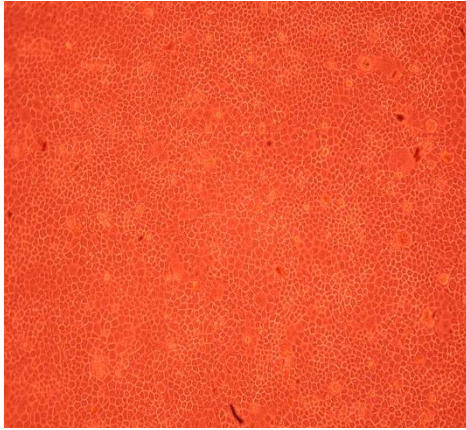
Equine Dermal (ED) ve Rabbit Kidney-13 (RK-13) hücre kültürleri ile kokültivasyonu yapılan 165 erişkin at ve taya ait periferik kan mononükleer hücrelerinden 37 adedinin, 3 pasaj sonrasında, her iki hücre kültüründe de tipik herpesvirus plak oluşumu ile karakterize CPE oluşturduğu gözlemlendi. İzolatların EHV-2 ve EHV-5 yönünden nested PCR ile yapılan kontrolü sonucunda, tümü EHV-2 olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların 19 adedi Malatya, 12 adedi Eskişehir ve 6 adedi Bursa’da yerleşik işletmelerde bulunan atlardan alınan kan örneklerinden elde edildi. Kokültivasyon tekniğiyle ekimi yapılan diğer örneklerin 3 pasaj sonrasında 2 hafta bekletilmelerine karşın herhangi bir CPE gözlemlenmedi. ED ve RK-13 hücre hatlarında saptanan CPE ve hücre kontrollerine ait görüntüler Şekil 3.1.- Şekil 3.3.’de sunuldu.



Şekil. 3.1.. EHV-2 olarak tanımlanmış saha virusunun ED hücre hattında oluşturduğu CPE. (100’lük büyütme [10X10][Nikon eclipse TS100], 3.Pasaj.)



Şekil. 3.2. EHV-2 olarak identifiye edilen saha virusunun RK-13 hücre hattında oluşturduğu CPE. (200'lük büyütme [20X10][Nikon eclipse TS100], 3.Pasaj.)



Şekil. 3.3. RK-13 ve ED kontrol hücre hatları. (100'lük büyütme [10X10][Nikon eclipse TS100], 3.Pasaj.)

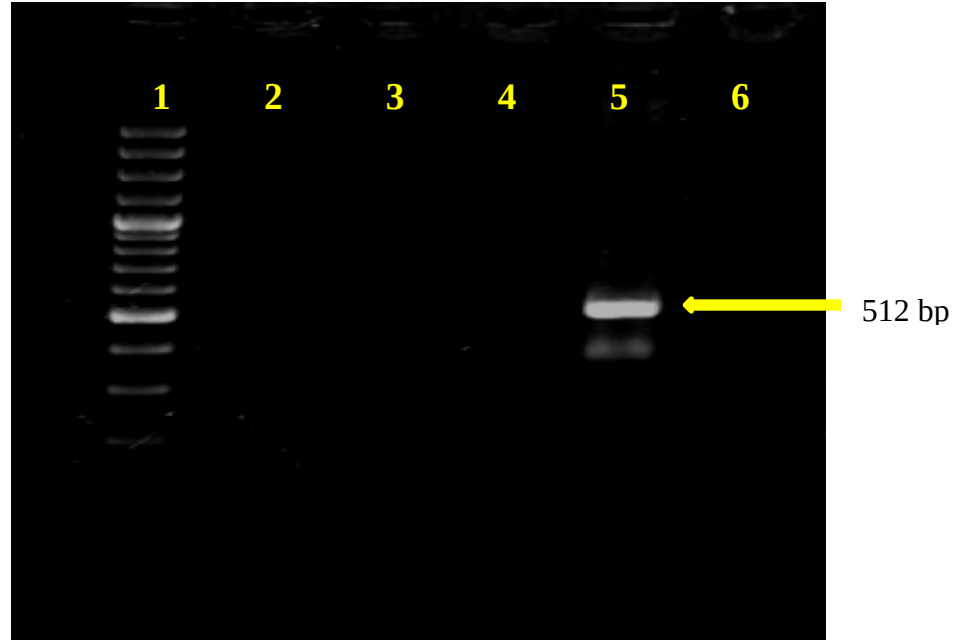
3.2. Nested PCR

3.2.1. DNA Ekstraksiyonu

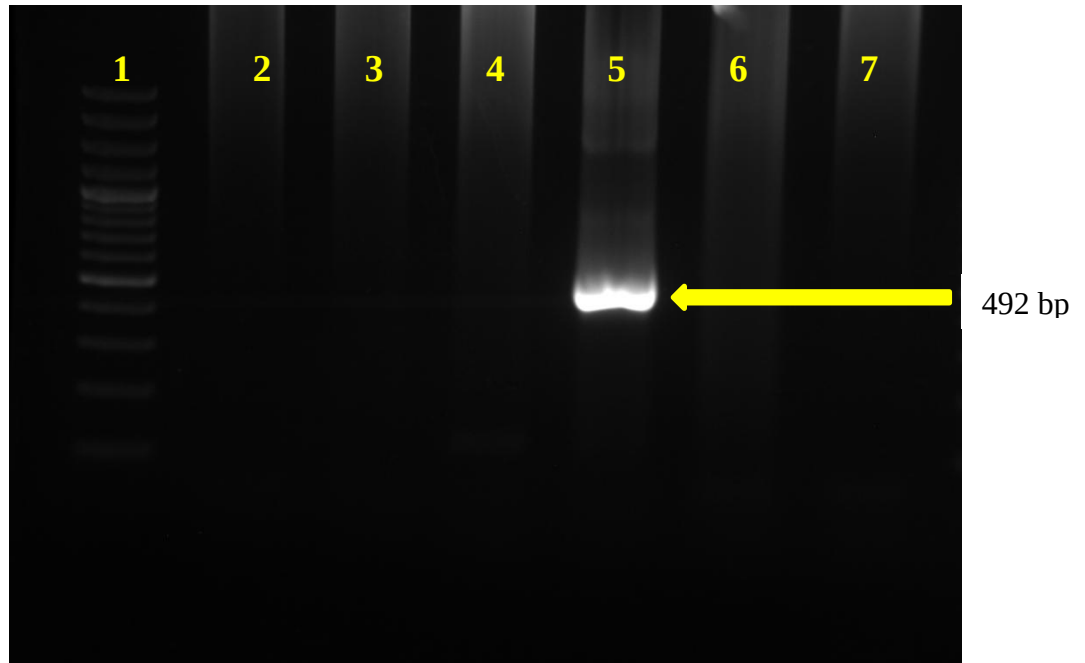
Viral DNA ekstraksiyonunda Sambrook ve ark. (1989) tarafından tanımlanan DNA ekstraksiyon metodu ve Viral Nükleik Asit kiti (High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Roche, Almanya) kullanıldı. Bursa ve Malatya’da yerleşik iki işletmeye ait örneklerden işlem sonucunda elde edilen DNA (ng/ μ l) nested PCR ve/veya real time PCR reaksiyonunda kullanılmadan önce 260 nm dalga boyunda (Picodrop v2.08) ölçülerek μ l’deki DNA miktarı belirlendi (Ek 1). Belirlenen DNA miktarlarının PCR reaksiyonu için uygun olduğu görüldü.

3.2.2. Nested PCR Spesifisite

EHV-2 virusu gB gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak EHV-2, EHV-5, EHV-1 ve EHV-4 kontrol virus DNA’ları ile uygulanan nested PCR sonucunda sadece EHV-2 viral DNA’sı 512 bp büyüklükte istenilen ürünü verdi (Şekil 3.4). EHV-5 virusu gB gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak EHV-5, EHV-2, EHV-1 ve EHV-4 kontrol virus DNA’larıyla uygulanan nested PCR sonucunda sadece EHV-5 viral DNA’sından 492 bp büyüklüğündeki istenilen ürünün elde edilmesiyle primerlerin spesifikliği belirlendi (Şekil 3.5).



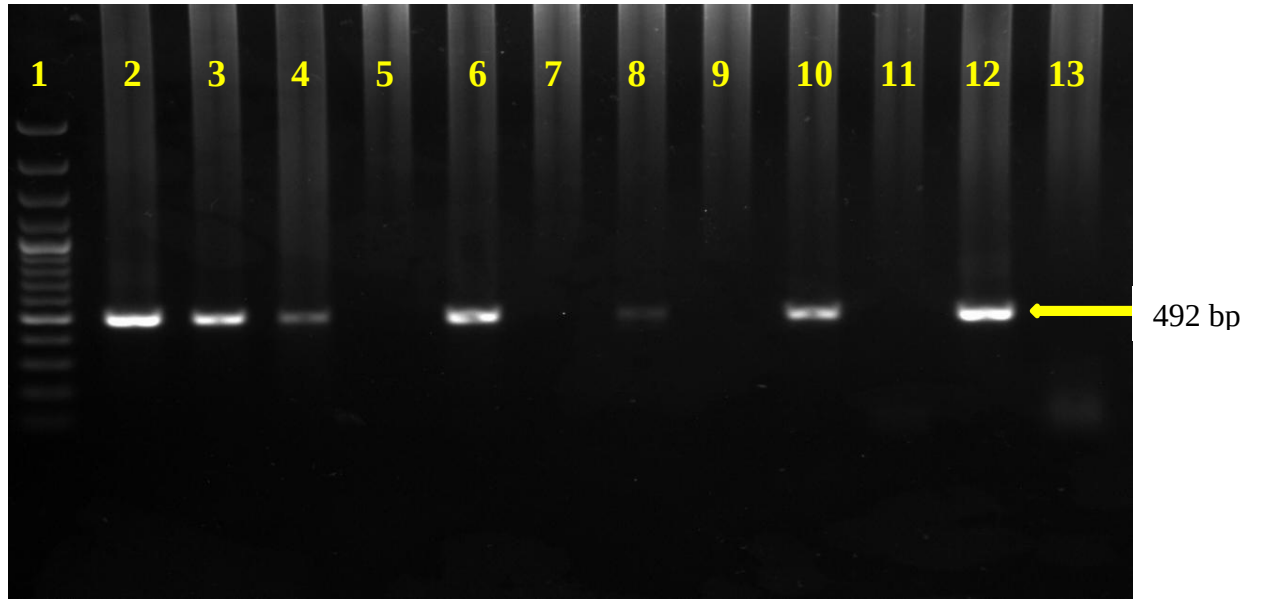
Şekil 3.4. EHV-2 için spesifisite tespiti amacıyla uygulanan nested PCR sonucu. [1:3000 bp DNA merdiveni, 2:EHV-5, 3:EHV-1, 4:EHV-4, 5:EHV-2 T400 referans suşu, 6-negatif kontrol.]



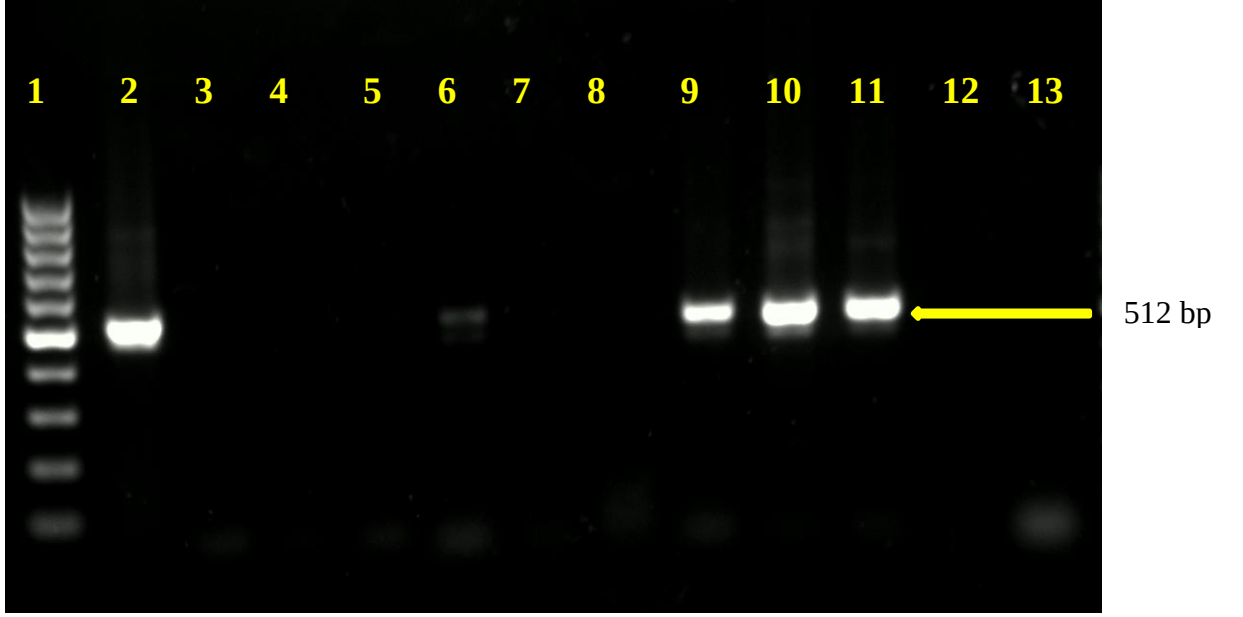
Şekil 3.5. EHV-5 için spesifisite tespiti amacıyla uygulanan nested PCR sonucu. [1-3000 bp DNA merdiveni, 2-EHV-2, 3- EHV-1, 4- EHV-4, 5-EHV-5 P48 referans suşu, 6,7-negatif kontrol.]

3.2.3. Nested PCR Sonuçları

EHV-2 ve EHV-5 şüpheli at ve taylardan alınan kan, gözyaşı ve burun akıntısı örneklerine EHV-2 ve EHV-5 viruslarının gB genine spesifik primerler kullanılarak Nested PCR testleri uygulandı. EHV-2 nested PCR reaksiyonlarında T400 suşu kontrol virusu 512 bp büyüklüğünde ve EHV-5 nested PCR reaksiyonlarında P48 suşu kontrol virusu 492 bp büyüklüğünde amplifiye edildi (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7).



Şekil 3.6. EHV-5 nested PCR sonucu oluşan ürünlerin agaroz jel görüntüsü [1:3000 bp DNA merdiveni, 2,3,4,6,8,10:pozitif saha örneği, 4,7,9,11:negatif saha örneği, 12:EHV-5 P48 referans suşu, 13-negatif kontrol].



Şekil 3.7. EHV-2 nested PCR sonucu oluşan ürünlerin agaroz jel görüntüsü [1:3000 bp DNA merdiveni, 6,9,10,11:pozitif saha örneği, 4,5,7,8,12,13:negatif saha örneği, 2:EHV-2 T400 referans suşu, 3-negatif kontrol].

Nested PCR ile EHV-2 ve EHV-5 nükleik asiti yönünden üç ayrı işletmede yetiştirilen atlara ait 165 adet kan, 165 adet gözyaşı akıntısı ve 165 burun akıntısı örneği olmak üzere toplam 495 adet materyal incelendi. Materyal sağlanan her bir işletmeye ait EHV-2 ve EHV-5 enfeksiyonu pozitiflik oranları hesaplandı (Çizelge 3.3- Çizelge 3.5).

Elde edilen sonuçlara göre Eskişehir ilinde yerleşik I nolu işletmeye ait saha materyallerine yapılan nested PCR sonrasında kan, gözyaşı ve burun akıntılarında en az birisinde pozitif saptanmış olması kriter alınarak toplam 45 erişkin at ve taydan 34'ü (%75,5) EHV-2, 26'sı (%57,7) EHV-5 yönünden pozitif bulundu. Bu atlardan 22'sinde (%48,8) hem EHV-2 ve hem de EHV-5 varlığı saptandı. EHV-2 için periferik kan hücrelerinde pozitiflik oranı %71,7, gözyaşı akıntılarında %33,3, burun akıntılarında %15,5, EHV-5 için periferik kan hücrelerinde pozitiflik oranı % 44,4, okuler swaplarda %28,8, nasal swaplarda %22,2 olarak tespit edildi (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. I nolu işletmeden sağlanan materyallerin nested PCR sonuçları

İşletme No (Yerleşke)	Materyal/ Hayvan	Sayı	EHV-2 (+)	EHV-5 (+)	EHV-2 ve EHV-5 (+)
I (Eskişehir)	Kan	45	31 (%71,7)	20 (%44,4)	16 (%35,5)
	Gözyaşı	45	15 (%33,3)	13 (%28,8)	5 (%11,1)
	Akıntısı				
	Burun	45	7 (%15,5)	10 (%22,2)	2 (%4,4)
	Akıntısı				
	At	45	34 (%75,5)	26 (%57,7)	22 (%48,8)

Malatya ilinde yerleşik II nolu işletmeden sağlanan saha materyallerine yapılan nested PCR sonrasında toplam 53 erişkin at ve taydan 34'ü'nde (%64,15) EHV-2, 36'sında (%67,92) EHV-5 varlığı saptanırken, bunların 29'u (%54,71) hem EHV-2 hem de EHV-5 pozitif bulundu. EHV-2 için periferik kan hücrelerinde pozitiflik oranı %50,94, gözyaşı akıntılarında %35,29, burun akıntılarında %34,69, EHV-5 için periferik kan hücrelerinde pozitiflik oranı %47,16, gözyaşı akıntılarında %19,16, burun akıntılarında %55,1 olarak tespit edildi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. II nolu işletmeden sağlanan materyallerin nested PCR sonuçları

İşletme No (Yerleşke)	Materyal/ Hayvan	Sayı	EHV-2 (+)	EHV-5 (+)	EHV-2 ve EHV-5 (+)
II (Malatya)	Kan	53	27 (%50,94)	25 (%47,16)	20 (%37,73)
	Gözyaşı	53	18 (%35,29)	10 (%19,6)	8 (%15,68)
	Akıntısı				
	Burun	53	17 (%34,69)	27 (%55,1)	13 (%26,53)
	Akıntısı				
	At	53	34 (%64,15)	36 (%67,92)	29 (%54,71)

Bursa ilindeki III nolu İşletmeden sağlanan saha materyallerine yapılan nested PCR sonrasında toplam 67 erişkin at ve taydan 29'u (%43,28) EHV-2, 41'i (%61,19) EHV-5 yönünden pozitif bulunurken 24'ünde ise (%35,82) hem EHV-2 hem de EHV-5 varlığı saptandı. EHV-2 için periferal kan hücrelerinde pozitiflik oranı %31,34, gözyaşı akıntılarında %14,9, burun akıntılarında %23,88, EHV-5 için periferal kan hücrelerinde pozitiflik oranı %53,73, gözyaşı akıntılarında %14,9, burun akıntılarında %46,26 olarak tespit edildi (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. III nolu işletmeden sağlanan materyallerin nested PCR sonuçları

İşletme No (Yerleşke)	Materyal/ Hayvan	Sayı	EHV-2 (+)	EHV-5 (+)	EHV-2 ve EHV-5 (+)
III (Bursa)	Kan	67	21 (%31,34)	36 (%53,73)	17 (%25,37)
	Gözyaşı	67	10 (%14,9)	10 (%14,9)	4 (%5,97)
	Akıntısı				
	Burun	67	16 (%23,88)	31 (%46,26)	14 (%20,89)
	Akıntısı				
	At	67	29 (%43,28)	41 (%61,19)	24 (%35,82)

Araştırma süresince örneklenen 3 işletmedeki, 165 attan sağlanan kan, gözyaşı, burun akıntılarından en az birisinin pozitif tespit edilmesi kriter alınarak, örneklenen popülasyonda EHV-2 ve EHV-5 için pozitiflik oranları sırasıyla %58,78 (97/165) ve %62,42 (103/165) olarak belirlendi. Her iki etken yönünden pozitiflik oranı ise %45,45 (75/165) olarak saptandı. Söz konusu hayvanlarda EHV-2 için pozitiflik oranı, periferal kan hücrelerinde %47,87 (79/165), gözyaşı akıntılarında %26,06 (43/165), burun akıntılarında %24,24 (40/165), EHV-5 için pozitiflik oranı periferal kan hücrelerinde %49,09 (81/165), gözyaşı akıntılarında %20 (33/165), burun akıntılarında %41,21 (68/165) olarak tespit edildi.

Elde edilen veriler örneklenen hayvanların cinsiyet ve yaş grupları yönünden değerlendirildiğinde, söz konusu her iki etken için taylardaki pozitiflik oranının erişkin atlara oranla daha yüksek olduğu saptandı. Aygır ve kısıraklar için belirlenen pozitiflik oranları ise birbirine yakın bulundu (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Araştırma süresince örneklenen atlara ait nested PCR sonuçları

		Materyal/Hayvan	EHV-2 (+) (%)	EHV-5 (+) (%)
Materyal Sağlanan At Populasyonu	Aygır (17)	PBMC	5 (29,41)	4 (23,52)
		Gözyaşı Akıntısı	2 (11,76)	1 (5,88)
		Burun Akıntısı	2 (11,76)	3 (17,64)
	At		6 (35,20)	7 (41,17)
	Kısırak (54)	PBMC	13 (24,07)	13 (24,07)
		Gözyaşı Akıntısı	5 (9,25)	5 (9,25)
		Burun Akıntısı	7 (12,96)	10 (18,51)
	At		20 (37,03)	19 (35,18)
	Tay (61) (1-3 yaşında)	PBMC	33 (54,09)	40 (65,57)
		Gözyaşı Akıntısı	17(37,86)	10 (16,39)
		Burun Akıntısı	9 (14,75)	29 (47,54)
	At		40 (65,57)	47 (77,04)
	Süt emen Tay (33)	PBMC	29 (87,87)	24 (72,72)
		Gözyaşı Akıntısı	19 (57,57)	17 (51,51)
		Burun Akıntısı	22 (66,66)	27(81,81)
	At		31 (93,93)	29 (87,87)
Toplam	165		97(58,78)	103 (62,42)

3.2.3. Nested PCR Sonuçlarının Kokültivasyon Verileriyle Karşılaştırılması

165 adet kanın ED ve RK-13 hücre kültürleriyle kokültivasyonu sonucunda 37 adet EHV-2 izole edilirken, toplam kan materyalinde nested PCR ile 97 adet EHV-2 pozitif hayvan saptandı (Çizelge 3.5). Nested PCR ile kokültivasyon tekniğine göre daha yüksek pozitiflik saptanmasına rağmen, nested PCR ile negatif olarak belirlenen iki örnek kokültivasyonda pozitif bulundu. EHV-5 için yapılan nested sonucunda örnek pozitif iken, kokültivasyonda pozitiflik saptanmadı.

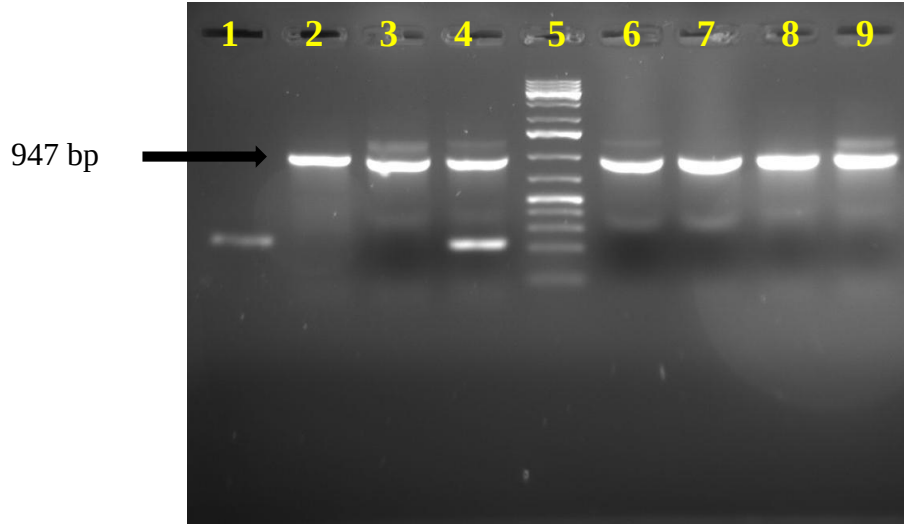
Çizelge 3.5. EHV-2 nested PCR sonuçlarının kokültivasyon verileriyle karşılaştırılması

		Nested PCR		Toplam
		(+)	(-)	
Kokültivasyon	(+)	35	2	37
	(-)	62	66	128
		97	68	165

3.3. EHV-5 TaqMan Real Time PCR

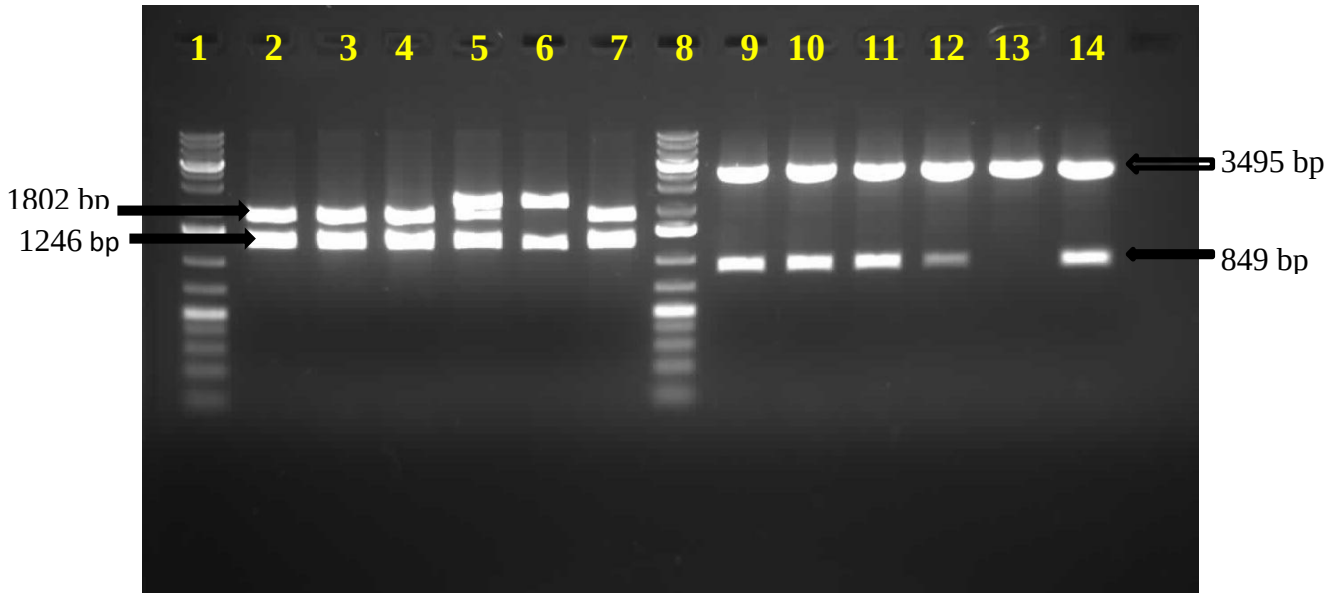
3.3.1. EHV-2 ve EHV-5 PCR Ürünlerinin Klonlanması

EHV-5 kontrol virusu P48 suşu EHV-5 Vector Fw-Rev primerleriyle, EHV-2 nested PCR ikinci tur primerleriyle amplifikasyonlarının ardından saflaştırılarak klonlandı. Ligasyon gerçekleşen koloniler LB medyuma aktarılmadan önce koloni PCR ile kontrol edildi (Şekil 3.8.). Pozitif bulunan koloniler LB medyumda çoğaltılmalarının ardından izole edildi ve klonlamanın doğruluğu restriksiyon endonükleaz enzimleriyle yapılan kesimler sonucu kontrol edilerek (Şekil 3.9) klonlamanın gerçekleştiği klonlar EHV-5 real-time PCR reaksiyonunda kullanıldı.



Şekil 3.8. EHV-2 koloni PCR sonucu oluşan ürünlerin agaroz jel görüntüsü

[1: negatif koloni, 5:20000 bp DNA merdiveni, 2,3,4,6,7,8,9: pozitif koloniler].



Şekil 3.9. EHV-5 plazmid DNA'sının restriction endonükleaz enzimleriyle kesimi sonucu oluşan ürünlerin agaroz jel görüntüsü. [1,8:20000 bp DNA merdiveni, 2,3,4,7: ApaLI enzimi kesimi pozitif koloniler, 5,6,: ApaLI enzimi kesimi negatif koloni, 9,10,11,14: NcoI, SmaI enzimleri kesimi pozitif koloniler, 12,13: NcoI, SmaI enzimleri kesimi negatif koloni].

3.3.2. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Primer Tasarımı

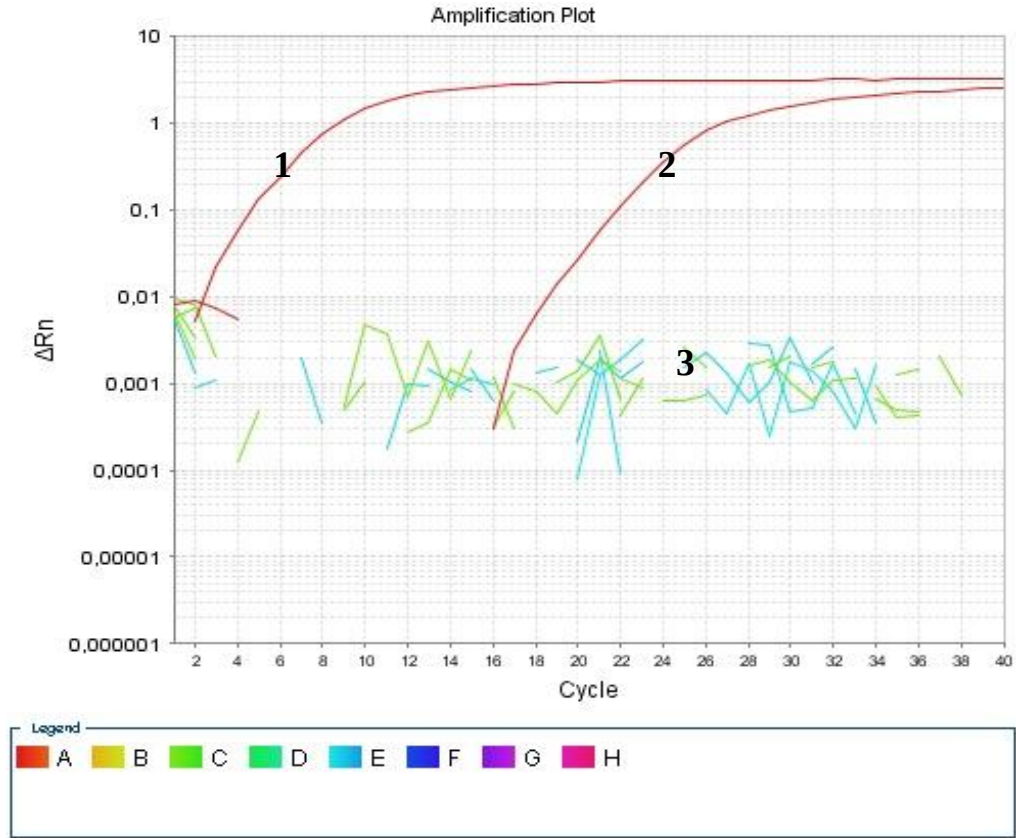
Bu araştırma kapsamında tasarımı yapılan EHV-5 virusuna ait primerler ve probe gB gen bölgesinden komplementer olarak tasarlandı. Probe tasarımında spesifisite için yüksek ayırıcı özelliğe sahip olan MGB probe EHV-2 gB gen bölgesi ile hizalama yapılarak 5 uyumsuz baz içeren bir tasarım oluşturuldu. Bu çalışmalar sonucunda tasarlanan primerler ve probe beklenen 63 bp'lık EHV-5 amplifikasyonunu çapraz reaksiyon vermeden gerçekleştirdi.

EHV-5 gB genine yönelik forward, reverse primer ve reverse probe yerleşimi;

GGGACGTGGTCCAAATCTCTGACTGTATCACCG(*Rev.Primer*)TGGACCAAG
 AGAGCGTGTGTTGTGCACAGAAAT(*Rev.Probe*)CTAAGGGTCCCGGGTAGCA
 AAGACCTGTGTTACACCCCTGCACCAGGTTTAGAGACTGACATAGTGGC
 (*Fw.Primer*)ACCTGGTTCTCTCGCACAAACACGTGTCTTTA

3.3.3. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Spesifisite

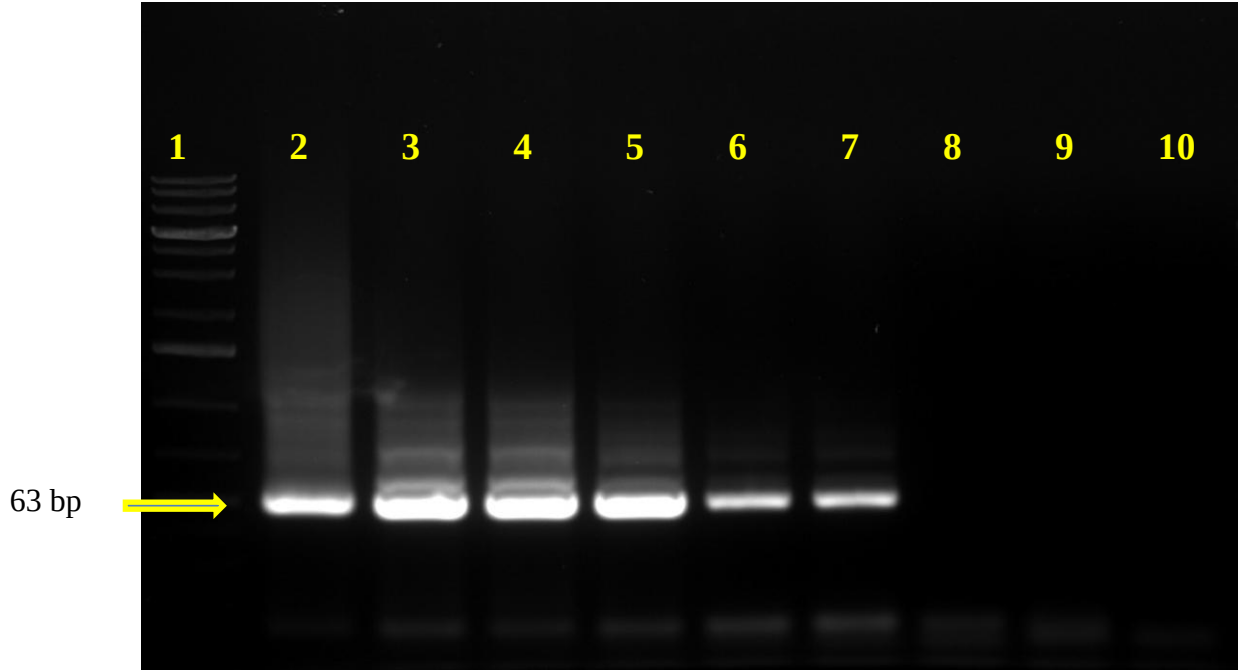
EHV-5 virusu (gB) gen bölgesine spesifik primerlerin EHV-5 plazmid, EHV-5, EHV-2, EHV-1 ve EHV-4 viral DNA'larıyla reaksiyonu sonucu sadece EHV-5 plazmid ve viral DNA'sı beklenen siklusta (EHV-5 plazmid ct: 7, EHV-5 virus ct: 24) pozitif pikler oluşturdu (Şekil 3.10).



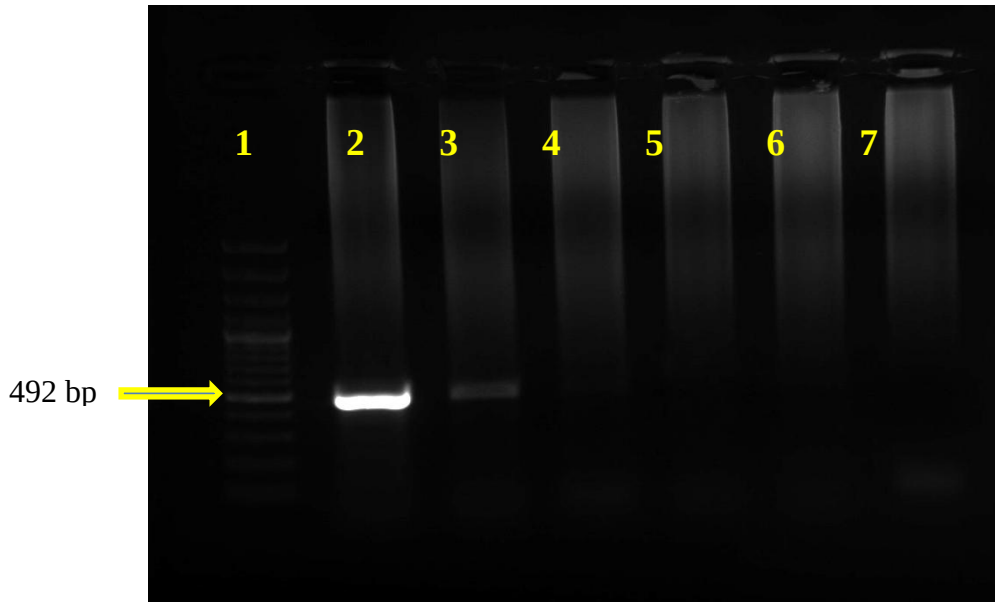
Şekil 3.10. EHV-5 TaqMan real time PCR için spesifisite tespiti amplifikasyon görüntüsü. [1: EHV-5 plazmid DNA, 2: EHV-5 viral DNA, 3: EHV-2, EHV-1, EHV-4 viral DNA'ları ve negatif kontroller.]

3.3.4. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Relatif Sensitivite

EHV-5 TaqMan real time PCR reaksiyonunda $3,54 \times 10^3/\mu\text{l}$ kopya miktarı ile pozitif bulunan göz akıntısı örneği logaritma 10 tabanına göre sulandırıldı ve daha önce yapılan plazmid sulandırmasının nested PCR reaksiyonunda gösterdiği sensitiviteye bağlı olarak beklenen relatif sensitivite tespit edildi. 35 kopya ve altı nested PCR reaksiyonu ile tespit edilemedi (Şekil 3.11 ve Şekil 3.12).



Şekil 3.11. EHV-5 TaqMan real time PCR plazmid sulandırılmaları nested PCR sensitivitesi agaroz jel görüntüsü. [1:3000 bp DNA merdiveni, 2:EHV-5 viral DNA 3: 10^6 , 4: 10^5 , 5: 10^4 , 6: 10^3 , 7: 10^2 , 8: 10^1 , 9,10: negatif kontroller].



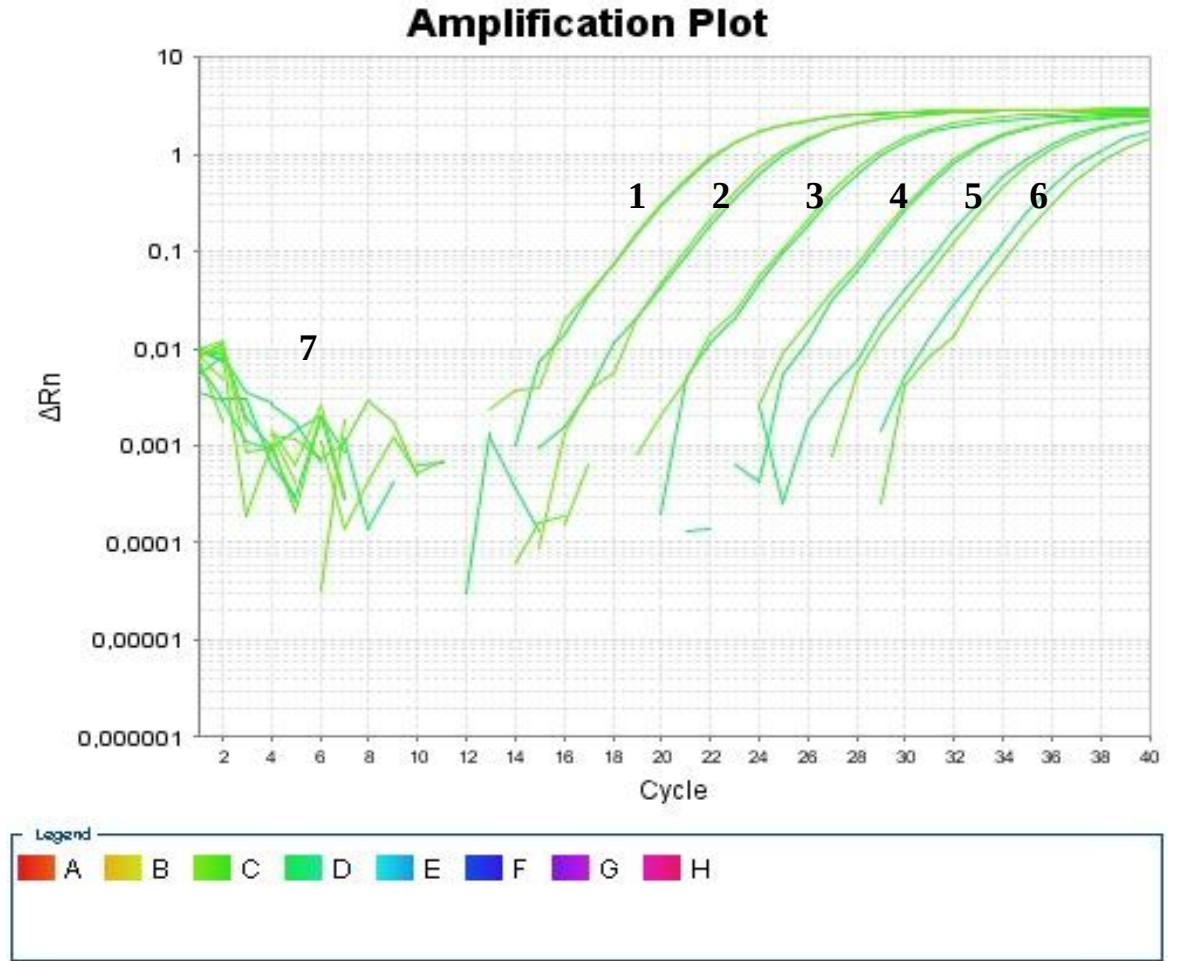
Şekil 3.12. Relatif sensitivite agaroz jel görüntüsü. EHV-5 TaqMan real time PCR reaksiyonunda $3,54 \times 10^3$ kopya miktarı ile pozitif bulunan göz akıntısı örneğinin logaritma 10 tabanı sulandırması. [1:3000 bp DNA merdiveni 1: $3,54 \times 10^3$, 2: $3,54 \times 10^2$, 3: $3,54 \times 10^1$, 4: $3,54 \times 10^0$, 5,6: negatif kontroller].

3.3.5. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Tespit Limiti Belirlenmesi

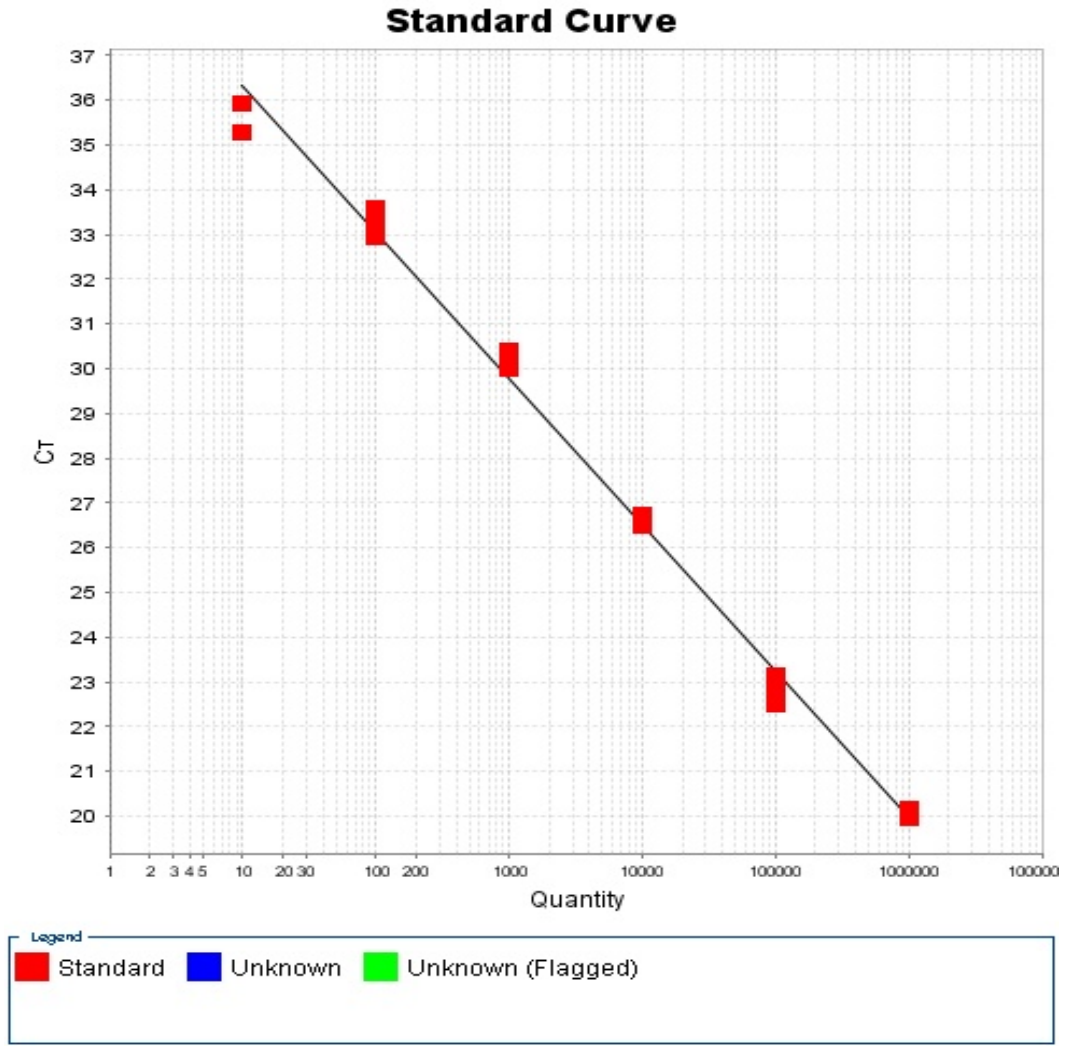
Tespit limiti belirlenmesine ilişkin olarak hesaplanan EHV-5 plazmid DNA kopya sayısının belirlenmesini takiben logaritma 10 tabanında gerçekleştirilen sulandırmalar negatif kontrollerle birlikte 4'er kez reaksiyona konularak tespit limiti 10 DNA molekülü olarak belirlendi (Çizelge 3.6). Bu amaçla gerçekleştirilen reaksiyonda slope: 3.272, y-inter: 39,586, R^2 : 0.994, Eff%: 102,118 değerleri içinde istenen verimlilikte sağlandı (Şekil 3.13 ve Şekil 3.14).

Çizelge 3.6. Logaritma on tabanına göre hazırlanan plazmid sulandırmalarının applied biosystems 7500/7500 fast real-time PCR sisteminde hesaplanan eşik değerleri ve kopya sayıları.

Hedef	Görev	Reporter	Quencher	Eşik Değer (C _T)	Eşik Değer Ortalama (C _T Mean)	Miktar
1	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	19,95902	19,95902	1000000
2	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	22,50556	22,50556	100000
3	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	26,509	26,509	10000
4	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	30,00956	30,00956	1000
5	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	33,29011	33,29011	100
6	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	35,94471	35,94471	10



Şekil 3.13. EHV-5 TaqMan real time PCR tespit limiti belirlenmesi sonucu oluşan ürünlerin amplifikasyon görüntüsü [1: 10^6 2: 10^5 3: 10^4 4: 10^3 5: 10^2 6: 10^1 7:negatif kontroller].



Şekil 3.14. EHV-5 TaqMan real time PCR tespit limiti belirlenmesi sonucu oluşan standart eğri [slope: 3.272, y-inter: 39,586, R^2 : 0.994, Eff%: 102,118].

3.3.6. EHV-5 TaqMan Real Time PCR Sonuçları

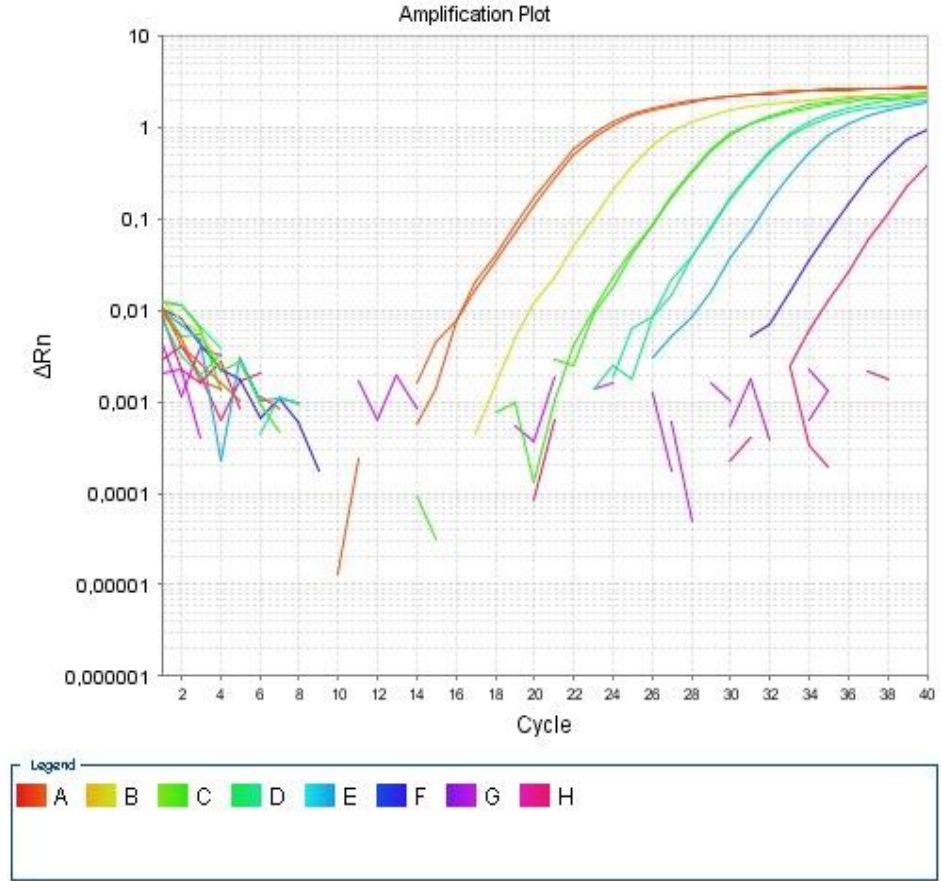
Nested PCR ile EHV-5 yönünden pozitif (17 adet) ya da negatif (34 adet) oldukları tespit toplam 51 adet kan, gözyaşı ve burun akıntısı örneği EHV-5 virusunun gB genine spesifik primerler ve probe kullanılarak real time PCR reaksiyonuna alındı. Tüm EHV-5 real-time PCR reaksiyonlarında siklus eşik değeri belirlenebilmesi amacıyla EHV-5 plazmid DNA'sı sulandırılmaları çift göz olarak konuldu (Şekil 3.16). Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR Sistem'de yaklaşık 40 dakika süren hızlı reaksiyonların ardından her reaksiyon için eşik değeri otomatik olarak tespit edildi (Şekil 3.17). Reaksiyon başında girilen standart eğri verilerine göre program tarafından reaksiyon sonunda örneklerin içerdiği DNA molekülü kopya sayıları hesaplandı (Şekil 3.15- Şekil 3.17) (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Eşik değeri tespiti amacıyla logaritma on tabanına göre hazırlanan plazmid sulandırılmalarının ve viral yükü tespit edilmek istenen örneklerin applied biosystems 7500/7500 fast real-time PCR sisteminde hesaplanan eşik değerleri ve kopya sayıları

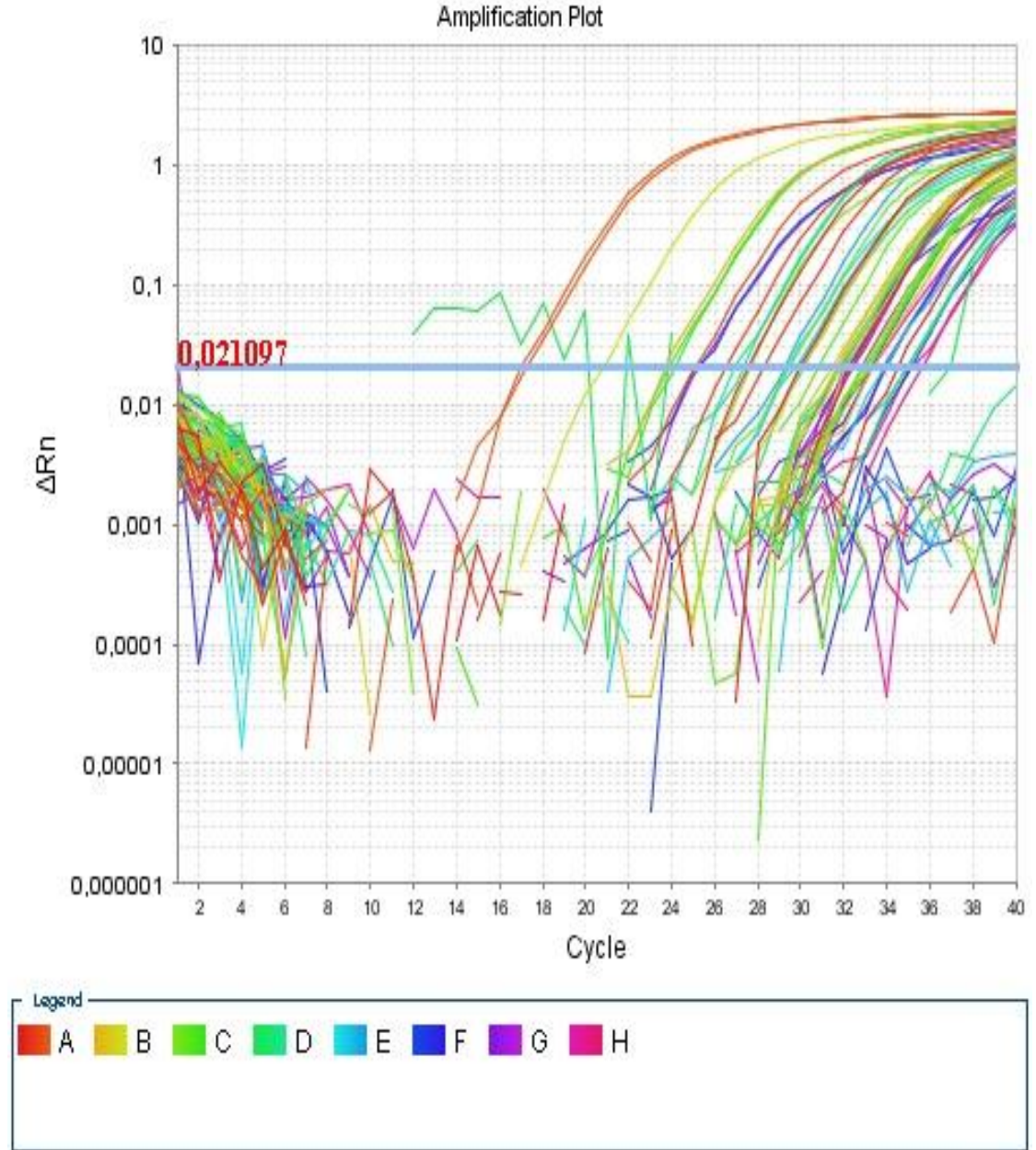
Göz	İsim	C _T (Eşik Değer)	C _T (Eşik Değer) SD	Kopya Sayısı	Kopya Sayısı SD	Sonuç
A1	52P	30,14369	3,005998	102,2458	1765,938	+
A2	52 OSW	34,64514	3,005998	3,817627	1765,938	-
A3	52 SW	27,60278	3,005998	654,0604	1765,938	+
A4	55 P	32,54192	3,005998	5,691226	1765,938	-
A5	55 OSW	28,40617	3,005998	363,7337	1765,938	+
A6	55 SW	26,64466	3,005998	1316,838	1765,938	+
A7	58 P	Undetermined	3,005998			-
A8	58 OSW	25,29176	3,005998	3537,284	1765,938	+
A9						
A10	STANDARD	17,41585	0,120807	1000000		
A11	STANDARD	17,24501	0,120807	1000000		
A12						
B1	58 SW	23,78658	3,005998	10619,67	1765,938	+
B2	60 P	33,53994	3,005998	8,557795	1765,938	-
B3	60 OSW	31,76002	3,005998	31,40129	1765,938	+
B4	60 SW	Undetermined	3,005998			-
B5	61 P	31,57525	3,005998	35,93832	1765,938	+
B6	61 OSW	30,33555	3,005998	88,87701	1765,938	+
B7	61 SW	32,31395	3,005998	20,95284	1765,938	+
B8	65 P	31,94217	3,005998	27,48981	1765,938	+
B9						
B10	STANDARD	20,87628		100000		
B11	STANDARD					
B12						
C1	65 OSW	32,95396	3,005998	13,12902	1765,938	+
C2	65 SW	27,70749	3,005998	605,9061	1765,938	+
C3	78 P	29,60588	3,005998	151,4388	1765,938	+
C4	78 OSW	33,19898	3,005998	10,97774	1765,938	+
C5	78 SW	30,90537	3,005998	58,61932	1765,938	+
C9						
C10	STANDARD	23,93983	0,267184	10000		
C11	STANDARD	24,31768	0,267184	10000		
C12						
D1	82 P	36,67859	3,005998	0,864539	1765,938	-
D2	82 OSW	31,95125	3,005998	27,30801	1765,938	+
D3	82 SW	Undetermined	3,005998			
D4	89 P	35,24995	3,005998	2,454407	1765,938	-
D5	89 OSW	Undetermined	3,005998			
D6	89 SW	31,89659	3,005998	28,42032	1765,938	+
D7	99P	30,19034	3,005998	98,82087	1765,938	+
D8	99 OSW	Undetermined	3,005998			
D9						
D10	STANDARD	27,40974	0,233603	1000		

D11	STANDARD	27,07937	0,233603	1000		
D12						
E1	99 SW	Undetermined	3,005998			
E2	100 P	29,55358	3,005998	157,3358	1765,938	+
E3	100 OSW	35,09153	3,005998	2,755496	1765,938	-
E4	100 SW	29,87573	3,005998	124,3494	1765,938	+
E5	101 P	33,94256	3,005998	6,377485	1765,938	-
E6	101 OSW	Undetermined	3,005998			
E7	101 SW	31,87016	3,005998	28,97419	1765,938	+
E9						
E10	STANDARD	29,4128		100		
E11	STANDARD					
E12						
F6	104 P	Undetermined	3,005998			
F7	104 OSW	33,99604	3,005998	6,133204	1765,938	-
F8	104 SW	Undetermined	3,005998			
F9						
F10	STANDARD					
F11	STANDARD	33,42809		10		
F12						
G1	105 P	32,57524	3,005998	17,31252	1765,938	+
G2	105 OSW	32,40073	3,005998	19,66601	1765,938	+
G3	105 SW	32,31604	3,005998	20,92082	1765,938	+
G4	106 P	32,33185	3,005998	20,68066	1765,938	+
G5	106 OSW	34,13503	3,005998	5,541158	1765,938	-
G6	106 SW	25,42833	3,005998	3201,484	1765,938	+
G7	115 P	Undetermined	3,005998			
G8	115 OSW	Undetermined	3,005998			
G9						
G10	NTC	Undetermined				
G11	NTC	Undetermined				
G12						
H1	115 SW	32,91875	3,005998	13,47103	1765,938	+
H2	116 P	35,51788	3,005998	2,018191	1765,938	-
H3	116 OSW	33,41047	3,005998	9,406537	1765,938	-
H4	116 SW	Undetermined	3,005998			-
H5						
H6						
H7						
H8						
H9						
H10	NTC	Undetermined				
H11	NTC	Undetermined				
H12						

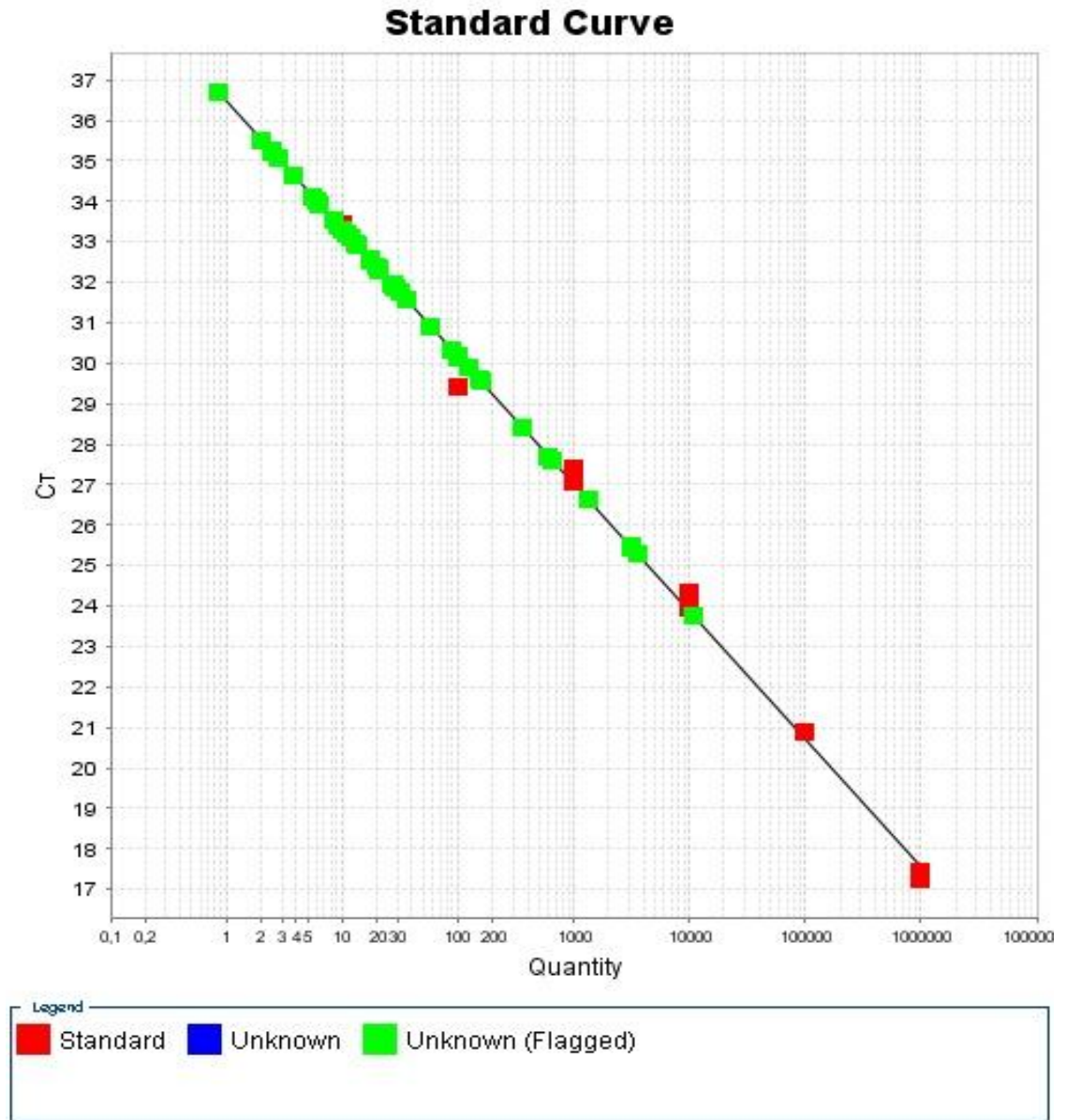
P: Periferik kan mononükleer hücreleri, OSW: Gözyaşı akıntısı, SW: Burun akıntısı



Şekil 3.15. EHV-5 TaqMan real time PCR reaksiyonuna alınan örneklerin standart eğrilerinin oluşturulması amacıyla hazırlanan sulandırmalara ait amplifikasyonlar.



Şekil 3.16. EHV-5 TaqMan real time PCR reaksiyonu eşik değerin belirlenmesi.



Şekil 3.17. EHV-5 TaqMan real time PCR reaksiyonuna alınan örneklerin standart eğri üzerindeki yerleşimi [slope: 3.153, y-inter: 36,479, R^2 : 0.995, Eff%: 107,586].

Saha materyallerine yapılan real time PCR sonrasında 17 periferel kan hücresinden 8'i (%47), 17 gözyaşı akıntısı örneğinden 9'u (%52,9), 17 burun akıntısı örneğinden 11'i (%64,7) olmak üzere toplam 51 materyalden 28'i (%54,9) EHV-5 pozitif bulundu. Real time PCR reaksiyonu amacıyla seçilen 51 materyalin nested PCR pozitiflik oranları değerlendirildiğinde periferel kan hücrelerinde pozitiflik oranı %35,2 (6/17) gözyaşı akıntılarında %11,7 (2/17), burun akıntılarında %52,9 (9/17) olarak tespit edildi. Testte alınan toplam 51 materyalin nested PCR ile pozitiflik oranı ise %33,33 olarak belirlendi (Çizelge 3.8). Elde edilen verilere göre örneklenen real time PCR testinin nested PCR testine göre daha yüksek sensitiviteye sahip olduğunu saptandı. Söz konusu 51 test materyalinin viral DNA yükleri (Çizelge 3.9) ile elde edilen sonuçlar arasında bir ilişki saptanmadı.

Materyal sağlanan 17 at yönünden nested ve real time PCR sonuçları değerlendirildiğinde, söz konusu hayvanlarda EHV-5 pozitiflik oranı sırasıyla %70,58 (12/17) ve %88,23 (15/17) olarak belirlendi.

Çizelge 3.8. TaqMan real time PCR ve nested PCR testinde EHV-5 pozitifliği araştırılan örneklerin karşılaştırmalı sonuçları

No		EHV-5 Nested PCR			EHV-5 TaqMan real time PCR		
		PBMC	Gözyaşı Akıntısı	Burun Akıntısı	PBMC	Gözyaşı Akıntısı	Burun Akıntısı
1	SÜT EMEN TAY	+	-	+	+	-	+
2	SÜT EMEN TAY	-	+	+	-	+	+
3	SÜT EMEN TAY	-	+	+	-	+	+
4	AYGIR	-	-	-	-	+	-
5	AYGIR	+	-	-	+	+	+
6	TAY	-	-	+	+	+	+
7	TAY	+	-	+	+	+	+
8	TAY	-	-	-	-	+	-
9	KISRAK	-	-	+	-	-	+
10	TAY	+	-	-	+	-	-
11	TAY	+	-	-	+	-	+
12	TAY	-	-	+	-	-	+
13	KISRAK	-	-	-	-	-	-
14	TAY	+	-	+	+	+	+
15	TAY	-	-	+	+	-	+
16	KISRAK	-	-	-	-	-	-
17	KISRAK	-	-	-	-	+	-
TOPLAM (51)		6(%35,2)	2(%11,7)	9(%52,9)	8(%47)	9(%52,9)	11(%64,7)
		17/51 (%33,3)			28/51 (%54,9)		

Çizelge 3.9. TaqMan real time PCR reaksiyonuna alınan örneklerin viral DNA yükleri (ng/μl) ve kopya sayıları

		PBMC	Gözyaşı Akıntısı	Burun Akıntısı
1	SÜT EMEN TAY	668,12 ng/μl 102,2458 kopya/ μl	201,27 ng/μl 3,817627 kopya/ μl	202,02 ng/μl 654,0604 kopya/ μl
2	SÜT EMEN TAY	302,68 ng/μl 5,691226 kopya/ μl	206,45 ng/μl 363,7337 kopya/ μl	210,55 ng/μl 1316,838 kopya/ μl
3	SÜT EMEN TAY	616,45 ng/μl Tespit edilemedi	178,92 ng/μl 3537,284 kopya/ μl	216,72 ng/μl 10619,67 kopya/ μl
4	AYGIR	756,54 ng/μl 8,557795 kopya/ μl	189,88 ng/μl 31,40129kopya/ μl	214,41 ng/μl Tespit edilemedi
5	AYGIR	573,79 ng/μl 35,93832 kopya/ μl	216,04 ng/μl 88,87701 kopya/ μl	125,36 ng/μl 20,95284 kopya/ μl
6	TAY	485,88 ng/μl 27,48981 kopya/ μl	228,4 ng/μl 13,12902 kopya/ μl	211,04 ng/μl 605,9061 kopya/ μl
7	TAY	121,51 ng/μl 151,4388 kopya/ μl	175,78 ng/μl 10,97774 kopya/ μl	203,53 ng/μl 58,61932 kopya/ μl
8	TAY	217,33 ng/μl 0,864539 kopya/ μl	113,46 ng/μl 27,30801 kopya/ μl	211,18 ng/μl Tespit edilemedi
9	KISRAK	117,93 ng/μl 2,454407 kopya/ μl	192,21 ng/μl Tespit edilemedi	167,52 ng/μl 28,42032 kopya/ μl
10	TAY	201,33 ng/μl 98,82087 kopya/ μl	230,09 ng/μl Tespit edilemedi	201,33 ng/μl Tespit edilemedi
11	TAY	212,63 ng/μl 157,3358 kopya/ μl	232,26 ng/μl 2,755496 kopya/ μl	212,63 ng/μl 124,3494 kopya/ μl
12	TAY	300,42 ng/μl 6,377485 kopya/ μl	181,6 ng/μl Tespit edilemedi	300,42 ng/μl 28,97419 kopya/ μl
13	KISRAK	212,27 ng/μl Tespit edilemedi	220,9 ng/μl 6,133204 kopya/ μl	212,27 ng/μl Tespit edilemedi
14	TAY	217,38 ng/μl 17,31252 kopya/ μl	221,87 ng/μl 19,66601 kopya/ μl	217,38 ng/μl 20,92082 kopya/ μl
15	TAY	208,25 ng/μl 20,68066 kopya/ μl	242,99 ng/μl 5,541158 kopya/ μl	208,25 ng/μl 3201,484 kopya/ μl
16	KISRAK	248,78 ng/μl Tespit edilemedi	216,75 ng/μl Tespit edilemedi	248,78 ng/μl 13,47103 kopya/ μl
17	KISRAK	233,47 ng/μl 2,018191 kopya/ μl	232,86 ng/μl 9,406537 kopya/ μl	233,47 ng/μl Tespit edilemedi

4. TARTIŞMA

EHV-2 keratokonjunktivitis, pneumoni, faranjit, ateş, büyümüş lenf nodülleri, iştahsızlık, halsizlik ve yarışlarda düşük performans gibi farklı klinik semptom gösteren atlardan sıklıkla izole edilmektedir (Thein ve ark., 1976; Browning ve ark. 1987b; Agius ve ark. 1994; Borchers ve ark., 1997; Torfason ve ark. 2008; Fortier ve ark., 2009). Bununla birlikte klinik olarak sağlıklı atlardan da EHV-2 tespiti birçok çalışmada bildirilmiştir. Özellikle genç taylarda daha yaygın olarak görülen bu enfeksiyonun prevalansı coğrafya, yetiştirme şekilleri (hayvanat bahçesinde bulunan atlar, yarış atı, vb) gibi farklılıklara rağmen, yapılan birçok çalışmada (Plummer ve Waterson, 1963; Fu ve ark., 1986; Browning ve Studdert, 1987b; Telford ve ark., 1993; Collinson ve ark., 1994; Craig ve ark., 2005) yüksek oranda saptanmaktadır. Bu durumun muhtemel nedenlerinin başında virusun persiste enfeksiyon şekillendirebilmesi, persiste enfekte atlarının genetik olarak farklı bir başka EHV-2 suşu ile yeniden enfekte olabilmesinden ileri gelmektedir (Blakeslee ve ark. 1975; Browning ve Studdert, 1987a; Drummer ve ark. 1996). EHV-2'nin heterojenitesinin araştırıldığı bir çalışma (Browning ve ark., 1987a) aracılığıyla saptanan EHV-5'de üst solunum sistemi enfeksiyonu bulgularına sahip ya da sağlıklı görümlü hayvanlardan sıklıkla saptanmaktadır (Bell ve ark., 2006a; Borchers ve ark., 1999; Fortier ve ark., 2009; Torfason ve ark., 2008; Marenzoni ve ark., 2011; Herder ve ark., 2012). Bundan başka multinodüler fibroz, dermatit olgularından saptandığına dair bildirimler de (Verryken ve ark., 2010; König ve ark. 2011; Marenzoni ve ark., 2011) bulunmaktadır.

Türkiye'de EHV-2 ve EHV-5 enfeksiyonlarına ilişkin sınırlı sayıda çalışma (Bilge-Dağalp ve ark. 2009, Ataseven ve ark., 2010a) bulunmaktadır. Bu çalışmalarda PCR yöntemi kullanılarak sözkonusu etkenler sorgulanmış ve elde edilen amplikonların dizin analizleri yapılarak, etkenlerin moleküler karakterizasyonu bildirilmiştir.

Sunulan bu çalışmada Eskişehir, Malatya ve Bursa illerinde bulunan kamuya ait 3 arap atı yetiştiriciliği işletmesindeki yarış atlarından sağlanan kan, gözyaşı ve burun akıntısı örneklerinin nested PCR yöntemiyle EHV-2 ve EHV-5 virusları varlığı ve yaygınlığı yönünden araştırılması; kan örneklerinin ED ve RK-13 hücre hatları ile kokültivasyonu yapılarak etken izolasyonu ve EHV-5'in daha hızlı, güvenli ve kantitatif tanısına yönelik olarak TaqMan real time PCR tekniği geliştirilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

İzolasyon çalışmasına alınan kan örneklerinden (165 adet) ED ve RK-13 hücre hatlarında, en fazla 3. pasaj uygulaması sonrasında CPE oluşumu gösteren 37'sinden (%22,42) virus izolasyonu gerçekleştirilmiş; izolatlar EHV-2 ve EHV-5 yönünden yapılan nested PCR sonrasında EHV-2 olarak identifiye edilmiştir. Araştırmada kullanılan hücre hatları EHV-2 izolasyonu için birçok araştırmacı (Borchers ve ark. 1999; Dunowska ve ark. 2000; Bell ve ark., 2006a; Ataseven ve ark. 2010) tarafından önerilen hücre hatları olup, bu çalışmada hücre hatlarının virus izolasyonunun başarısında bir farklılık yaratmadığı saptanmıştır. Bu çalışmada, daha önce bazı araştırmacılar (Dunowska ve ark. 1999 ve Torfason ve ark. 2008) tarafından bildirilenlere benzer olarak, nested PCR ile EHV-2 ve/veya EHV-5 yönünden pozitif bulunan örneklerin hiçbirisinden EHV-5 izolasyonu yapılamamıştır. PCR testleriyle tespiti gerçekleştirilemeyen equine gammaherpesvirusların kan hücrelerinin duyarlı hücrelerle kokültivasyonu sonucu, ilerleyen pasajlarda izolasyonunun gerçekleştirilebildiği bilinmektedir (Franchini ve ark. 1977). Bu çalışmada izolasyonu gerçekleştirilen 37 adet EHV-2 izolatından Bursa'daki III nolu işletmeden sağlanan 2 tanesi nested PCR reaksiyonunda negatif bulunmuş, ED ve RK hücre kültürlerinde yapılan ilerleyen pasajlarında üretilerek virus izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

EHV-2 ve EHV-5 enfeksiyonlarının prevalansının sorgulanması amacıyla kan, gözyaşı ve burun akıntısı örnekleri kullanılarak uygulanan nested PCR sonuçları değerlendirildiğinde, EHV-2 ve EHV-5 prevalansı materyal temin edilen işletmeler (I, II ve III nolu işletme) için sırasıyla %75,5, %64,15, %43,28 ve %57,7, %67,92,

%61,19; örneklenen populasyon için ise sırasıyla %58,78 (97/165) ve %62,42 (103/165) olarak belirlendi. Bu oranlar sözkonusu enfeksiyonların prevalansının bildirildiği birçok araştırma (Browning ve Studdert, 1987b; Telford ve ark., 1993; Agius ve Studdert, 1994; Collinson ve ark., 1994; Nordengrahn ve ark., 2002; Torfason ve ark., 2008) verileri ile benzer şekilde, enfeksiyonunun varlığı saptanan işletmelerde genellikle yüksek prevalansa sahip olduğunu ortaya koydu.

EHV-2'nin, *R. equi* için solunum yoluna invazyonunda predispoze faktör olarak rol aldığı son yıllarda bilim insanlarınca kabul gören bir yaklaşımdır. Nitekim, EHV-2'ye karşı pasif ve aktif immunizasyon kullanılarak, virusun bakteriyel invazyonu başlatmak için kullandığı tetikleme mekanizmasının gösterildiği çalışmada (Pálfi ve ark. 1978; Belák ve ark. 1980; Nordengrahn ve ark. 1996), EHV-2'ye karşı aşılama yapılmasının *R. equi*'ye bağlı pneumöni oluşumunu engellediğini (Nordengrahn ve ark., 1996) bildirilmiştir. Dunowska ve ark. (2011), taylarda EHV-2 enfeksiyon kinetiğinin belirlenmesi ve EHV-2 enfeksiyonunun *R. equi*'ye bağlı gelişen pneumonilerdeki rolünün araştırıldığı çalışmada, iki olgu arasında pozitif bir ilişki gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Benzer olarak, Brault ve ark. (2010), EHV-2 genotipleri ve üst solunum yolu semptomları arasında istatistiksel olarak belirgin bir fark bulunmamış olmakla birlikte, EHV-2 varlığının, *R. equi*'ye bağlı olduğu düşünülen pneumoni olgularında daha yaygın olarak saptandığını bildirmişlerdir. Araştırmanın yürütüldüğü işletmelerde *R. equi* enfeksiyonunun yaygın olduğu bilgisinden hareketle ve elde edilen verilerin bu çalışmada materyal sağlanan işletmelerde *R. equi* kaynaklı üst solunum yolu enfeksiyonlarının değerlendirilmesi ve önlenmesi için yapılacak çalışmalar yönünden de önemli olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda, işletmelerden izole edilen viruslar kullanılarak, aşı geliştirme amaçlı yapılacak çalışmaların sözkonusu işletmeler yanı sıra ülkemizde at yetiştiriciliği işletmelerine önemli katkılar sağlama potansiyeli bulunmaktadır.

Bu çalışmada belirlenen EHV-5 prevalansı (%62,42) EHV-2 prevalansından (%58,78) yüksek bulunmuştur. Türkiye'de daha önce bildirilen bir çalışmada da

(Ataseven ve ark. 2010a) benzer bulgular (EHV-5 için %21,9, EHV-2 için %19,2) bildirilmesine karşın, dünyada yapılan birçok çalışmada (Borchers ve ark., 1999; Nordengrahn ve ark., 2002; Bell ve ark., 2006b; Torfason ve ark., 2008) EHV-2 prevalansı EHV-5 prevalansına oranla daha yüksek olarak belirlenmiştir. Ülkemizde daha önce bildirilen çalışmanın az sayıdaki at popülasyonuna ait verileri içeriyor olması, bu çalışmada sağlanan sonuçların da at popülasyonu/yetiştiriciliği işletmelerini sınırlı oranda temsil ediyor olduğu düşünüldüğünde, bu konudaki verilerin yeni çalışmalar ile geliştirilme ihtiyacında olduğu ortaya çıkmaktadır.

Nested PCR ile elde edilen veriler, örneklenen popülasyonda her iki etken yönünden pozitiflik oranının %45,45 (75/165) olduğunu göstermiştir. Atlarda gammaherpesvirusların sorgulandığı birçok çalışmada (Nordengrahn ve ark. 2002; Diallo ve ark. 2008, Reubel ve ark., 1995; Torfason ve ark., 2008), örneklenen hayvanlarda her iki virusun sıklıkla tespit edildiği bildirilmiştir. Bu durumun muhtemel nedeni enfeksiyonların latentlik oluşturmaları ve her birinin oldukça yaygın olarak saptanıyor olmasıdır. EHV-2 ve EHV-5 enfeksiyonların sıklıkla birlikte tespitlerinde, olası başka mekanizmaların varlığı konusu ise halen sorgulanma ihtiyacındadır.

Bilindiği üzere tanı çalışmalarında uygun yöntem seçimi kadar önemli bir diğer konu da uygun tanı materyalinin seçimidir. Bu çalışmada 3 farklı materyal kullanılarak, enfeksiyonların varlığı/prevalansı araştırılmıştır. Örneklenen hayvanlarda nested PCR ile EHV-2 için pozitiflik oranı periferik kan hücrelerinde %47,87 (79/165), gözyaşı akıntılarında %26,06 (43/165) ve burun akıntılarında %24,24 (40/165), EHV-5 için pozitiflik oranı periferik kan hücrelerinde %49,09 (81/165), gözyaşı akıntılarında %20 (33/165), burun akıntılarında %41,21 (68/165) olarak tespit edilmiş olup, bulgular birçok araştırmacı (Dunowska ve ark., 1999; Wang ve ark., 2007) tarafından daha önce bildirilenlere benzer olarak, her iki enfeksiyon için de kan örneklerinin pozitiflik oranlarının diğer materyallere oranla daha yüksek olduğunu göstermektedir. Diğer yandan, EHV-2'nin EHV-5'e kıyasla özellikle tatlarda burun akıntısıyla daha uzun süre saçıldığını bildiren çalışmalar (Edington ve

ark.,1994; Murray et al., 1996; Dunowska et al., 2002; Nordengrahn et al., 2002; Bell et al., 2006b; Fortier ve ark. 2009) bulunmasına karşın, bu çalışmada burun akıntılarında EHV-5 pozitiflik oranı EHV-2'ye göre daha yüksek oranda tespit edilmiştir (Çizelge 3.4).

Birçok enfeksiyonun epidemiyolojisinde yaş, sorgulanması gereken önemli faktörlerdendir. Dunowska ve ark. (2011), 43 tay üzerinde real time PCR yöntemi kullanarak yürüttükleri çalışmada, iki aylığa kadar olan tayların %88'ini EHV-2 yönünden pozitif bulunmuşlar ve tayların %86'sının daha sonra yapılan ardışık örneklemelerde virus ile enfekte olduğunu saptamışlardır. EHV-2 suşları arasındaki heterojenite ve farklı genotipler ile tekrarlayan enfeksiyonların oluşumu göz önünde bulundurulması gereken bir yaklaşım olmakla birlikte, araştırmanın niteliği düşünülerek bu durum gammaherpesvirus enfeksiyonlarında latent enfeksiyon oluşması ile açıklanmıştır. Benzer şekilde EHV-5'in de taylarda erişkin atlara oranla daha yüksek olduğu çalışmalar (Marenzoni ve ark., 2010) bildirilmiştir. Bu çalışmada örneklenen materyallerin en az birisi için pozitiflik saptanması kriter alınarak, erişkin at (kısırak ve aygır), tay (1-3 yaşlı), süt emen taylarda belirlenen pozitiflik oranları EHV-2 sırasıyla %36,6, %65,57, %93,93 ve EHV-5 için sırasıyla %38,0, %77,04, %87,87 olarak belirlenmiş olup (Çizelge 3.4), veriler her iki enfeksiyonun da taylarda en yüksek oranda olduğunu göstermektedir.

Doğaldır ki örneklenen hayvanların yaşları ile kullanılan tanı materyalleri de bazı farklılıkları ortaya koyabilmektedir. Nitekim Marenzoni ve ark., (2010); yaşa bağlı EHV-5 görülme sıklığının araştırıldığı bir çalışmada, taylarda burun akıntısı ve kan örneklerinde sırasıyla %73,3 ve %80 oranlarında, erişkin atlarda ise (4-17 yaşında) burun akıntısı ve kan örneklerinde sırasıyla %40 ve %20 oranında pozitiflik bildirmişlerdir. Benzer şekilde yaş ile tanı materyali ilişkisi birçok çalışmada (Brault ve ark., 2010; Dunowska ve ark., 2011; Fu ve ark., 1986; Murray ve ark., 1996; Nordengrahn ve ark., 2002; Bell ve ark., 2006b; Brault ve ark., 2010). sorgulanmıştır. Brault ve ark. (2010), üç aylık taylara ait burun akıntılarında en

yüksek miktarda viral DNA tespiti ettiklerini ve EHV-2'nin tespitinde burun akıntısı örnekleri ile yaş arasında pozitif bir ilişkinin varlığını bildirmişlerdir.

Yakın ilişkili EHV-2 ve EHV-5 enfeksiyonlarının, antikor tespitine dayalı tanı yöntemleri ile ayırıcı tanısı yapılamamaktadır. Bu nedenle gammaherpesvirusların tespitinde her iki virusun ayrımının gerçekleştirilmesine olanak sağlayan, özellikle virusun gB gen bölgesinin çoğaltılmasının hedef alındığı PCR yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Reubel ve ark., 1995). Bundan başka her iki virusun gH gen bölgesine yönelik PCR uygulamaları da (Nordengrahn ve ark. 2002) bildirilmiştir. Bu çalışmada EHV-2 ve EHV-5 tanısı, prevalanslarının belirlenmesi amacıyla, söz konusu virusların gB gen bölgesinin çoğaltılmasının amaçlandığı nested PCR yöntemi kullanılmıştır. Bununla birlikte PCR uygulamalarının birçok bileşenden önemli şekilde etkilendiği bilinmektedir. Bu nedenle temel prensipleri ile söz konusu yöntemler esas alınmış olmakla birlikte, kullanılan bileşenlerin miktarı, vb konusunda bazı modifikasyonlar yapılmıştır.

Son yıllarda birçok enfeksiyonun tanısı için real time PCR yöntemlerinin geliştirilmesi ve kullanılması yönündeki çalışmalar hızla sürdürülmektedir. Bu bağlamda EHV-2 tespiti için de real time PCR yöntemi geliştirilmiştir (Brault ve ark., 2010; Dunowska ve ark., 2011). Yapılan literatür incelemesinde, EHV-5 enfeksiyonu için real time PCR yönteminin tanımlandığı bir çalışmanın bulunmadığı görülerek, bu çalışmanın önemli amaçlarından birisi olarak EHV-5 enfeksiyonu tanısı için, kantitatif değerlendirmelere olanak sağlayan ve bu nedenle özellikle enfeksiyonun patogenezinin araştırılması için yapılabilecek çalışmalarda yaygın kullanım olanağı bulacağı düşünülen, TaqMan real time PCR yönteminin geliştirilmesi planlanmıştır. Bu bağlamda, real time PCR optimizasyonu için, primer ve probe tasarımı, tasarımı yapılan primer ve probe etkinliğinin belirlenmesi ve nested PCR ile EHV-5 yönünden verileri elde edilmiş saha örneklerinin real time PCR ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bu çalışma kapsamında öncelikle, gen bankasında tüm sekans bilgileri bulunan EHV-5 suşlarının hizalamsı gerçekleştirilerek, virusun gB gen bölgesinin

çoğaltılmasına yönelik primer ve probe tasarımı gerçekleştirilmiştir. Real time PCR optimizasyonu, pGEM-T klonlama sistemiyle üretilen EHV-5 plazmidleri aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Özellikle EHV-2 ile yakın antijenik ilişkili olan EHV-5'in tespitinde MGB probe kullanılan TaqMan real time PCR geliştirilmesi tercih edilmiştir.

Real time PCR düşük kopya miktarlarını tespit edebilen, floresan boya miktarının belirlenmesine dayalı bir yöntem olup, belirgin şekilde artış görülen logaritmik fazda PCR ürününü görüntülemeye imkan vermektedir. TaqMan real time probelar PCR ürününün iç bölgesine bağlanacak şekilde tasarlanmış olup, diğer bazı probe (SYBR Green) seçimlerine kıyasla daha yüksek spesifisite göstermektedirler. TaqMan probelar DNA amplifikasyonunda sıklıkla tercih edilen hidroliz probe özelliği göstererek floresan ve quencher boya arasında gerçekleşen floresan rezonans enerji transferini (FRET) nükleaz aktivitesi ile engeller ve serbest kalan raportör boyanın ışıma vermesini sağlar.

Bu çalışmada kullanılan TaqMan MGB probe ise VIC ve NFQ boylarıyla işaretlenmiş olup, beş uyumsuz baz içeren bir kombinasyonu tasarlanmıştır. MGB probelar Tm derecesini arttırarak, hibridizasyonu stabil hale getirmektedir. Standart TaqMan probelara göre daha kısa probelardır. Bu sayede uzun probelaların uyumsuz baz ayrımlarındaki düşük sensitivite probleminin önüne geçilebilmektedir. MGB probelar aynı zamanda arka plandaki floresan ışımayı da azaltarak daha yüksek verimlilik sağlamaktadırlar (Kutyavin ve ark. 2000).

EHV-2 ve EHV-5 kullanılarak testin spesifite ve sensitivitesi belirlendikten sonra, saha örneklerindeki etkinliği sorgulanmıştır. Toplam 51 saha materyaline uygulanan nested PCR ile %33,3 (17/51) olarak belirlenen pozitiflik oranına karşın, real time PCR sonrasında pozitiflik oranı %54,9 (28/51) olarak belirlenmiştir. Test materyallerine ilgili veriler karşılaştırıldığında, nested PCR ile pozitif bulunan örneklerin tamamının real time PCR reaksiyonunda da pozitif sonuç verdiği; buna

karşın nested PCR ile EHV-5 için “negatif “ olarak değerlendirilen 11 örneğin real time PCR’da “pozitif” olduğu saptanmıştır. Bundan başka nested PCR ile yapılan çalışmalar sonucunda EHV-5 varlığı saptanmayan 3 at real time PCR ile EHV-5 yönünden pozitif bulunmuştur. Nested PCR ile EHV-5 tespiti gerçekleştirilemeyen örneklerde, 10-35 kopya arasındaki viral yükün real time reaksiyonunda “pozitif “ olarak tespiti neden olduğu belirlenmiştir. Bu durum birçok enfeksiyonun tanısında real time PCR’ın diğer PCR’lara (PCR, RT-PCR, nested PCR, vb) oranla daha yüksek duyarlıkta ve tanısal değerinin daha yüksek olduğu yönündeki bildirimler ile benzer şekilde, bu çalışma kapsamında geliştirilen real time PCR’ın yüksek duyarlıkta olduğunu ortaya koymuştur.

Bu bilgilerden özetle, EHV-5’in tanısı amacıyla, ilk kez bu çalışma kapsamında geliştirilen real time PCR testinin, PCR ile teşhisin getirdiği jelde görüntüleme gereğini ve kanserojen olan etidyum bromide kullanımını da ortadan kaldırması yanısıra, sözkonusu enfeksiyonun tanısında yaygın olarak kullanılan nested PCR testine göre duyarlı ve güvenilir bir yöntem olduğu saptanmıştır. Bu yöntemin iş yükünü azaltması, kantitatif değerlendirmeye imkan tanınması, düşük viral yükleri tespit edebilmesi nedeniyle EHV-5 enfeksiyonunun tanısında kullanılmasının hem araştırmacılar açısından kolaylık sağlayacağı, hem de tanıda nicel nitelikte daha spesifik sonuçları ortaya koyması açısından önemli bir avantaj sağlayabileceği kanaatine varılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ülkemizde yarış atı yetiştiriciliği yapılan kamuya ait işletmelerde EHV-2 ve EHV-5 enfeksiyonlarının varlığının ve yaygınlığının sorgulanması, enfekte bireylerden etken izolasyonu ve EHV5 enfeksiyonunun tanısına yönelik TaqMan real time PCR geliştirilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen verilere göre;

- Materyal temin edilen işletmelerde sözkonusu enfeksiyonların yüksek oranda varlığı belirlenmiştir. Ayrıca genç hayvanlarda sözkonusu enfeksiyonlar daha yüksek oranda saptanmıştır.
- Virus izolasyonu için kan örneklerinin kokültivasyonu amacıyla kullanılan RK-13 ve ED hücrelerinin benzer duyarlılıkta olduğu; örneklerin sıklıkla 2. ve 3. pasaj aşamasında CPE oluşturdıkları gözlenmiştir.
- EHV-2 ve EHV-5 tanısında, nested PCR yönteminin virus izolasyonundan daha duyarlı olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte virus izolasyonunun, patogeneze ve biyolojik ürün geliştirme çalışmaları için göz ardı edilemez olduğu bir gerçektir.
- EHV-2 ve EHV-5 enfeksiyonlarının tanısında, farklı klinik örneklerin kullanılabilirliğinin olduğu, bununla birlikte özellikle tatlarda kan ve burun akıntısı örneklerinin tanısal değerin daha yüksek olduğu görülmüştür.

- Bu çalışma kapsamında, bilindiği kadarıyla EHV-5 tanısı amacıyla daha önce tanımlanmamış olan, real time PCR geliştirilmiş ve saha örneklerinde tanısal etkinliği değerlendirilmiştir. Bildirilen yöntemin bu konuda yapılacak birçok çalışmada, hızlı, kantitatif, kısa sürede sonuç veren ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılacağı kanaatine varılmıştır. Bu çalışmada EHV-5 tanısı için geliştirilen real time PCR'daki yaklaşım ve deneyimlerin, farklı hastalıkların tanısı için yöntem geliştirme çalışmaları yönünden de değerlendirilebilirliği olduğu düşünülmektedir.
- Atların gammaherpesvirus enfeksiyonlarına ilgili çalışmalarda, ırk ile enfeksiyona duyarlılık arasında bir ilişki sorgulanmamıştır. Bununla birlikte muhtemelen araştırmacıların bulundukları coğrafyada sıklıkla yetiştiriliyor olmaları nedeniyle, İngiliz atlarında elde edilmiş veriler bulunmaktadır. Bu çalışmada elde edilen veriler, Türkiye'de bir sektör haline gelen at yetiştiriciliğinin önemli yapı taşlarından olan işletmelere ilgi veriler olmaları yanı sıra, arap atlarında gammaherpesvirusların varlığı ve prevalansına ilişkin ülkemizdeki ilk verilerdir. Bu bağlamda farklı ırk, yetiştirme şekli, vb. yönünden yapılacak yeni çalışmalar için kaynak oluşturur niteliktedirler.

Bu bilgilerden hareketle;

- Atların solunum sistemi patojeni olarak son yıllarda üzerinde durulan, bazı viral ve bakteriyel enfeksiyonların (özellikle *R. equi*) hazırlayıcı faktörü de olduğu bilinen EHV-2 enfeksiyonunun daha geniş popülasyonlar için sorgulanması, benzeri çalışmaların EHV-5 için de gerçekleştirilmesi,
- Söz konusu enfeksiyonların patogeneze ilişkin bilgilerin sınırlı olduğu düşünülerek farklı yaş, yetiştirme şekilleri, diğer enfeksiyonların varlığı, vb. kriterler dikkate alınarak deneysel/doğal enfeksiyonların sorgulanması, nekropsi örneklerinin değerlendirilmesi,

- Özellikle EHV-2 için farklı genotiplerin varlığı ve farklı genotipler ile reenfeksiyonların geliştiği bilgisinden hareketle, saha viruslarının izolasyonu ve moleküler karakterizasyonun yapıldığı çalışmalar önerilmektedir.

ÖZET

At Yetiştiriciliği İşletmelerinde EHV-2 ve EHV-5 Enfeksiyonlarının Araştırılması ve Tanısal EHV-5 TaqMan real time PCR Tekniğinin Geliştirilmesi

Bu çalışmada, Türkiye’de kamuya ait üç büyük işletmedeki arap yarış atlarında nested PCR tekniği kullanılarak EHV-2 ve EHV-5 enfeksiyonlarının varlığı ve yaygınlığının belirlenmesi, yerel saha izolatlarının elde edilmesi ve tanısal EHV-5 real-time PCR geliştirilmesi amaçlandı. Eskişehir, Malatya ve Bursa ’da yerleşik kamuya ait 3 at yetiştiriciliği işletmesinde bulunan 165 erişkin at ve taya ait kan, gözyaşı ve burun akıntısı örneği (toplam 495 örnek) araştırma materyalini oluşturdu. Tanı materyallerinin tümü nested PCR metoduyla EHV-2 ve EHV-5 yönünden test edildi. Kan örneklerinden elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerin ED ve RK-13 hücre hatları ile kokültivasyonları gerçekleştirilerek, virus izolasyonu çalışması yapıldı. Bu çalışmada ayrıca EHV-5 tanısına yönelik hızlı ve duyarlı bir teşhis metodu olan EHV-5 real-time PCR geliştirildi.

Araştırmada örneklenen atlarda EHV-2 ve EHV-5 için pozitiflik oranı sırasıyla %58,78 ve %62,42 olarak belirlendi. Örneklenen atların %45,45’nin her iki etken ile enfekte olduğu saptandı. Örneklenen işletmelerde, kullanılan tanı materyallerinde, örneklenen hayvanların yaşlarına göre EHV-2 ve EHV-5 pozitiflik oranları belirlendi ve literatür verilerine göre yorumlandı. Virus izolasyon çalışmasına alınan kan örneklerinden 37 adedi ED ve RK-13 hücre hatlarında CPE oluşturdu. İzolatların tümü EHV-2 olarak tanımlandı. EHV-5 tanısına yönelik tasarlanan primerler ve MGB probe’un, klonlanan plazmidlerle EHV-5 real-time PCR için optimizasyonun gerçekleştirilmesinin ardından tespit limiti, spesifisite ve relatif sensitivite çalışmaları yapılarak geliştirilen real time PCR’ın saha örneklerinde yüksek duyarlılıkta ve güvenle kullanılabileceği belirlendi. Saha örneklerinde real time PCR ve nested PCR pozitiflik oranı sırasıyla %54,9 ve %33,3 olarak saptandı.

Elde edilen veriler EHV-2 ve EHV-5 enfeksiyonlarının örneklenen at yetiştiriciliği işletmelerinde yüksek prevalansa sahip olduğunu, enfeksiyonun taylarda daha yüksek oranda seyrettiğini ortaya koydu. Ayrıca EHV-5 enfeksiyonu tanısı için geliştirilen EHV-5 TaqMan real time PCR’ın günümüzde kullanılan moleküler tekniklerin yerine/beraber kullanılabilecek güvenli, hızlı ve hassas bir teknik olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: EHV-2, EHV-5, nested PCR, real-time PCR, kokültivasyon.

SUMMARY

The Investigation of EHV-2 and EHV-5 Infections in Stud Farms and Development of the Diagnostic EHV-5 TaqMan real time PCR.

In this study it was aimed to investigate EHV-2 and EHV-5 presence/ prevalence by type specific nested PCR in three state owned stud farms that have the arabian race horses, obtain local field isolates and evaluate diagnostic EHV-5 TaqMan real time PCR. For this purpose, from three stud farms in Eskişehir, Malatya, and Bursa 165 horses and foals sampled. From each animal blood, tears and nasal swap were collected and totally 495 sample used as thesis material. Viral load of EHV-2 and EHV-5 in whole materials was determined by nested PCR assay. 165 PBMCs are isolated from blood samples and inoculated to ED and RK-13 cell lines with cocultivation method. Second part within this study, EHV-5 TaqMan real time PCR evaluated for sensitive, rapid and reliable detection of EHV-5.

In the study EHV-2 and EHV-5 determined as positive at a rate of 58.78% and 62.42% respectively. For both agents the positivity rate determined as 45,45%. Moreover, 37 blood sample formed CPE in ED and RK-13 cell lines. Isolates were obtained as EHV-2 by using nested PCR. For diagnosis of EHV-5 by real time PCR primers and MGB probes were designed. After optimizing EHV-5 real time PCR; detection limit, specificity and relative sensitivity reactions made by using cloned plasmids. In the optimized specific reaction 51 field samples tested and real time PCR and nested PCR positive ratio determined as 54,9% and 33,3%, respectively. It was shown that designed EHV-5 real time PCR can be used in the field strains as a reliable method.

The data showed EHV-2 ve EHV-5 infections of race horses with and without symptoms in the state owned stud farms have high prevalence ratio which is similar with the data worldwide. Also foals showed higher prevalence than adults. Additionally it is concluded that EHV-5 TaqMan real time PCR is a rapid, reliable and sensitive technique which can be used instead of /or together with the molecular techniques using today.

Key words: EHV-2, EHV-5, nested PCR, real-time PCR, cocultivation.

KAYNAKLAR

- AGIUS, C.T., NAGESHA, H.S., STUDDERT, M.J. (1992). Equine herpesvirus 5: comparisons with EHV2 (equine cytomegalovirus), cloning, and mapping of a new equineherpesvirus with a novel genome structure. *Virology*, **191**: 176–186.
- AGIUS, C.T., CRABB., B.S., TELFORD E.A.R., DAVISON, A.J., STUDDERT,M.J. (1994). Comparative Studies of the Structural Proteins and the Glycoproteins of Equine Herpesvirus 2 and 5. *J of Gen.l Virol.*, **75**: 2707-2717.
- AGIUS, C.T., STUDDERT, M.J., (1994). Equine herpesviruses 2 and 5: comparisons with other members of the subfamily gammaherpesvirinae. *Advances in Virus Research*, **44**: 357–379.
- ALLEN, G.P., AND MURRAY, J., (2004) Equid herpesvirus 2 and equid herpesvirus 5 infections. In: Coetzer, J.A.W., and R.C., Tustin (eds), *Infectious Diseases of Livestocks*, 2nd edn. 860–867. Oxford University Press, South Africa.
- AMER, H. M., SHALTOUT, A. K., EL- SABAGH, I. M, EL-SANOUSI A. A. SHALABY, M. A. (2011). Prevalence of equine herpes viruses 1, 2 and 4 in Arabian horse population in *Egypt African Journal of Microbiology Research*, **5(27)**: 4805-4811.
- ATASEVEN, VS, BİLGE-DAGALP, S, OGUZOGLU, TC, KARAPINAR, Z, GÜZEL, M, TAN, MT. (2010a). Detection and Sequence Analysis of Equine Gammaherpesviruses from Horses with Respiratory Tract Disease in Turkey. *Transbound Emerg Dis.*, Volume **57**, **(4)**: 271–276.
- ATASEVEN, VS., DAĞALP, SB., BAŞARAN, Z., KESKİN, S. (2010b). Seroepidemiological studies of equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) infections in working horses from the eastern Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **57**: 39-42.
- ATASEVEN, VS., DAĞALP, SB., GÜZEL M., BAŞARAN Z., TAN MT., GERAGHTY B. (2009). “Prevalence of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4 infections in equidae species in Turkey as determined by ELISA and multiplex nested PCR. *Res Vet Sci.* **86**: 339-344.
- BANBURA, M. W., CHMIELEWSKA, A., TUCHOLSKA, A., SENDECKA, H., RZEWUSKA, M., DZIECIATKOWSKI, T. (2004). Outbreak of equine herpes virus type-2 (EHV-2) infections in relation to respiratory or neurological symptoms. *Med Weter*, **60**: 496-499.

- BELAK, S., PALFI, V., TUBOLY, S., BARTHA, L., (1980). Passive immunization of foals to prevent respiratory disease caused by equine herpesvirus type 2. *Zentralblatt Veterinärmedizin, B* **27**: 826–830.
- BİLGE-DAĞALP S., FARAJİAR., KARAPINAR Z., ALKAN F., ÖZKUL A. (2009). Equine herpesvirus infections in foals with respiratory distress in a private horse pension in Turkey. 4th European Congress of Virology. 7-11 April,. Italy.
- BELL, A., BALASURIYA B.R.U., NORDHAUSEN, W.R., MACLACHLAN, N.J. (2006a). Isolation of Equine Herpesvirus-5 from Mononuclear Cells of a Gelding.” *J.Vet. Diagn Invest*, **18**: 472-475.
- BELL, S.A., BALASURIYA, U.B., GARDNER, I.A., BARRY, P.A., WILSON, W.D., FERRARO, G.L.,MACLACHLAN, N.J., (2006b). Temporal detection of equine herpesvirus infections of a cohort of mares and their foals. *Vet. Microbiol.*, **116**: 249–257.
- BELL, S.A., PUSTERLA, N., BALASURIYA, U.B., MAPES, S.M., NYBERG, N.L., MACLACHLAN, N.J., (2008). Isolation of a gammaherpesvirus similar to asinine herpesvirus-2 (AHV-2) from a mule and a survey of mules and donkeys for AHV-2 infection by real-time PCR. *Vet. Microbiol.*, **130**: 176–183.
- BLAKESLEE, J.R., OLSEN, R.G., MCALLISTER, E.S., FASSBENDER, J., DENNIS, R., (1975). Evidence of respiratory tract infection induced by equine herpesvirus type 2, in the horse. *Canadian Journal of Microbiology*, **21**: 1940–1946.
- BORCHERS, K., SLATER, J.D. (1993). A nested PCR for the detection and direct differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J Virol Methods*, **45**: 331–336.
- BORCHERS, K., WOLFINGER, U., GOLTZ, M., BROLL, H., LUDWIG, H. (1997). Distribution and relevance of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) infections. *Arch. Virol.*, **142**: 917–928.
- BORCHERS, K., WOLFINGER, U., LUDWIG, H., THEIN, P., BAXI, S., FIELD, H.J., SLATER, J.D.(1998). Virological and molecular biological investigations into equine herpes virus type 2 (EHV-2) experimental infections. *Virus Res.*, **55**: 101–106.
- BORCHERS, K., FRÖCHLICH, K., LUDWIG, H. (1999). Detection of Equine Herpes Virus types 2 and 5 (EHV-2 and EHV-5) in Przewalski's wild horses. *Arch. Virol.*, **144**: 771-780.
- BORCHERS, K., BRACKMANN, J., KERSHAW, O. (2002). The Mouse Is Not Permissive For Equine Herpesvirus 2 (EHV-2), However Viral DNA Persisted In Lung and Spleen Depending on the Inoculation Route. *Arch. Virol.*, **147**: 1437-1444.
- BORCHERS, K., WIIK, H., FROLICH H., LUDWIG, H., AND EAST, M.L. (2005). Antibodies Against Equine Herpesviruses And Equine Arteritis Virus in Burhell's

Zebras (*Equus Burchelli*) From The Serengeti Ecosystem. *J. of Wild. Dis.*, **41(1)**: 80–86.

- BORCHERS, K., EBERT, M., FETSCH, A., HAMMOND, T., STERNER-KOCK, A., (2006). Prevalence of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) DNA in ocular swabs and its cell tropism in equine conjunctiva. *Veterinary Microbiology*, **118**: 260–266.
- BROWNING, G.F., STUDDERT, M.J. (1987a). Genomic heterogeneity of equine betaherpesviruses. *J Gen Virol*, **68**: 1441–1447.
- BROWNING, G.F., STUDDERT, M.J. (1987b). Epidemiology of equine herpesvirus 2 (equine cytomegalovirus). *Journal of Clinical Microbiology*, **25**: 13–16.
- BROWNING, G.F, FICORILLI, N., STUDDERT, M.J. (1988) Asinine herpesvirus genomes: comparison with those of the equine herpesvirus. *Arch Virol*, **101**: 183–190.
- BRAULT, S. A., BLANCHARD, M. T., GARDNER, I. A., STOTT, J. L., PUSTERLA, N., MAPES, S. M., VERNAU, W., DEJONG, K. D., MACLACHLAN, N. J. (2010). The immune response of foals to natural infection with equid herpesvirus-2 and its association with febrile illness. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **137**: 136–141.
- COLLINSON, P.N., O'RIELLY, J.L., FICORILLI, N., STUDDERT, M.J., (1994). Isolation of equine herpesvirus type 2 (equine gammaherpesvirus 2) from foals with keratoconjunctivitis. *J of the American Vet. Med. Ass.*, **205**: 329–331.
- CRAIG, MI., BARRANDEGUY, M.E. AND FERNÁNDEZ, M.F. (2005). Equine Herpesvirus 2 (EHV-2) Infection in Thoroughbred Horses in Argentina. *BMC Vet. Res.*, **1**: 9, doi: 10.1186/1746-6148-1-9.
- DAVISON, A.J., CLEMENTS, J.B. (1997). Herpesviruses: general properties. In: Mahy, B.W.J., Collier, L. (Eds.), *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 10th Edition. Edward Arnold, London.
- DAVISON, A.J., EBERLE, R., EHLERS, B., HAYWARD, G.S., MCGEOCH, D.J., MINSON, A.C., PELLETT, P.E., ROIZMAN, B., STUDDERT, M.J., THIRY, E., (2009). The order Herpesvirales. *Arch. Virol.*, **154**: 171–177.
- DAVISON, A.J. (2010). Herpesvirus systematics. . *Veterinary Microbiology*, **143**: 52-69.
- DIALLO, I.S., HEWITSON, G.R., JONG, A., KELLY, M.A., WRIGHT, D.J., CORNEY B.G., RODWELL B.J. (2008). Equine Herpesvirus Infections In Yearlings In South East Queensland. *Arch. Virol.*, **153**: 1643-1649.

- DOMINGO, E., PARRISH, C.R. AND HOLLAND, J.J. Molecular evolution of the *Herpesvirales*. In: *Origin and Evolution of Viruses*. (2008) Academic Press, 2nd edn., Elsevier, London, 447–475.
- DRUMMER, H. E., REUBEL, G. H. AND STUDDERT, M. J. (1996). Equine gammaherpesvirus 2 (EHV2) is latent in B lymphocytes. *Arch Virol*, **141**: 495-504.
- DUNOWSKA, M., HOLLOWAY, S.A., WILKS, C.R., MEERS, J., (2000). Genomic variability of equine herpesvirus-5. *Arch Virol*, **145**: 1359–1371.
- DUNOWSKA, M., WILKS, C.R., STUDDERT, M.J., MEERS, J. (2002). Viruses associated with outbreaks of equine respiratory disease in New Zealand. *New Zealand Vet. Journal*, **50**: 132–139.
- DUNOWSKA, M., HOWE L., HANLON D. (2011). Stevenson M. Kinetics of Equid herpesvirus type 2 infections in a group of thoroughbred foals *Vet. Microbiol.*, **152**: 176–180.
- DYNON, K., VARRASSO, A., FICORILLI, N., HOLLOWAY, SA., REUBEL, GH., LI, F., HARTLEY, CA., STUDDERT, MJ., AND DRUMMER, HE. (2001). Identification of Equine Herpesvirus 3 (Equine Coital Exanthema Virus) Equine Gammaherpesviruses 2 and 5, Equine Adenoviruses 1 and 2, Equine Arteritis Virus and Equine Rhinitis A Virus by Polymerase Chain Reaction. *Aust. Vet. Journal*, **79**: 10.
- EDINGTON, N., WELCH, H.M., GRIFFITHS, L. (1994). The prevalence of latent Equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses. *Equine Veterinary Journal* **26**: 140–142.
- EHLERS, B., BORCHERS, K., GRUND, C., FROLICH, K., LUDWIG, H., BUHK, H.J., (1999). Detection of new DNA polymerase genes of known and potentially novel herpesviruses by PCR with degenerate and deoxyinosine-substituted primers. *Virus Genes*, **18**: 211–220.
- FORTIER, G. , PRONOST, S., MISZCZAK, F. , FORTIER, C., LEON, A. , RICHARD, E. , ERCK, E.V. , THIRY, E. , LEKEUX, P. (2009). Identification of equid herpesvirus-5 in respiratory liquids: A retrospective study of 785 samples taken in 2006–2007.” *The Vet. J.*, **182**: 346–348.
- FORTIER, G., ERCK, E.V., PRONOST, S. , LEKEUX, P. , THIRY, E. (2010). Equine gammaherpesviruses: Pathogenesis, epidemiology and diagnosis. *The Vet. J.*, doi:10.1016/j.tvjl.2009.08.017.
- FORTIER, G., ERCK, E.V., FORTIER, C., RICHARD, E. , POTTIER, D., PRONOST, S., MISZCZAK, F. , THIRY, E. , LEKEUX, P. (2009). Herpesiviruses In Respiratory Lliuquids Of Horses: Putative Implication In Airway Inflammation And Association With Cytological Features. *Vet. Mic.*, **139**: 34-41.

- FRANCHINI, M., AKENS, M., BRACHER, V., VON FELLEBERG, R., (1997). Characterisation of gamma herpesviruses in the horse by PCR. *Virology*, **238**: 8–13.
- FU, Z.F., ROBINSON, A.J., HORNER, G.W., DICKINSON, L.G., GRIMMETT, J.B., MARSHALL, R.B.,(1986). Respiratory disease in foals and the epizootiology of equine herpesvirus type 2 infection. *New Zealand Vet. Journal*, **34**: 152–155.
- FU, Z.F., DENBY, L., LIEN, D.H., ROBINSON, A.J., (1987). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of antibodies against equine herpesvirus 2 in equine sera. *Acta Virologica*, **31**: 468–474.
- GLEESON, L.J., SULLIVAN, N.D., STUDDERT, M.J., (1976). Equine herpesviruses: type 3 as an abortigenic agent. *Aust. Vet. J.*, **52**: 349–354.
- GLEESON, L.J., STUDDERT, M.J., (1977). Equine herpesviruses. Experimental infection of a with type 2. *Aust. Vet. J.*, **53**: 360–362.
- GLEESON, LJ, COGGINS, L. (1985).Equine Herpesvirus Type 2: Cell-Virus Relationship during persistent-associated viremia. *Am J Vet Res.*, **46(1)**: 19-23.
- GRAHAM E WILCOX (2004). Latent equine herpesviruses. Role of latent equine herpesviruses in respiratory disease.A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC Web-only Publication No W04/157 RIRDC Project No UMU-28A .
- GÜR S., YAPICI O. (2008). Equine Herpesvirus type 1 and 4 in Individually Reared Horses in Central and Western Turkey. *ACTA VET. BRNO*, **77**: 609-613; doi:10.2754/avb200877040609.
- HART, K.A., BARTON, M.H., WILLIAMS, K.J., FLAMINIO, M.J., HOWERTH, E.W., (2008). Multinodular pulmonary fibrosis, pancytopenia and equine herpesvirus-5 infection in a thoroughbred gelding. *Equine Veterinary Education*, **20**: 470–476.
- HERDER, V., BARSNICK, R., WALLISER, U., TEIFKE, J.-P., KONIG, P., CZERWINSKI, G., HANSMANN, F., BAUMGARTNER, W., HEWICKER-TRAUTWEIN, M. (2012). Equid herpesvirus 5-associated dermatitis in a horse. Resembling herpes-associated erythema multiforme. *Vet. Microbiol*; in press.
- HOLLOWAY, S.A., STUDDERT, M.J., DRUMMER, H.E. (1998). Characterization Of Glycoprotein B Of The Gammaherpesvirus Equine Herpesvirus-2. *J. Gen. Virol.*, **79**: 1619-1629.
- HOLLOWAY, S.A., LINDQUESTER, G.J., STUDDERT, M.J., DRUMMER, H.E., (2000). Analysis of equine herpesvirus 2 strain variation using monoclonal antibodies to glycoprotein B. *Archives of Virology*, **145**: 1699–1713.

- HSIUNG, G.D., FİSCHMAN, H.R., FONG, C.K., GREEN, R.H., (1969). Characterization of a cytomegalo-like virus isolated from spontaneously degenerated equine kidney cell culture. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, New York, USA, **130**: 80–84.
- KEMENY, L. & PEARSON, J. E. (1970). Isolation of herpesviruses from equine leukocytes: comparison with equine rhinopneumonitis virus. *Can. J. Comp. Med.*, **34**: 59–65.
- KERSHAW, O., OPPEN, T., GLITZ., F., DEEGEN, E., LUDWIG, H., BORCHERS K. (2001). Detection of Equine Herpesvirus Type 2 (EHV-2) In Horses With Keratoconjunctivitis. *Virus Res.*, **80**: 93-99.
- KUTYAVIN, I. V., AFONINA I. A., MILLS A., GORN V. V., LUKHTANOV E. A., BELOUSOV, E. S., SINGER M. J., . WALBURGER D. K, LOKHOV S. G., GALL A. A., DEMPCY, R., REED, M. W., MEYER, R. B., AND HEDGPETH J. (2000). 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.*; **28(2)**: 655–661.
- MARENZONI, M.K., COPPOLA, G., MARANESI, M., PASSAMONTI, F., CAPPELLI, K., CAPOMACCIO, S., VERINI SUPPLIZI, A., THIRY, E., COLETTI, M. (2010). Age-dependent prevalence of equid herpesvirus 5 infection. *Vet Res Commun*, **34**: 703–708.
- MARENZONI M.L., PASSAMONTI F., LEPRI E., CERCONE M., CAPOMACCIO S., CAPPELLI K., FELICETTI M., COPPOLA G., COLETTI M., THIRY E. (2011). Quantification of *Equid herpesvirus 5* DNA in clinical and necropsy specimens collected from a horse with equine multinodular pulmonary fibrosis. *J Vet Diagn Invest.*, **23(4)**: 802-806.
- McGEOCH, D.J. (2011). Molecular evolution of the γ -*Herpesvirinae*. The Royal Society. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 2001, **356**: 421-435.
- MINSON, A.C., DAVISON, A., EBERLE, R., DESROSIERS, R.C., FLECKENSTEIN, B., MCGEOCH, D.J., PELLETT, P.E., ROIZMAN, B., STUDDERT, M.J., (2000). Family Herpesviridae. In: Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B. (Eds.), *Virus Taxonomy*. *Academic Press*, San Diego, 203–225.
- MURRAY, MJ, EICHORN, ES, DUBOVI, EJ, LEY, WB (1996). Equine herpesvirus type 2: prevalence and seroepidemiology in foals. *Equine Vet J.*, **28**: 432–436.
- NORDENGRAHN, A., RUSVAI, M., MERZA, M., EKSTRÖM, J., MOREIN B., BELÁK., S. (1996). Equine herpesvirus type 2 (EHV-2) as a predisposing factor for *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: prevention of the bifactorial disease with EHV-2 immunostimulating complexes *Vet. Microbiol*, **51(1-2)**: 55-68.

- NORDENGRAHN, A., KLINGEBORN, B., LINDHOLM, A., MERZA, M., (2001). The use of a neutralizing monoclonal antibody to detect infections of equine herpesvirus type 2 (EHV-2). *J.Vet. Diagn Invest*, **13**: 389–393.
- NORDENGRAHN, A., MERZA, M., ROS, C., LINDHOLM, A., PALFI, V., HANNANT, D., BELAK, S. (2002). Prevalance of Equine Herpesvirus Types 2 and 5 in Horse Populations by Using Type Spesific PCR Assays. *Vet. Res.*, **33**: 251-259.
- PÁLFI V., BELÁK S., MOLNÁR T. (1978) Isolation of equine herpesvirus type 2 from foals showing respiratory symptoms, *Zentralbl. Veterinärmed.*, **B 25**: 165-167.
- PATEL, J.R., HELDENS, J., (2005). Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV- 4) epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review. *Vet. J.*, **170**: 14–23.
- PELLETT, PE, ROIZMAN, B (2006). The Herpesviridae: a brief introduction.In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (eds) *Fields virology*, 5th edn. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 2479–2499.
- PEREIRA, L., (1994). Function of glycoprotein B homologues of the family Herpesviridae. *Infect. Agents Dis.*, **3**: 9–28.
- PLUMMER, G. AND WATERSON, A. P. (1963). Equine herpes viruses. *Virology* , **19**: 412-416.
- PLUMMER, G., (1964). Serological comparison of the herpes viruses. *British Journal of Experimental Pathology*, **45**: 135–141.
- PLUMMER, G., GOODHEART, C.R., STUDDERT, M.J., (1973). Equine herpesviruses: antigenic relationships and deoxyribonucleic acid densities. *Infection and Immunity*, **8**: 621–627.
- PUREWAL, A. S., SMALLWOOD A. V., KAUSHAL, A., ADEGBOYE, D., EDINGTON N. (1992). Identification and control of the *cis*-acting elements of the immediate early gene of equid herpesvirus type 1. *J Gen Virol.*, **73**: 513–519.
- PUREWAL, A.S., SMALLWOOD, A.V., ALLSOPP, R., WELCH, H.M., EDINGTON, N. (1993). Crosshybridization of equid herpesvirus-2 (EHV-2) and herpes simplex virus-1 (HSV-1) genes to equid herpesvirus-1 (EHV-1). *Veterinary Microbiology*, **35**: 1–10.
- PUSTERLA, N., LEUTENEGGER, C.M., WILSON, W.D., WATSON, J.L., FERRARO G.L., MADÍGAN, J.E. (2005). Equine Herpesvirus-4 Kinetics In Peripheral Blood Leukocytes and Nasopharyngeal Secretions in Foals Using Quantative Real-Time TaqMan PCR. *J Vet Diagn Invest*, **17**: 578-581.

- REUBEL, G. H., CRABB, B. S. AND STUDDERT, M. J. (1995). Diagnosis of Equine Gammaherpesvirus 2 and 5 infections by Polymerase Chain Reaction. *Arch. Virol.*, **140**: 1049-1060.
- RIZVI, S. M., SLATER, J. D., WOLFINGER, U., BORCHERS, K., FIELD H. J. AND SLADE A. J. (1997). Detection and distribution of equine herpesvirus 2 DNA in the central and peripheral nervous systems of ponies. *J. Gen. Virol.*, **78**: 1115–1118.
- RODE, H.J., BUGERT, J.J., HANDERMANN, M., SCHNITZLER, P., KEHM, R., JANSSEN, W., DELIUS, H., DARAI, G.(1994). Molecular characterization and determination of the coding capacity of the genome of equine herpesvirus type 2 between the genome coordinates 0.235 and 0.258 (the EcoRI DNA fragment N; 4.2 kbp). *Virus Genes*, **9**: 61–75.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS., T. (1989). Molecular cloning: alaboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SHARP, E.L., FARRELL, H.E., BORCHERS, K., HOLMES, E.C., DAVIS-POYNTER, N.J., (2007).Sequence analysis of the equid herpesvirus 2 chemokine receptor homologues E1, ORF74 and E6 demonstrates high sequence divergence between field isolates. *J Gen Virol.*, **88**: 2450–2462.
- SLEDGE, D.G., MILLER, D.L., STYER, E.L., HYDRICK, H.A., AND BALDWIN C.A. (2006). Equine Herpesvirus 2-Associated Granulomatous Dermatitis in a Horse. *Vet. Path.*, **43**: 548-552.
- SOARE, T., LEEMING G., MORGAN R., PAPOULA-PEREIRA R., KIPAR A., STEWART J. P., HETZEL U (2011). Equine multinodular pulmonary fibrosis in horses in the UK *Veterinary Record*, **169**: 313.
- STACZEK, J., WHARTON, J.H., DAUENHAUER, S.A., O'CALLAGHAN, D.J., (1984). Coestablishment of persistent infection and oncogenic transformation of hamster embryo cells by equine cytomegalovirus. *Virology*, **132**: 339–351.
- STUDDERT, M.J. (1974). Comparative aspects of equine herpesviruses. *Cornell Veterinarian*, **64**: 94–122.
- STUDDERT, M.J. (1996). Equine herpesvirus 2 and disease. *Equine Veterinary Journal*, **28**: 426–428.
- SVANSSON V., ROELSE M., ÓLAFSDÓTTIR G., THORSTEINSDÓTTIR L., TORFASON E.G., TORSTEINSDÓTTIR S. (2009). Immune response against equine gammaherpesvirus in Icelandic horses. *Veterinary Microbiology*, **137**: 363–368.
- TAKACS, M., SEGESDI, J., BALOG, K., MEZEI, M., TOTH, G., MINAROVITS, J. (2001). Relative deficiency in CpG dinucleotides is a widespread but not unique

feature of Gammaherpesvirinae genomes. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, **48**: 349–357.

TELFORD E. A.R., WATSON M. S., MCBRIDE K. DAVISON A. J. (1992). The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology*, **189**(1): 304–316.

TELFORD EA, STUDDERT MJ, AGIUS CT, WATSON MS, AIRD HC, DAVISON AJ (1993). Equine herpesviruses 2 and 5 are gamma-herpesviruses. *Virology*, **195**: 492–499.

TELFORD, E.A., WATSON, M.S., AIRD, H.C., PERRY, J., DAVISON, A.J. (1995). The DNA sequence of equine herpesvirus 2. *Journal of Molecular Biology*, **249**:520–528.

THEIN, P., BÖHM, D. (1976). Etiology and clinical aspects of a viral keratoconjunctivitis in foals. *Zentralblatt Veterinärmedizin*, B **23**: 507–519.

TORFASON, E.G. , THORSTEINSDOTTIR, L. , TORSTEINSDOTTIR, S., SVANSSON, V. (2008). Study of equid herpesviruses 2 and 5 in Iceland with a type-specific polymerase chain reaction. *Res. Vet. Scien.*, **85**: 605–611.

TURNER, A.J., STUDDERT, M.J., (1970). Equine herpesviruses. 3. Isolation and epizootiology of slowly cytopathic viruses and the serological incidence of equine rhinopneumonitis. *Aust. Vet. J*, **46**: 581–586.

O'CALLAGHAN, D.J., HENRY, B.E., WHARTON, J.H., DAUENHAUER, S.A., VANCE, R.B., STACZEK, J., ROBINSON, R.A., (1981). Equine herpesviruses: biochemical studies on genomic structure, DI particles, oncogenic transformation and persistent infection. In: Becker, Y. (Ed.), *Developments in Molecular Virology*, vol. 1, Nijhoff, The Hague, 387–418.

VENGUST, M., J.D. BAIRD, T. VAN DREUMEL, C. ACKERLEY, AND D. BIENZLE (2008). Equid herpesvirus 2-associated oral and esophageal ulceration in a foal. *J. Vet. Diagn. Invest.* **20**: 811–815.

VERRYKEN, K., SAEY, V., MAES, S., BORCHERS, K., VAN DE WALLE, G., DUCATELLE, R., DEPREZ, P. (2010). First Report of Multinodular Pulmonary Fibrosis Associated with Equine Herpesvirus 5 in Belgium. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* **79**(4): 297-301.

YACTOR, J., LUNN, K.F., TRAUB-DARGATZ, J.L., MORLEY, P.S., BARNETT C.D., KOHLER, A.K., KASPER K.S., KIVI A.J., LUNN, D.P. (2006). Detection of Nasal Shedding of EHV-1 and EHV-4 at Equine Show Events and Sales by Multiplex real time PCR. *AAEP PROCEEDINGS*, Vol **52**: 223-227.

- WANG, L., RAIDAL, S.L., PIZZIRANI, A., WILCOX, G.E. (2007). Detection of respiratory herpesviruses in foals and adult horses determined by nested multiplex PCR. *Veterinary Microbiolog.*, **121**: 18–28.
- WILKS, C.R., STUDDERT, M.J. (1974). Equine herpesviruses. 5. Epizootiology of slowly cytopathic viruses in foals. *Aust. Vet. J.*, **50**: 438–442.
- WILLIAMS, K. J., MAES, R., DEL PIERO, F., LIM, A., WISE, A., BOLIN, D. C., CASWELL, J., JACKSON, C., ROBINSON, N. E., DERKSEN, F., SCOTT, M. A., UHAL, B. D., LI, X., YOUSSEF S. A. AND BOLIN S. R. (2007). Equine Multinodular Pulmonary Fibrosis: A Newly Recognized Herpesvirus-Associated Fibrotic Lung Disease. *Vet Pathol.*, **44**:849-862.

EK-1: Malatya ve Bursa’da yerleşik işletmelerde bulunan atlardan sağlanan materyallere ait dsDNA’ların (ng/ µl) 260 nm dalga boyunda ölçümleri

II Nolu İşletme’ye ait dsDNA Ölçümleri.

Örnek No	PBMC	Gözyaşı Akıntısı	Burun Akıntısı	Örnek No	PBMC	Gözyaşı Akıntısı	Burun Akıntısı
46	652,48	246,82	207,08	80	148,4	174,44	200,54
47	686,47	235,54	243,38	81	112,23	148,83	186,08
48	476,76	172,59	174,53	82	217,33	113,46	211,18
49	543,26	202,52	198,12	83	122,83	198,75	206,86
50	364,69	227,47	212,32	84	94,23	132,22	246,02
51	574,54	179,25	190,05	85	153,54	154,18	198,15
52	668,12	201,27	202,02	86	193,12	190,35	278,78
53	547,77	224,7	221,17	87	80,77	167,44	200,91
54	534,38	256,98	213,71	88	110,08	185,34	171,04
55	302,68	206,45	210,55	89	117,93	192,21	167,52
56	332,19	209,66	225,45	90	140,23	197,15	185,5
57	709,48	242,51	199,43	91	80,33	142,58	200,23
58	616,45	178,92	216,72	92	148,58	212,16	197,82
59	628,5	212,19	188,53	93	248,65	197,3	172,65
60	756,54	189,88	214,41	94	99,96	157,75	183,41
61	573,79	216,04	125,36	95	118,19	215,85	197,6
62	328,15	188,55	128,8	96	177,96	192,67	193,11
63	470,07	211,45	176,99	97	180,45	207,43	193,38
64	427,05	235,79	206,6	98	175,02	195,31	189,2
65	485,88	228,4	211,04				
66	456,95	208,66	247,17				
67	495,48	234,9	236,93				
68	389,6	212,37	217,81				
69	789,69	235,79	193,42				
70	251,61	206,05	217,31				
71	284,66	203,72	232,36				
72	206,05	195,79	231,9				
73	196,25	224,63	217,98				
74	202,66	175,75	208,25				
75	320,85	217,72	207,91				
76	176,96	213,24	202,41				
77	194,58	177,83	199,77				
78	121,51	175,78	203,53				
79	163,74	149,29	230,61				

III Nolu İşletme'ye ait dsDNA Ölçümleri.

Örnek No	PBMC	Gözyaşı Akıntısı	Burun Akıntısı	Örnek No	PBMC	Gözyaşı Akıntısı	Burun Akıntısı
99	801,47	230,09	201,33	133	782,45	226,98	234,61
100	952,74	232,26	212,63	134	631,9	200,1	204,02
101	764,64	181,6	300,42	135	943,71	227,72	207,69
102	774,93	159,64	220,50	136	790,74	224,37	214,60
103	847,37	214,27	213,40	137	661,08	192,81	239,57
104	728,36	220,9	212,27	138	680,52	270,04	224,14
105	219,55	221,87	217,38	139	914,75	288,82	201,01
106	557,9	242,99	208,25	140	695,89	288,58	201,54
107	795,32	221,93	238,26	141	582,71	254,53	240,46
108	666,16	211,44	189,67	142	287,62	212,09	236,57
109	942,62	227,99	192,84	143	730,57	191,89	200,96
110	598,64	243,37	188,98	144	549,19	256,47	216,60
111	927,9	242,33	167,07	145	718,55	254,97	192,34
112	999,41	233,16	236,25	146	451,9	228,73	175,94
113	726,44	248,9	223,74	147	334,44	248,08	190,38
114	539,03	219,95	207,89	148	225,51	212,74	185,76
115	1015,84	216,75	248,78	149	607,84	214,13	207,47
116	541,72	232,86	233,47	150	297,57	197,49	219,81
117	526,69	255,52	226,81	151	235,01	194,47	230,03
118	544,7	221,09	211,95	152	595,83	231,52	211,65
119	849,24	218,37	228,25	153	410,8	212,2	222,56
120	895,9	220,45	222,62	154	563,64	193,51	201,98
121	935,08	199,97	195,08	155	245,18	199,81	190,81
122	962,03	233,89	233,67	156	727,91	212,36	227,28
123	833,81	232,66	182,93	157	261,69	243,13	215,98
124	722,94	219,11	216,68	158	344,99	267,52	204,32
125	760,83	225,84	208,63	159	704,91	228,05	208,56
126	529,45	197,64	185,35	160	538,29	185,52	188,92
127	795,57	228,17	178,34	161	641,4	201,18	198,56
128	645,5	200,25	207,68	162	517,68	223,52	218,87
129	660,88	195,69	207,52	163	419,3	220,06	214,24
130	652,03	201,15	176,78	164	412,62	207,69	205,41
131	872,13	252,92	196,92	165	570,27	238,42	190,05
132	865,44	215,79	224,44				

EK-2: Etik kurul kararı



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ

Sayı : B.30.2.ANK.0.70.00.00/

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Ankara

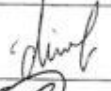
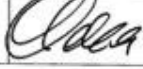
06/01/2010

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :06/01/2010
TOPLANTI NO :2009-53
DOSYA NO :2009-223
KARAR NO :2009-266

Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Feray Alkan'ın araştırma yürütücüsü olduğu ve Araş.Gör.Ayşe Zeynep Akkutay'ın ortak çalışmaları olan "At Yetiştiriciliği İşletmelerinde EHV-2 ve EHV-5 Enfeksiyonlarının Araştırılması ve Tanısal Multipleks Real Time PCR Tekniğinin Geliştirilmesi" başlıklı çalışmaları Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre uygun bulunarak onaylanmasına, katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. Hakan YARDIMCI (Başkan)	Mikrobiyoloji ABD.	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Eyüp Sabri AKARSU (Başkan Vekili)	Farmakoloji ABD.	Tıp Fakültesi	E	
Prof. Dr. Cahit UÇOK (Üye)	Ağız, Diş, Çene Cerrahisi ABD.	Diş Hekimliği Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji ABD.	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Ömer BEŞALTI (Üye)	Cerrahi ABD.	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Necmettin CEYLAN (Üye)	Yemler ve Hayvan Besleme ABD.	Ziraat Fakültesi	E	
Doç.Dr.Meltem KOLOĞLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi ABD.	Tıp Fakültesi	K	

Yrd.Doç.Dr.R.Tamay BAŞAĞAÇ GÜL (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji ABD.	Veteriner Fakültesi	K	
Uzm.Vet.Hek.Atilla IŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)		Veteriner Hekimler Derneği	E	

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Ayşe Zeynep
Soyadı : AKKUTAY
Doğum Yeri ve tarihi : Ankara, 08/04/1984
Uyruğu : T.C.
Medeni Durumu : Bekar
İletişim adresi ve telefonu : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji
Anabilim Dalı ANKARA, 0312 317 03 15/ 294

II- Eğitimi

2002-2007 : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
1999 -2002 : Ankara Atatürk Anadolu Lisesi
1995-1999 : TED Ankara Koleji
Yabancı Dili : İngilizce, Almanca

III- Ünvanları

2007: Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

2009-2012: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim
Dalında Araştırma Görevlisi

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Mikrobiyoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

- Mahzounieh M., Dincer E., Faraji A.R., Akın H., **Akkutay A.Z.**, Ozkul A. (2012). Relationship between Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus strains circulating in Iran and Turkey: Possibilities for transborder transmission. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. (Baskıda)

Bildiri:

- **Akkutay A.Z.**, Alkan F. (2010). Bir At Yetiştiriciliği İşletmesinde EHV-2 ve EHV-5 Viruslarının Araştırılması. IX. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. 5-7 Ekim 2010 Lefkoşe-KIBRIS (Sözlü Sunum).
- Alkan F. Oğuzoğlu T.Ç., Karaoğlu M.T., Muz D., Karapınar Z., Timurkan M.Ö., **Akkutay A.Z.**, Turan H.M., Burgu İ. (2011). Investigation of BVDV infection in herds as first step of the control/eradication program. 8th ESVV Pestivirus Symposium September 25-28, 2011 Hannover, Germany (Poster).

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Erasmus Öğrenci Staj Hareketliliği Programı. Freie Universitaet, Fachbereich Veterinarmedizin, Institut für Virologie. 01.07.09-01.10.09.

YÖK Doktora Araştırma Bursu dahilinde, Freie Universitaet, Fachbereich Veterinarmedizin, Institut für Virologie. 01.04.11-01.10.11.