

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Canine Parvovirus ve Canine Coronavirus Etkenlerin Eş Zamanlı
Teşhisine Yönelik Kit Geliştirilmesi**

Arş. Gör. Çağrı AVCİ

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Sibel YAVRU

KONYA-2024

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Canine Parvovirus ve Canine Coronavirus Etkenlerin Eş Zamanlı
Teşhisine Yönelik Kit Geliştirilmesi**

Arş. Gör. Çağrı AVCİ

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Sibel YAVRU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 21212004 Proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2024

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Arş. Gör. Çağrı AVCİ tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Veterinerlik Virolojisi Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Ünvanı Adı SOYADI Üniversitesi	İmza
Danışman:	Ünvanı Adı SOYADI Üniversitesi	İmza
Üye:	Ünvanı Adı SOYADI Üniversitesi	İmza
Üye:	Ünvanı Adı SOYADI Üniversitesi	İmza
Üye:	Ünvanı Adı SOYADI Üniversitesi	İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Unvanı Adı SOYADI Enstitü
Müdürü

ÖNSÖZ

Bir bilim insanının en önemli görevleri bilgi üretmek, paylaşmak ve topluma katkıda bulunmaktır. Bu tez çalışması, bu görevleri yerine getirme çabasının ürünüdür. Bu satırları yazarken, uzun bir yolculuğun sonuna yaklaşmanın mutluluğunu ve minnettarlığımı hissediyorum.

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesinde emeği geçen aileme, sürekli destekleri ve inançları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışma boyunca beni motive eden, her zaman yanımda olan ailem, başarımın temel taşıdır.

Araştırma sürecim boyunca rehberliğini ve yönlendirmesini esirgemeyen, başta danışmanım Prof. Dr. Sibel YAVRU ve hocalarım Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK, Prof. Dr. Orhan YAPICI, Prof. Dr. Oya BULUT, Prof. Dr. Oğuzhan AVCI, Doç. Dr. Bilge Kaan TEKELİOĞLU ve Doç. Dr. Irmak DİK'e bilgi ve deneyimlerini benimle paylaştığı için teşekkür ederim.

Bu tezde yer alan sonuçlar ve bulguların elde edilmesindeki sonsuz destek ve katkıları için arkadaşlarım Ceren Ece ÖZDEMİR, Tuğrulhan ÖZDEN, Fatıma UZAN, Muhammet Enes ASLAN ve Hasan Sercan PALANCI'ya teşekkür ederim. Sizinle geçirdiğim zamanlar, bu yolculuğun daha anlamlı ve eğlenceli olmasını sağladı.

Ayrıca, bu çalışmanın maddi ve teknik desteğini sağlayan Selçuk Üniversitesi ve Çukurova Üniversitesi Rektörlüklerine de teşekkür ederim. Bu destek, bu tez çalışmasının gerçekleşmesindeki en elzem destektir.

Son olarak, bu tezi okuyan ve ilgi gösteren herkese teşekkür ederim. Bu çalışma, bilim dünyasına ve topluma katkı sağlama amacıyla yapıldı. Umarım bu tez, gelecek nesiller için bir ilham kaynağı, gelecek çalışmalar için bir temel taşı olabilir.

Bu tez çalışması, bilimin gücünü ve insan dayanışmasının önemini bir kez daha gösterdi. Her birinize, bu yolculukta bana eşlik ettiğiniz ve bu çalışmanın gerçekleşmesine katkıda bulunduğunuz için minnettarım. Saygılarımla.

Arş. Gör. Çağrı AVCI

01 / 2024

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Canine Parvovirus	1
1.2. Canine Coronavirus.....	4
1.3. Floresans Fenomeni.....	5
1.3.1. Absorbsiyon, Emisyon ve Uyarılmış Hal.....	8
1.3.2. Jablonski diagramı.....	10
1.3.3. Titreşimsel Rahatlama (Vibration relaxion).....	11
1.3.4. İç Dönüşüm (Internal Conversion).....	12
1.3.5. Floresans.....	12
1.3.6. Sistemler Arası Geçiş (Intersystem Crossing).....	13
1.3.7. Radyatif Olmayan Bozunma (Non-Radiative Decay).....	14
1.3.8. Harici Dönüşüm (External Conversion).....	14
1.3.9. Stoke's shift Stokes Kayması.....	15
1.4. Viral Hastalıkların Tanısında Kullanılan Yöntemler.....	16
1.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	16
1.4.2. Real-Time PCR.....	17
1.4.3. ELISA.....	18
1.4.4. İmmunfloresans.....	19
1.4.5. Viral Kültürler.....	22
1.5. Moleküler Kenetlenme.....	22
1.5.1. Moleküler Kenetlenme Aşamaları.....	25
1.6. Viral Hastalıklarda Hızlı Teşhisin Önemi.....	27
2.GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.1. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması	30
2.1.1. Örneklerin Hazırlanması	30
2.2. Nükleik asit ekstraksiyonları ve Real Time PCR Analizleri.....	31

2.3. Mikropleyt seçimi.....	32
2.4. Çalışma Ortamının Hazırlanması.....	33
2.5. Çözeltilerin Hazırlanması.....	34
2.6. Yakalayıcı Antikorlar.....	35
2.7. Antikor Kaplamaları.....	35
2.8. Konjugatların Hazırlanması.....	37
2.9. Optimizasyon Çalışmaları.....	37
2.9.1. In-Silico Analizler.....	37
2.9.2. In-Vitro Çalışmalar.....	39
2.10. Floresans Görüntüleme.....	41
2.11. Test Protokolü.....	45
3.BULGULAR.....	47
3.1. Örnek koleksiyonu.....	47
3.2. Primer Tasarımlarının Kontrolü.....	48
3.3. Moleküler Kenetlenme (Docking) Analizleri.....	50
3.4. Optimizasyon Çalışmaları.....	58
3.5. Gerçek Dünya Testleri.....	65
4.TARTIŞMA.....	69
4.1. Bulguların Anlamı ve Yorumlanması.....	69
4.2. Test Kitinin Klinik Uygulamalardaki Potansiyeli.....	71
4.3. Test Kitinin Avantajları ve Dezavantajları.....	74
4.4. Gelecekteki Araştırma ve Geliştirme İhtiyaçları.....	75
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	78
6.KAYNAKLAR	82
7.EKLER.....	91
EK-A Etik Kurul Kararı.....	91
EK-B Turnitin Raporu.....	92
EK-C Kullanma Klavuzu.....	94
8.ÖZGEÇMİŞ	98

SİMGELER VE KISALTMALAR

µm		Mikrometre
aa		Aminoasit
ANA		anti-nükleer antikorlar
BSA		Bovine Serum Albumin
CCoV		Köpek Coronavirusu
CCV		Canine Coronavirus
cDNA		Complementer DNA
CPV		Canine Parvo Virus
DIF		Direkt İmmüno Floresan
ELISA		Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FITC		Fluorescein İzotiosiyanat
FPLV		Feline Panlökopeni Virus
FRET	..	Förster rezonans enerji transferi
HCoV		Human Coronavirus
HD		Harici Dönüşüm
ID		İç Dönüşüm
IF		İmmüno Floresans
IIF		Indirect Immunofloresans
kDa		Kilodalton
LED		Light Emitting Diod
MIFADA		Multi Regional Immunoflorescence Antibody Determination Assay
mRNA		Mesajcı RNA
nm		Nanometre
nm		Nanometre
ns		Nano Saniye
NS		Non Strucral
OLED		Organik Işık Yayan Diyet
ORF		Open Reading Frame
PBS		Fosfat Tampon Tuzu
PCR		Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEDV		Porcine Epidemic Diarrhea Virus
PRCoV		Porcine Respiratory Coronavirus
ROB		Radyatif Olmayan Bozunma
RT-PCR		Real-Time PCR
SAG		Sistemler Arası Geçiş
ss		Single Stranded (Nükleik Asit)
TGEV		Transmissible Gastroenteritis Virus
UV		Ultraviyole

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Canine Parvovirus ve Canine Coronavirus Etkenlerin Eş Zamanlı Teşhisine Yönelik Kit Geliştirilmesi

Çağrı AVCİ

Veterinerlik Virolojisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2024

Köpek Parvovirusu (CPV) ve Köpek Coronavirusu (CCoV), evcil ve yabani köpeklerde sıklıkla görülen enfeksiyöz hastalıklardandır. Bu iki virus, çoğu vakada birlikte de teşhis edilebilmektedir. Bu virusların teşhisinde IFAT, PCR, RT-PCR veya ELISA gibi teknikler kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, CPV ve CCoV etkenlerini eş zamanlı teşhis edebilecek, immunfloresans temelli ve 96 gözlü mikroleptte uygulanacak bir teşhis metodu geliştirmektir.

Çalışmada kullanılmak üzere 380 adet köpek dışkı numunesi toplandı. Nükleik asit ekstraksiyonları yapılan örnekler RT-PCR tekniği ile hem CPV hem de CCoV yönünden test edildi ve pozitiflik durumlarına göre sınıflandırıldı. Bu veri, geliştirilen test tekniğinin (MIFADA) validasyonu, sensitivite ve spesifitesinin hesaplanmasında kullanıldı.

Solid faz olarak 96 gözlü mikrolept kullanıldı. Her gözün sol tarafına karbonat bikarbonat tamponu içerisinde 1 µl Anti-CPV (H69D), sağ tarafına ise 1 µl Anti-CCoV (M87073) primer monoklonal antikor damlatıldı ve 16 saat inkübe edildikten sonra bloklayıcı işlemi yapılarak leylet hazır hale getirildi. Antikor seçimleri bir dizi ayrıntılı in-silico analizden elde edilen verilere göre yapıldı. Kontrol örneklerinin eklenmesi ve inkübasyonunu takip eden süreçte CPV ve CCoV için FITC etiketli konjugat kullanılarak kaplama bölgeleri demonstre edildi ve floresans mikroskopunda fotograflandı. Test optimizasyon çalışmalarında doğruluğu artırmak ve hassas ölçüm yapabilmek için GPU destekli yazılımsal görüntü iyileştirmeleri yapılacak ve testte kullanılması gereken yakalayıcı antikor ve konjugat titreleri hesaplandı. Optimize edilen teknik, RT-PCR ile teşhis edilen örnekler ile uygulandı ve sonuçlar karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmaya göre testin sensitivitesinin RT-PCR'a kıyasla %94, spesifitesinin ise %100 olduğu görüldü.

Bu bilgiler ışığında geliştirilen test kitinin, gelecek çalışmalarla test üretim tekniğinin iyileştirilmesi ve farklı antijenleri/antikorları teşhis edebilme yeteneğinin araştırılması ile hızlı, kolay uygulanan, ekonomik, güvenilir ve yüksek doğrulukla sonuç verebilen bir test kiti olarak kullanılmaya aday olduğu ortaya konuldu.

Anahtar Sözcükler: Çoklu Teşhis; Floresans; Teşhis; Viral Teşhis;

SUMMARY

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Development of a Diagnostic Kit for the Simultaneous Diagnosis of Canine Parvovirus and Canine Coronavirus Agents

Çağrı AVCİ

Department of Veterinary Virology

DOKTORA TEZİ / KONYA-2024

Canine Parvovirus (CPV) and Canine Coronaviruses (CCoV) are infectious diseases frequently observed in domestic and wild dogs. These viruses can often be diagnosed together in most cases. The techniques such as IFAT, PCR, RT-PCR, or ELISA are employed for the diagnosis of these viruses.

The aim of this study is to develop a diagnostic method based on immunofluorescence, applicable to a 96-well microplate, capable of simultaneously diagnosing CPV and CCoV pathogens. A total of 380 canine fecal samples were collected for use in the study. The extracted nucleic acids from these samples were tested for both CPV and CCoV using the RT-PCR technique, and the results were categorized based on positivity. This data was utilized for the validation of the developed test technique (MIFADA) and for calculating sensitivity and specificity.

A 96-well microplate was used as the solid phase. On the left side of each well, 1 µl of Anti-CPV (H69D) in carbonate-bicarbonate buffer was added, and on the right side, 1 µl of Anti-CCoV (M87073) primary monoclonal antibody was dropped. After a 16-hour incubation, the plate was blocked to make it ready for use. The antibody selections were based on detailed in-silico analyses. Control samples were added, and following incubation, coating areas for CPV and CCoV were demonstrated using FITC-labeled conjugate and photographed under a fluorescence microscope.

In the optimization process, GPU-supported software image enhancements were implemented to increase accuracy and enable precise measurements. The capture antibodies and conjugate titers required for the test were calculated. The optimized technique was applied to samples which diagnosed by RT-PCR, and the results were compared. According to this comparison, the test demonstrated a sensitivity of 94% compared to RT-PCR and a specificity of 100%.

As a result of this information, it was revealed that the developed test kit has the potential to be used as a rapid, easily applicable, economical, reliable, and highly accurate diagnostic method. Further research is recommended to improve the test production technique and explore the ability to diagnose different antigens/antibodies in future studies.

Key Words: Diagnose; Fluorescence, Multiple Diognose, Viral Diagnose

1.GİRİŞ

Günümüzde, küresel sağlık tehditleriyle başa çıkma çabalarının en önemli ihtiyaçlarından birisi doğru ve etkili teşhis yöntemlerinin varlığıdır. Salgın hastalıkların yayılmasını sınırlamak, hastaları izole etmek ve uygun tedaviyi sağlamak, toplum sağlığı açısından hayati öneme sahiptir. Bu bağlamda, virüslerin teşhisindeki doğruluk, hız ve hassasiyet, veteriner ve tıp hekimliği pratiğinin ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir.

Ancak, bazı viral enfeksiyonların belirtileri klinik olarak benzerdir ve aynı hastada birden fazla viral etken bir arada bulunabilirler. Özellikle, hayvan sağlığına odaklanan veteriner hekimler ve teşhis laboratuvarları, birden fazla virüsün aynı anda teşhis edilmesinin gerekliliğini sıklıkla dile getirmektedir. Canine Parvovirus ve Canine Coronavirus gibi patojenler, hayvan sağlığını tehdit eden önemli faktörlerdir. Benzer şekilde, insanlarda da farklı viral enfeksiyonların aynı anda varlığı söz konusu olabilir ve bu durum, uygulanması gereken tedavi stratejilerini büyük ölçüde etkileyebilir.

Bu doktora tez çalışması, bu teşhis zorluğunu ele almak ve birden fazla virüsü aynı anda teşhis edebilecek, hızlı, güvenilir ve ekonomik bir teşhis kiti geliştirmek amacıyla gerçekleştirildi. Özellikle, Canine Parvovirus (CPV) ve Canine Coronavirus (CCoV) gibi patojenlerin aynı anda teşhisini hedefleyen bir test kitinin geliştirilmesi ve uygulanması bu çalışmanın temel amacıdır. Ancak bu yaklaşım, sadece veteriner hekimliği alanında değil, aynı zamanda insan sağlığına yönelik teşhislerde de geniş bir uygulanabilirlik potansiyeline sahip olacaktır. Bu çalışma, multidisipliner bir yaklaşımın ve ileri teknolojinin kullanımı ile hastalık kontrolü ve pandemi yönetimi gibi kritik sağlık alanlarında ihtiyaç duyulan hızlı ve güvenli teşhis yöntemlerine katkı sağlamayı hedeflemiştir. Bu çalışmanın sonuçları, sağlık sektörüne yönelik teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi ve iyileştirilmesi konusunda bir ilerleme kaynağı olabilir.

1.1. Canine Parvovirus

Canine Parvovirüs (CPV), dünya çapında evcil ve yabani köpekler arasında sık görülen, yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan enterik viral patojenlerden biridir ve akut gastroenterite sebep olur (Neeraj ve ark 2020, Eregowda ve ark 2020). Virus, Parvoviridae ailesine ait bir alt aile olan Parvovirinae'nin Protoparvovirus cinsine dahil olan Canine Protoparvovirus 1 türüdür ve Piccovirales takımında yer alır.

Virus, 1978 yılında evcil ve yabani köpekleri enfekte eden yeni bir virüs olarak ortaya çıkmıştır. Yüksek ateş, kusma, kanlı ishal ve genç hayvanlarda miyokardit gibi klinik belirtilerin ortaya çıkmasına sebep olarak ciddi klinik enfeksiyonlara sebep olmuştur (Decaro ve Buonavoglia 2012). Bu virus, "köpek dakika virüsü" olarak da bilinen Canine Parvovirus tip 1 (CPV-1)'den ayırt edilebilmesi için Canine Parvovirüs tip 2 (CPV-2) olarak adlandırılmıştır (Kwan ve ark 2021).

Canine Parvovirüs Tip 2 (CPV-2), Parvoviridae ailesinin Parvovirinae alt ailesi, Protoparvovirus cinsi ve Canine Protoparvovirus 1 türü içerisinde yer alır (Pollock ve ark 1993, Reed ve ark 1988). Önceden çoğunlukla kolibasil enfeksiyonları ile ilişkilendirilen virus, ilk kez 1977'de köpekler arasında ciddi gastroenteritin nedeni olarak tanımlanmıştır. Fekal-oral yolla bulaşan virus, lenf düğümlerinde replike olur ve dolaşım sistemi yoluyla sindirim sistemine ulaşır. Inkübasyon süresi 3-7 gün arasında değişmektedir ve bu sürenin ardından enfeksiyonun klinik belirtileri ortaya çıkar. Bu belirtiler arasında depresyon, iştah kaybı, kusma, yüksek ateş, şiddetli ishal ve yavru hayvanlarda miyokardit bulunmaktadır. Özellikle 4-12 haftalık hayvanlar olmak üzere altı aya kadar olan hayvanlar arasında son derece bulaşıcıdır. Bu dönemde, mevcut maternal antikorlar aşamalı olarak azaldığından, yavrular CPV-2 enfeksiyonuna daha duyarlı hale gelir. Hastalığa karşı korunmada mevcut en önemli tedbir 6-8 haftalıkken uygulanan aşıdır. Ancak mevcut aşılardan etkinliğini olumsuz yönde etkileyebilecek yeni CPV-2 varyantlarının ortaya çıkma olasılığı da bulunmaktadır ve bu durum aşı ile bağışıklama başarısını etkileyebilir (Pollock ve ark 1993, Kumar ve ark 2010, Decaro ve ark 2012).

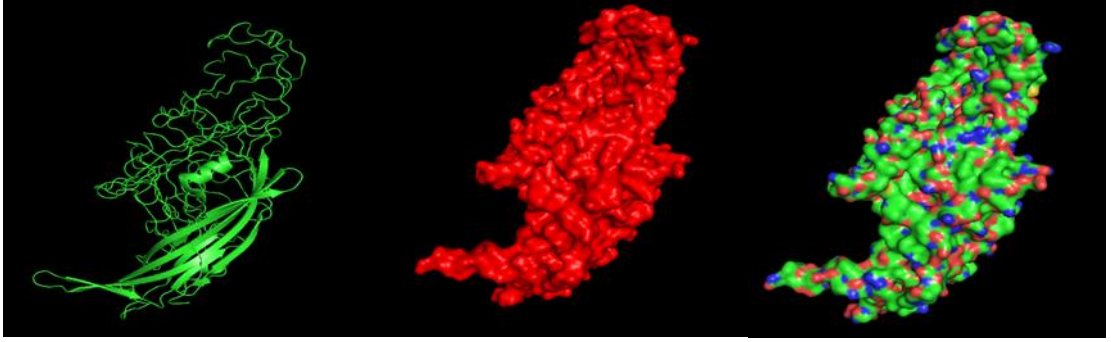
CPV-2, çapı 26 nm (nanometre) olan ikosahedral simetrik, zarf taşımayan küçük bir virustur. Tek iplikli (ss) negatif anlamı genom, 5323 nükleotit uzunluğundadır (Reed ve ark 1988 Khatri ve ark 2017). DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) molekülü, iki Açık Okuma Çerçevesi'nden (ORF) oluşur. Yapısal olmayan NS1 (non structural 1) ve NS2 (non structural 2) proteinlerini kodlayan ORF1, genomun 3' ucunda yer alır. Virusun üç yapısal proteini olan VP1 (Viral Protein 1), VP2 (Viral Protein 2) ve VP3 (Viral Protein 3)'ü kodlayan ORF2 ise genomun 5' ucunda yer alır. VP2 proteini (64 kDa), aynı mRNA'nın (Messenger Ribonükleik asit) alternatif splicingten türemiş VP1'in (84 kDa) kısaltılmış bir formudur. Yalnızca DNA içeren aktif virionlarda bulunan VP3 proteini ise VP2'nin amino terminusundaki 15-20 amino asidin (aa) post-translasyonel proteolitik parçalanması sonucu oluşur (Pollock ve ark 1993, Kumar ve ark 2010, Decaro ve ark

2012, Hernández-Blanco ve ark 2015, Day ve ark 2016). Tam kapsidler, VP2, VP3 ve VP1 kombinasyonlarının 60 kopyasından oluşur. Bu protein yapılanması arasında en yüksek oranda bulunan viral protein ise VP2'dir (%90) (Şekil 1.1). (Tsao ve ark 1991, Hernández-Blanco ve ark 2015 Day ve ark 2016). Bu özelliği ile VP2, ana kapsid protein olup, virusun konak aralığının belirlenmesinde temel etken olarak önem teşkil eder (Mira ve ark 2019). Ayrıca, VP2 proteini varyanslar arasında gösterdiği yüksek değişkenlik sebebiyle CPV-2'nin karakterizasyonu ve filogenetik çalışmalarda ana odak noktasıdır (Mira ve ark 2018, Tucciarone ve ark 2018, Battilani ve ark 2019, Li ve ark 2019).

CPV-2 evrimiyle ilgili iki farklı hipotez öne sürülmüştür. Bu alanda yapılan çalışmalar, CPV-2'nin Feline Panlökopeni virusu (FPLV) veya FPLV benzeri bir varyantı olarak ortaya çıktığını savunmuştur (Parrish ve ark 1990 Parrish ve ark 1991). Buna karşın, güncel çalışmalar CPV-2 ve FPLV viruslarının bilinmeyen kökenli ortak bir atadan türediğini ve bağımsız bir şekilde evrildiğini rapor etmiştir. Bir DNA virusu olan CPV-2'nin RNA viruslarına benzer şekilde çok yüksek bir genomik değişim hızına sahip olarak hızla evrildiği bildirilmiştir (Shackelton ve ark 2005, Allison ve ark 2013).

İlk kez 1977 yılında ortaya çıkmasının ardından, virus hızlı bir evrim geçirmiş ve dünya çapında yeni antijenik varyantlar oluşmuştur. Virusun orijinal tipi olarak tanımlanan CPV-2 OR'nin ortaya çıkmasının ardından, birkaç antijenik varyant tanımlanmış ve CPV-2a, 2b, 2c, New2a ve New2b olarak isimlendirilmiştir (Parrish ve ark 1985, Parrish ve ark 1988, Parrish ve ark 1991, Truyen ve ark 1999, Buonavoglia ve ark 2001, Battilani ve ark 2001, Martella ve ark 2004). Bu suşlar arasında CPV-2a suşları A300G değişimini gösterir. Bununla birlikte CPV-2b ve CPV-2c ise sırasıyla N426D ve N426E ek amino asit mutasyonlarına sahiptir (Parrish ve ark 1985, Parrish ve ark 1988, Parrish ve ark 1991, Buonavoglia ve ark 2001, Martella ve ark 2004). Diğer suşlar olan CPV-New2a ve CPV-New2b varyantları ise CPV-2a ve 2b varyantlarına kıyasla S297A amino asit mutasyonu göstermeleri ile karakterizedir (Truyen ve ark 1999, Buonavoglia ve ark 2001, Battilani ve ark 2001). Aşı suşu olarak CPV-2 OR'nin kullanılması CPV-2 varyantlarının baskın hale gelmesi ve CPV-2 OR'nin azalması ile sonuçlanmıştır. Ancak CPV-2 OR hala köpeklerde tespit edilebilmektedir. Sahada bulunan CPV-2 varyantları ve CPV-2 OR'nin yanı sıra, aşı kaynaklı suşlar olarak tanımlanan diğer varyantlar da köpeklerde tespit edilmektedir. Bu suşlar arasında en yaygın olanlar Intervet suşu (CPV-2 INT) (Nobivac Puppy DP aşısında bulunur) ve Pfizer suşu (CPV-2 PF) (Vanguard aşısında bulunur) suşlarıdır. (Truyen ve ark 1999, Battilani ve ark 2001, Yoon ve ark

2009, Calatayud ve ark 2019).



Şekil 1.1 VP2'nin 3D yapısı ve element dizilişi (C:yeşil H:sarı N:mavi O:kırmızı S:turuncu)

1.2. Canine Coronavirus

Canine Coronavirus, Coronaviridae ailesinin I. grubuna ait, zarflı ve tek zincirli bir RNA virusudur. Bu ailede, domuzların bulaşıcı gastroenterit virusu (TGEV), domuzların solunum koronavirusu (PRCoV), domuzların salgın ishal virusu (PEDV), insan koronavirusu 229E (HCoV 229E) ve kedi koronavirusları (FCoVs) gibi diğer viruslar da yer almaktadır. Virusun genomu, tüm genomun yaklaşık olarak üçte ikisini oluşturan iki büyük ORF olan ORF1a ve ORF1b'den meydana gelir. Bu iki ORF kısmen birbirleri ile kesişmekte olup, virusun replikaz enzimlerinin sentezini sağlayarak önemli bir rol oynamaktadır. Genomun geri kalan üçte birlik kısmında, yapısal olmayan proteinlerin yanı sıra yapısal proteinleri de kodlayan diğer ORF'ler yer alır. Yapısal proteinler, sırasıyla ORF2, ORF4, ORF5 ve ORF6 tarafından kodlanan spike (S), zarf (E), zar (M) ve nükleokapsid (N) proteinlerinden oluşur. Bu proteinler, virusun yapısını oluşturan ve proteinler olup enfeksiyon sürecinin de kritik bileşenleridir (Binn ve ark 1974, Keenan ve ark 1976, Appel 1987, Luytjes 1995, Enjuanes ve ark 2000).

Köpeklerde başlıca ince bağırsak villus uçlarındaki enterositlerde ve kolon epitelinde replike olan virus hafiften şiddetliye değişen derecelerde enterite neden olur. Enfekte yavrularda dışkıda uzun süreli viral saçılım gözlenir ve bu saçılım, bazı durumlarda birkaç ay boyunca devam edebilir (Pratelli ve ark 2001 Pratelli ve ark 2002). Bugüne kadar, CCoV tip I (CCoV-I) ve CCoV tip II (CCoV-II) olmak üzere iki farklı genotipi bildirilmiştir. Bu genotiplerden CCoV tip II, CCoV-IIa (klasik suşlar) ve CCoV-IIb olmak üzere iki alt türe ayrılmıştır. CCoV-IIb'nin CCoV-IIa ve bulaşıcı gastroenterit virusu (TGEV) arasında gerçekleşen muhtemel bir rekombinasyon sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (Ntafis ve ark 2013).

İmmünolojik fonksiyonlar, Coronaviridae ailesine ait viruslerin yapısal bileşenleri olan S (Spike) ve M (Membrane) proteinleri ile ilişkilendirilir. S glikoproteini, virus partiküllerinin yüzeyinde yer alan büyük taç benzeri dikenlerin oluşmasından sorumludur. Bu protein, genellikle S1 ve S2 alt bölümlerine ayrılan büyük bir dış bölge içinde yer alır. Ayrıca, transmembran bir bölge ve kısa bir karboksil-terminal bölgesi de içerir. S1 dizisi, genellikle değişkendir ve bu bölgedeki mutasyonlar, virusun patojenitesinin ve antijenitesinin değişmesiyle ilişkilendirilmektedir. Diğer yandan, S2 dizisi daha yüksek oranda korunmuştur. S glikoproteini, nötralizan antikorların başlıca hedefidir. Ayrıca virusun hücrelere tutunması, virusun hücre zarıyla kaynaşması ve zaman zaman hücreler arası kaynaşmayı sağlaması gibi bir dizi önemli biyolojik işlevini de yerine getirir. M glikoproteini, diğer yapısal proteinlerden farklıdır. Virus zarının dışında sadece kısa bir amino-terminal bölge bulunur. Bu bölgede, üç katmanlı bir zar geçiş bölgesi ve zar içinde geniş bir karboksil-terminal bölgeden oluşur. S proteininin ana immünolojik rolü teşkil ettiğine dair bir görüş olsa da, M proteininin hem amino-terminalinin hem de karboksil-terminalinin güçlü bir immün yanıtı tetiklediği de bildirilmiştir. Aynı şekilde nükleokapsit proteini de güçlü bir immün yanıt oluşturmaktadır (Enjuanes ve ark 2000, Pratelli 2006, Ntasis ve ark 2013).

Son zamanlarda, enterit belirtisi görülen yavruların dışkılarında CCoV tip I ve tip II olarak adlandırılan iki farklı genotip tespit edilmiştir. Tip I ve tip II, ORF2 (S geni) ve ORF5 (M geni) fragmanlarını seçici olarak çoğaltabilen moleküler yöntemlerle ayırt edilebilir (Pratelli ve ark 2002, Pratelli ve ark 2003, Pratelli ve ark 2004, Pratelli 2006) ancak bu iki genotipi ayırt edebilecek nicel teknikler henüz geliştirilmemiştir.

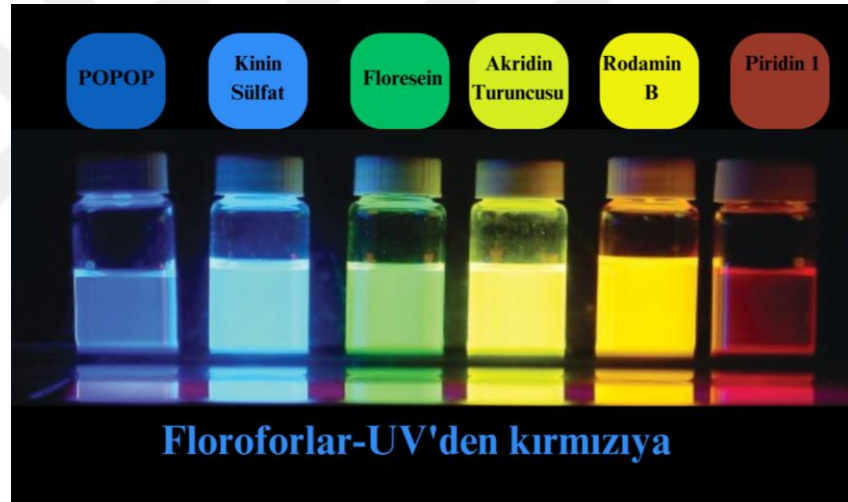
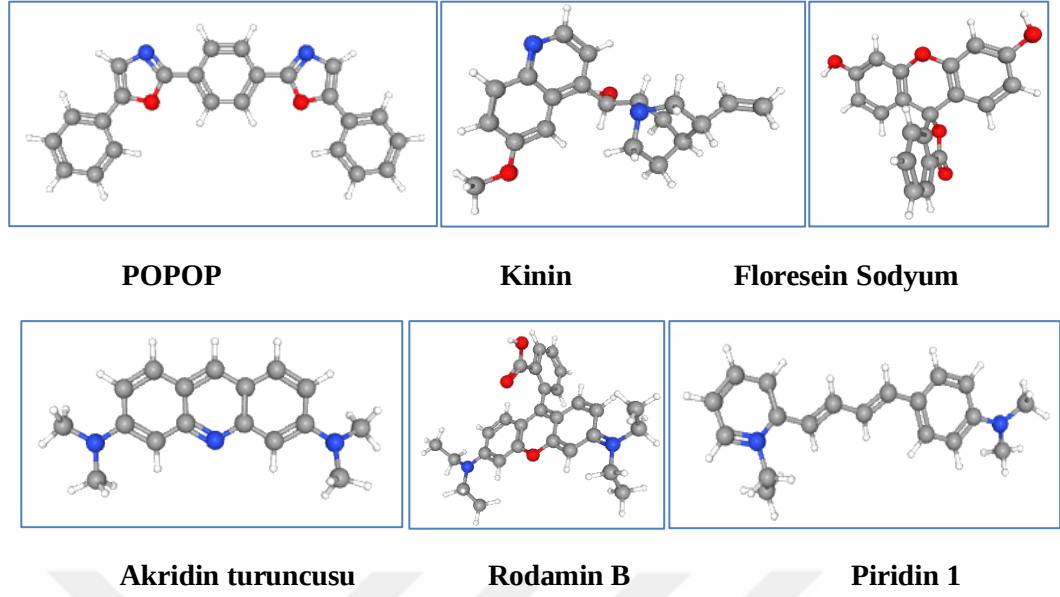
1.3. Floresans Fenomeni

Luminesans, bir maddenin elektronik olarak uyarılmış hallerinden kaynaklanan ışık emisyonunu (yayılmasını) ifade eder. Bu fenomen, genellikle floresans ve fosforesans olmak üzere iki kategoriye ayrılır ve uyarılmış durumun özelliklerine bağlı olarak ortaya çıkar. Uyarılmış bir singlet durumunda, uyarılmış orbitaldeki elektron, temel durumdaki ikinci elektronla çiftlenir. Bu nedenle, temel duruma dönüş, spin izinli ve hızlı bir şekilde foton yayarak gerçekleşir. Floresans emisyon hızları tipik olarak 10^8 s^{-1} seviyesindedir. Bu da bir floroforun tipik ömrünün yaklaşık olarak 10 ns (nano saniye) ($10 \times 10^{-9} \text{ s}$) olduğu anlamına gelir. Bu süre, ışığın hızı bağlamında düşünüldüğünde oldukça değerlidir. Bir nanosaniyede ışık yaklaşık olarak 30 cm veya bir feet mesafe kateder. Birçok floroforun

ömrü subnanosaniye seviyesindedir. Floresansın kısa zaman ölçeği nedeniyle, zamanla çözömlü emisyonun ölçölmesi çok özel optik ve elektronik ekipmanlarını gerektirir. Bu deneyimsel zorluklara rağmen, zamanla çözömlü floresans geniş bir kullanım alanına sahiptir çünkü bu teknik, veri elde etme kapasitesi açısından kararlı veya durağan durum ölçömleriyle karşılaştırıldığında önemli avantajlar sunar (Herschel 1845, Przibram 1956, Deerinck ve ark 1994, Larramendy ve ark 1994, Lichtman ve Conchello 2005, Lakowicz 2006, Valeur ve Berberan-Santos 2012, Murthy ve Virk 2014).

Fosforesans, üçlü uyarılmış durumların ışık emisyonu olarak tanımlanır. Bu durumda, uyarılmış orbitaldeki elektron, temel durumdaki elektronla aynı spin yönelimine sahiptir. Temel duruma geri dönüşler engellenmiştir ve emisyon hızları oldukça yavaş (10^3 - 10^0 s⁻¹) olduğundan, fosforesansın tipik olarak milisaniyelerden saniyelere kadar süren bir ömrü vardır. Bu süre zarfında, örneğin "karanlıkta parlayan" oyuncaklarda olduğu gibi, daha uzun ömürlü fosforesans gözlemlenebilir. Işık maruziyetinden sonra, fosforesans özellikleri uyarılmış fosforların yavaşça temel duruma dönüşme süreci nedeniyle birkaç dakika boyunca ışık yaymaya devam eder. Fosforesans, genellikle oda sıcaklığında sıvı çözeltilerde gözlemlenmez. Bu durum emisyonu rekabet eden non-radyatif deaktivasyon süreçleri ve sönme gibi birçok faktörün varlığından kaynaklanır (Herschel 1845, Przibram 1956, Deerinck ve ark 1994, Larramendy ve ark 1994, Lichtman ve Conchello 2005, Lakowicz 2006, Cohen 2010, Valeur ve Berberan-Santos 2012).

Floresans genellikle aromatik moleküllerin yapısal özelliklerinden kaynaklanır. Şekil 1.2'de gösterilen floroforlar, tipik floresan maddelere örnektir. Tonik suda bulunan kinin, bu tür floforlar için sıkça rastlanan bir örnektir. Güneş ışığında kinin çözeltilisinden kaynaklanan floresansın ilk gözlemi, Sir John Frederick William Herschel tarafından 1845 yılında rapor edilmiştir. Güneş ışığına maruz kalmış bir bardak tonik su gözlemlendiğinde, genellikle yüzeyde hafif mavi bir parıltı fark edilmektedir. Bu parıltı, bardağın güneş ışığının yönüne dik bir açıyla gözlemlendiğinde ve dielektrik sabiti daha düşük, yani daha az polar olan çözücüler eklenerek azaltıldığında en belirgin hale gelmektedir. Tonikte bulunan kinin, güneşin UV (ultraviyole) ışığıyla uyarılır. Temel duruma döndüğünde, kinin yaklaşık 450 nm (nanometre) dalga boyunda mavi ışık yayar. Kinin floresansının parlaklığının çözücünün polaritesine bağlı olması, çevresel koşullar hakkında daha fazla bilgi edinmenin bir yoludur (Herschel 1845, Przibram 1956, Deerinck ve ark 1994, Larramendy ve ark 1994, Bastiaens ve ark 2001, Lakowicz ve Lakowicz 1999, Lakowicz 2006, Valeur ve Berberan-Santos 2012).



Şekil. 1.2 Tipik floresan maddelerin yapıları ve emisyon renklerine göre fotoğrafları

Günlük yaşamda birçok farklı floroforla karşılaşmak mümkündür (Şekil 1.2). Antrasen ve perilen gibi polinükleer aromatik hidrokarbonlar da floresan özellik gösterir ve bu tür bileşenlerden kaynaklanan emisyon, petrol kirliliğinin çevresel olarak izlenmesinde kullanılır. Ayrıca, bazı türevli organik bileşikler de floresan özellik sergiler. Örneğin, 1,4-bis (5-fenilokzazol-2-il) benzen (POPOP), sintilasyon sayımında kullanılırken, akridin turuncusu genellikle bir DNA boyası olarak kullanılır. Piridin 1 ve rodamin ise sıkça boya lazerlerinde kullanılır (Larramendy ve ark 1994, Lakowicz ve Lakowicz 1999, Lakowicz 2006, Cohen 2010, Valeur ve Berberan-Santos 2012).

Fluoresein sodyum, ksanten boyaları ailesinin bir üyesi olup, mavi veya ultraviyole

ışığa maruz kaldığında canlı yeşil bir floresans yaymaktadır. Floresein ve rodamin, antikorların işaretlenmesi süreçlerinde yaygın olarak kullanılır. Bu iki floresan madde ile işaretlenmiş çeşitli immünglobulinler ticari olarak temin edilebilir ve bu proteinler sıklıkla floresans mikroskopisinde kullanılır. Bu problemlerin tercih sebepleri arasında yüksek kuantum verimliliği ve uzun absorpsiyon / emisyon dalga boyları bulunur. Bu floroforların uzun dalga boylarına sahip olması da biyolojik örneklerden kaynaklanan arka plan floresansının sebep olacağı olası sorunları en aza indirir ve mikroskobide kuvars optiği gerekliliğini ortadan kaldırır. Bu floresan boyaların ömrü yaklaşık olarak 4 nanosaniyedir ve emisyon spektrumu çözücünün polaritesine karşı önemli ölçüde hassas değildir. Bu boyalar, küçük işaretli moleküllerin proteinlerle etkileşimlerini floresans polarizasyonundaki değişiklikler aracılığıyla ölçmek için uygundur (Herschel 1845, Prizbram 1956, Deerinck ve ark 1994, Larramendy ve ark 1994, Bastiaens ve ark 2001, Lakowicz 2006, Valeur ve Berberan-Santos 2012, Davidson 2012).

FITC (Fluoresein İzotiosiyanat) ise fluoresein'in izotiosiyanat grubuyla modifiye edilmiş bir türevidir ve aynı canlı yeşil floresans özelliklerini gösterir. Fluorescein İzotiosiyanat, özellikle proteinler, antikorlar ve nükleik asitler gibi biyomoleküller için bir etiketleme ajanı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu boyayı diğer floresan boyalardan ayıran özellik, amino gruplarına kolayca bağlanabilmesine olanak tanıyan izotiosiyanat grubudur. Bu özellik, FITC'yi özellikle immünofloresan uygulamalarında hücrelerde ve dokularda antijenlere özgü hedefleme için antikorları etiketlemek amacıyla mükemmel bir seçenek haline getirir. Mavi veya ultraviyole ışığa maruz kaldığında, FITC parlak yeşil bir floresans yayar ve floresans mikroskopisi kullanılarak görselleştirilebilir. Özellikle immünoloji alanında, hücresel süreçleri, protein-protein etkileşimlerini ve antijen-antikor reaksiyonlarını incelemekte önemli bir rol oynamıştır (Prizbram 1956, Deerinck ve ark 1994, Larramendy ve ark 1994, Bastiaens ve ark 2001, Lakowicz 2006, Valeur ve Berberan-Santos 2012, Davidson 2012, Deshayes ve Divita 2013).

1.3.1. Absorbsiyon, Emisyon ve Uyarılmış Hal

Bir atom veya molekülde elektronlar belirli enerji seviyelerine yerleşir ve bu seviyelere elektron yörüngeleri veya orbital denir. Atom çekirdeğine en yakın olan en düşük enerji seviyesine temel durum denir. Bir foton (ışık enerjisi paketi) atom veya molekülle etkileşime geçtiğinde, fotonun enerjisi temel durum ile bir uyarılmış durum arasındaki enerji farkına uyuyorsa bir elektron tarafından absorbe edilebilir. Bir atom veya

moleküldeki enerji seviyeleri, sadece belirli, kesirli değerlere sahip olabilen “quantized” yani kuantumla ilgili olmalarının bir sonucudur. Her enerji seviyesi, bir elektronun sahip olabileceği belirli bir enerji miktarına karşılık gelir. Temel durumda olan bir elektrona doğru enerji seviyesinde olan bir foton çarptığında, bu foton enerjisini elektrona iletir. Bu ekstra enerji, elektronun enerji bariyerini aşmasına ve daha yüksek bir enerji seviyesine geçmesine izin verir. Böylece elektron, geçici olarak “uyarılmış” hâle gelir. Temel durum ile uyarılmış durum arasındaki enerji farkı ise absorbe edilen fotonun enerjisine karşılık gelir. Bu enerji, elektronun daha yüksek bir enerji seviyesine geçmesi için kullanılır. Ancak tüm fotonlar absorbe edilmez. Sadece atom veya molekülün belirli enerji seviyelerine uygun enerjiye sahip fotonların absorpsiyonu gerçekleşir. Bir fotonun enerjisi çok düşük veya çok yüksekse absorbe edilmez ve elektron orijinal durumunda kalır. Absorpsiyondan sonra elektron, fazladan enerjiyi bir foton olarak yayarak baştaki düşük enerji durumuna (temel durum) geri dönecektir. Yayılan foton genellikle absorbe edilen fotona göre daha düşük enerjili ve daha uzun dalga boyuna sahiptir (Trozzolo ve Gibbons 1967, Ehrig ve ark 1995, Birks 1970, Berlman 1971, DaCosta ve ark 2003, Chang 2003, Kao ve ark 2001, Pan ve ark 2006, Valeur ve Berberan-Santos 2012).

İlk uyarılmış singlet durumdan (S1) temel singlet duruma (S0) geçiş floresans olarak adlandırılır. Bu süreç, elektronun daha yüksek enerji durumundan (S1) daha düşük enerji durumuna (S0) dönmesi sırasında fotonların emisyonu olarak açıklanır. Emisyonu gerçekleşen ışık genellikle absorbe edilen ışığa göre daha düşük enerjiye ve daha uzun dalga boyuna sahiptir. Bu, absorbe edilen enerjinin bir kısmının, floresans emisyonu gerçekleşmeden önce ısı veya diğer enerji formları olarak kaybolması nedeniyle meydana gelir. Bu durum, yayılan fotonların absorbe edilen fotonlara göre daha düşük enerjiye ve daha uzun dalga boylarına sahip olmasına neden olur. Bu olgu, Stokes kayması olarak bilinir ve floresansın karakteristik bir özelliğidir (Stokes 1852, Trozzolo ve Gibbons 1967, Ehrig ve ark 1995, Birks 1970, Berlman 1971, DaCosta ve ark 2003, Chang 2003, Kao ve ark 2001, Pan ve ark 2006, Valeur ve Berberan-Santos 2012).

Ayrıca, temel durumda sadece bir türün bulunduğu varsayımı altında, floresans emisyonunun özellikleri, büyük ölçüde uyarılmış halin dalga boyundan bağımsızdır. Bu uyarılmış hal için kullanılan belirli dalga boyunun, emisyonu gerçekleşen floresansın davranışını, polarizasyon dışında, önemli ölçüde etkilemediği anlamına gelir. Kısa süreli bir ışık darbesi ile bir molekül popülasyonu uyarıldıktan sonra, floresansın yoğunluğu zamanla üssel bir şekilde azalacaktır. Bu azalma, moleküllerin uyarılmış S1 durumunda

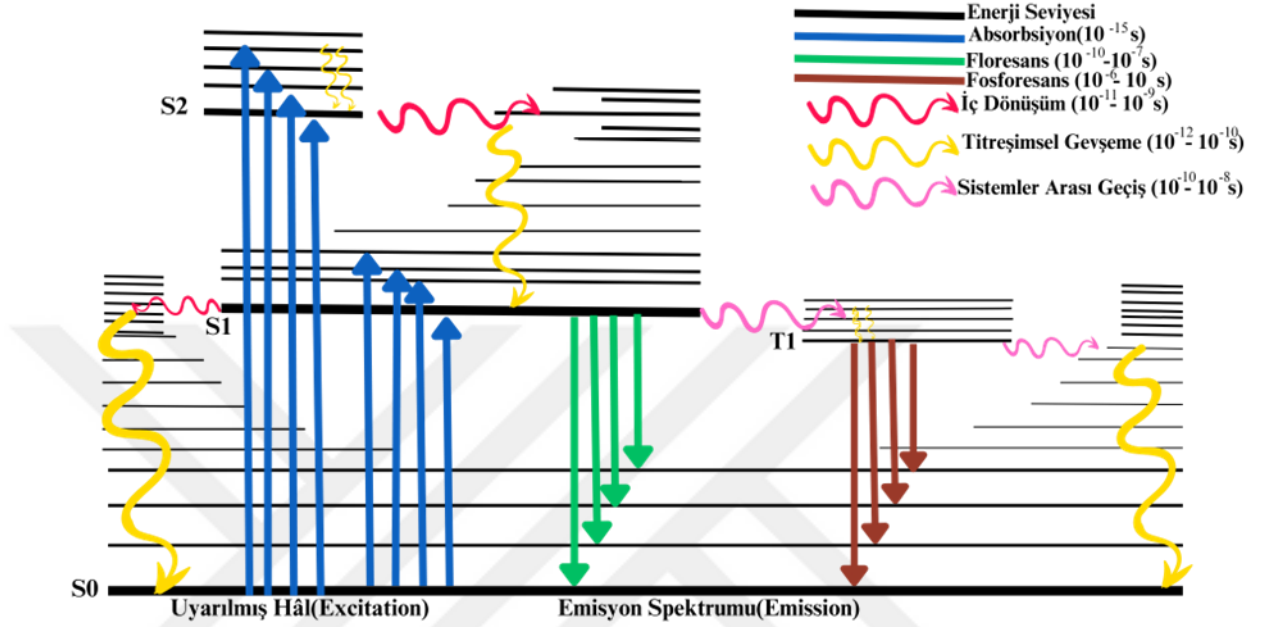
geçirdiği ortalama süreyi temsil eden belirli bir zaman sabiti ile karakterizedir. Bu karakteristik süreye uyarılmış durum ömrü denir. Bu, bir molekülün genellikle uyarılmış bir durumda ne kadar süre kaldığını ve temel durumuna dönmeden önce bir foton yayımladığını göstermektedir (Trozolo ve Gibbons 1967, Ehrig ve ark 1995, Birks 1970, Berlman 1971, DaCosta ve ark 2003, Chang 2003, Kao ve ark 2001, Pan ve ark 2006, Cohen 2010).

Genellikle görünür ve UV ışık gibi yüksek enerjili elektromanyetik radyasyon türleri tarafından etkilenen floresans, bir maddenin bu enerjiyi absorbe etmesi ve daha sonra bu enerjiyi yeniden yayarak floresan oluşturması sürecini ifade eder. Özellikle UV ışık, floresansın sıkça tetikleyicisi olarak kullanılır, çünkü yeterli enerji taşır ve birçok maddeyi uyarabilir. Daha sonra, bu uyarılmış maddenin atomları enerjilerini radyasyon yoluyla serbest bırakır ve bu süreç sonucunda floresans meydana gelir. Düşük enerjili bir elektromanyetik radyasyon türü olan kırmızı ışık, genellikle floresansı tetikleme kapasitesine sahip değildir. Floresansın etkilendiği radyasyon türleri genellikle daha yüksek enerjili elektromanyetik radyasyon türleridir. Bu nedenle, kırmızı ışık genellikle bu tür floresansı tetikleyemez (Trozolo ve Gibbons 1967, Ehrig ve ark 1995, Birks 1970, Berlman 1971, DaCosta ve ark 2003, Chang 2003, Kao ve ark 2001, Valeur ve Berberan-Santos 2012, Chen ve ark 2016, Xiong ve ark 2018).

1.3.2. Jablonski diagramı

Perrin-Jablonski diyagramı (Şekil 1.3), foton absorpsiyonu, iç dönüşüm, floresans, ara sistem geçişleri, fosforesans, gecikmiş floresans ve triplet-triplet geçişleri gibi olası süreçleri basit bir şekilde görselleştirmek ve açıklamak için uygun ve açıklayıcı bir diagramdır. Singlet elektronik durumlar S_0 (temel elektronik durum), S_1 , S_2 , ... olarak gösterilirken, triplet durumlar T_1 , T_2 , ... olarak gösterilir. Her elektronik durumla titreşimsel seviyeler birbirleri ile ilişkilidir. Absorpsiyonun, diğer tüm süreçlere göre çok hızlı olduğuna (yani Franck-Condon prensibine göre çekirdeklerin eş zamanlı olarak yer değiştirmemesine) dikkat etmek önemlidir. Absorpsiyona karşılık gelen dikey oklar, S_0 'ın (en düşük) titreşimsel enerji seviyesinden başlar çünkü moleküllerin çoğunluğu oda sıcaklığında bu seviyededir. Bir fotonun absorpsiyonu, bir molekülü S_1 , S_2 , ... titreşimsel seviyelerinden birine getirebilir. Jablonski diyagramı, tipik olarak singlet temel (S_0), birinci (S_1) ve ikinci (S_2) elektronik durumları tasvir eder. Bu elektronik enerji seviyelerinin her birinde, floroforlar 0, 1, 2 vb. olarak belirtilen bir dizi titreşimsel enerji seviyesinde

bulunabilir. Bu geçişler, çekirdeklerin önemli ölçüde yer değiştirmesi için çok kısa bir süre olan yaklaşık 10^{-15} saniyede gerçekleşir. Bu prensip, Franck-Condon prensibi olarak bilinir (Perrin 1922, Jablonski 1933, Perrin 1926, Turro 1991, Nickel 1996, Valeur ve Berberan-Santos 2012, Limpouchová ve Procházka 2016, Feng ve ark 2020).



Şekil 1.3 Jablonski diagramı

1.3.3. Titreşimsel Rahatlama (Vibration relaxion)

Titreşimsel Rahatlama, bir fotonun absorpsiyonunu takiben bir molekülün elektronik olarak uyarılmış hale geçmesiyle gerçekleşen temel bir süreci ifade eder. Foton emilimi sırasında bir molekül, uyarılmış bir duruma geçerek daha yüksek enerji seviyelerine ulaşır. Bu geçiş, genellikle molekülün, içindeki atomların denge pozisyonları etrafında salınım yaparak, titreşimsel hareket biçiminde aşırı enerji kazanmasına neden olur. Titreşimsel rahatlama, bu aşırı enerjinin, uyarılmış durumun doğasında bulunan titreşimsel modlar arasında yayılması anlamına gelir. Bu süreç, bir sistemin hareketlerinin sakinleştirilmesine benzer ve bu da genel titreşimsel enerjinin azalmasına ve uyarılmış durumdaki daha düşük titreşim seviyelerindeki yoğunluğun artmasına yol açar. Titreşimsel rahatlamanın önemi, elektronik uyarımdan kaynaklanan energetik farklılıkları dengeleme rolünde yatar ve bu da uyarılmış durum içinde istikrarın oluşmasına yardımcı olur. Bu süreç, enerji dağıtım mekanizmalarının karmaşık etkileşiminde temel bir arabulucu olarak

görev yapar ve uyarılmış molekülün davranışını belirleyen sonraki dinamikleri ve bozunma yollarını etkiler. Ayrıca, titreşimsel rahatlama, fiziksel kimyadan malzeme bilimine kadar geniş bir bilim disiplini yelpazesinde derinlemesine öneme sahiptir (Perrin 1922, Jablonski 1933, Perrin 1926, Lichtman ve Conchello 2005, Valeur ve Berberan-Santos 2012, Limpouchová ve Procházka 2016, Feng ve ark 2020).

1.3.4. İç Dönüşüm (Internal Conversion)

İç Dönüşüm (ID), moleküler foto-fizik alanında karşılaşılan önemli bir radyoaktif olmayan süreci temsil eder. Bu süreç, elektronik uyarılma sırasında elde edilen fazla enerjinin bir foton yayınlamadan dağıtılmasını sağlar. Bunun yerine, bu fazla enerji, genellikle yakın çevredeki diğer moleküllerle gerçekleşen çarpışmalar aracılığıyla etkin bir şekilde çevresel ortama iletilir. Bu süreçte, uyarılmış molekül aynı spin çoğulluğu içinde daha düşük bir elektronik duruma geçiş yapar. Bu geçiş, molekülün enerji seviyesinde bir azalma olarak ortaya çıkar ve bu da elektronik uyarılmayı etkili bir şekilde azaltır. İç Dönüşüm'ün önemi, uyarılmış durum dinamiklerinin karmaşık peyzajında rekabetçi bir rol oynamasından kaynaklanır. Bu, fazla enerjinin yayılarak foton olarak serbest bırakıldığı floresans ve fosforesans gibi radyatif süreçlerle yarışır. İç Dönüşüm, enerjiyi moleküler etkileşimlere yönlendirerek uyarılmış durumun rahatlama hızını kolaylaştırır. Bu süreç, elektronik olarak uyarılmış moleküllerin kaderini belirlemede temel bir rol oynar, foto-uyarı olaylarının genel verimliliğini ve sonucunu etkiler. Bilimsel araştırmalarda, İç Dönüşüm süreçlerinin karakterize edilmesi ve anlaşılmasının derinlemesine önemi vardır. Kimya, fizik ve biyofizik gibi çeşitli disiplinleri kapsar. Ayrıca, bu sürecin pratik uygulamaları, fotodetektörlerin ve fotovoltaik cihazların geliştirilmesinden optoelektronik uygulamalar için yeni malzemelerin tasarımına kadar bir dizi alanda bulunmaktadır (So ve Dong 2001, Lichtman ve Conchello 2005, Valeur ve Berberan-Santos 2012, Limpouchová ve Procházka 2016, Feng ve ark 2020).

1.3.5. Floresans

Floresans, elektronik uyarıya maruz kalmış ve daha sonra daha düşük enerjili temel durumlarına dönen moleküllerde gözlemlenen özgül bir foto-fiziksel fenomendir. Bu süreçte molekülden bir foton yayılır. Işık yayılımı, molekül içindeki elektronların yüksek enerji seviyelerinden düşük enerji seviyelerine geçerek rahatlama sonucu meydana gelir.

Floresans süreci, genellikle nanosaniyeler düzeyinde meydana gelerek hızlı bir zaman ölçeğiyle karakterizedir. Bu hızlı geçiş, floresans ilişkilendirilen radyatif bozunma yollarının göreceli olarak verimli doğası ile ilişkilidir. Bir fotonun emilimi ile bir molekül, artmış enerjiye sahip olan uyarılmış bir elektronik duruma geçer. Temel duruma geri dönüş, bir fotonun yayılmasıyla kolaylaşır ve bu sürece belirgin bir spektral profil eşlik eder. Bu ışık yayılımı, analitik kimya, moleküler biyoloji ve malzeme bilimi gibi bir dizi bilimsel uygulama için temel öneme sahiptir. Floresans ayırt edici zaman ve spektral özellikleri, onu çeşitli alanlarda vazgeçilmez bir araç haline getirir ve araştırmacılara moleküler etkileşimleri sorgulama, dinamik süreçleri takip etme ve ileri teknolojilerin geliştirilmesine olanak tanır (Herschel 1845, Przibram 1956, Deerinck ve ark 1994, Larramendy ve ark 1994, Bastiaens ve ark 2001, Lakowicz ve Lakowicz 1999, Lakowicz 2006, Valeur ve Berberan-Santos 2012).

1.3.6. Sistemler Arası Geçiş (Intersystem Crossing)

Sistemler Arası Geçiş (SAG), moleküler foto-fizik alanında karşılaşılan önemli bir radyatif olmayan fenomendir ve uyarılmış bir molekül içinde farklı spin çoğulluklarına sahip elektronik durumlar arasındaki geçişi ifade eder. Örneğin, bir molekül başlangıçta bir singlet uyarılmış durumuna (S1) yükseltildiğinde, SAG süreçleri bir triplet uyarılmış durumuna (T1) dönüşümüne neden olabilir. Spin çoğulluklarındaki farklılık, bu durumların elektronlarının açısal momentum özelliklerinden kaynaklanır. Singlet durumunda, elektronlar zıt spinlere sahip olduğundan toplam açısal momentumları sıfırdır; oysaki triplet durumunda, elektron spinleri paralel bir konfigürasyonda hizalanır, bu da net sıfır olmayan bir açısal momentumu ortaya çıkarır. Genellikle spin-yörünge eşlenmesi fenomeni tarafından kolaylaştırılan SAG, elektronların içsel spinleri ile atomik veya moleküler orbital içindeki hareketleri arasındaki etkileşimden kaynaklanan bir etkileşimdir. Bu eşleşme, farklı spin çoğulluklarına sahip elektronik durumlar arasındaki geçişleri tetikler, bu da foto-uyarıma maruz kalan moleküler sistemlerde gözlemlenen büyüleyici dinamiklere yol açar. SAG'nin temelindeki kuantum mekanik prensiplerin karmaşık etkileşimi, moleküler elektronik yapısı ve dinamiğinin çalışılmasında derin bir ilgi konusu olarak kabul edilir (Larramendy ve ark 1994, Bastiaens ve ark 2001, So ve Dong 2001, Lichtman ve Conchello 2005, Valeur ve Berberan-Santos 2012, Limpouchová ve Procházka 2016, Feng ve ark 2020).

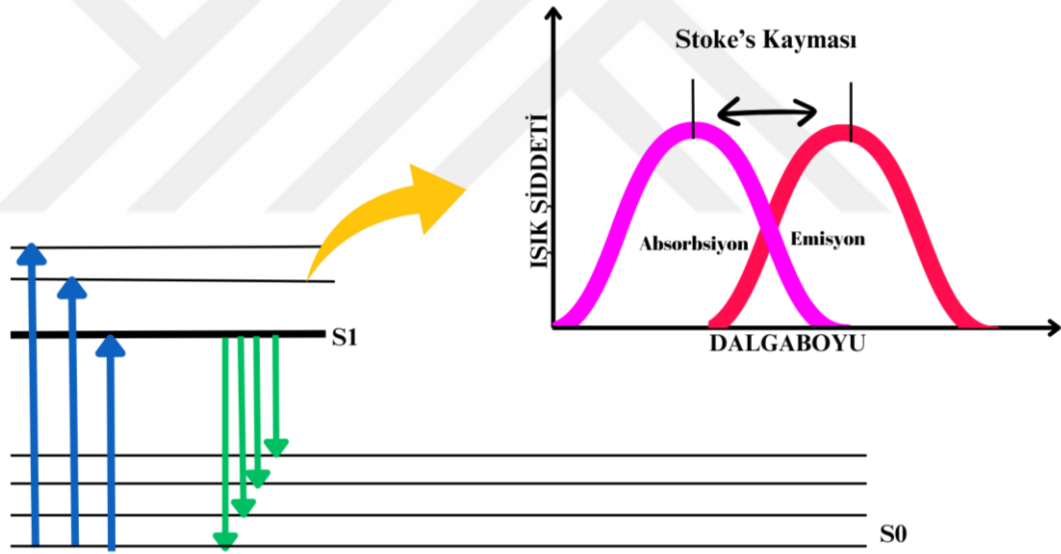
1.3.7. Radyatif Olmayan Bozunma (Non-Radiative Decay)

Radyatif Olmayan Bozunma (ROB), bir molekül içinde elektronik uyarılma sonrasında meydana gelen ve bir foton yayılmadan fazla enerjinin dağıtılmasına yol açan çeşitli süreçleri içermektedir. Floresans ve fosforesans gibi radyatif süreçlerin aksine, ROB mekanizmaları fazla enerjiyi moleküler iç veya ara-moleküler etkileşimlere yönlendirir. Sıkça gözlenen bir ROB süreci, enerjinin komşu moleküllere transferini içermektedir ve bu fenomen, yoğun nüfusa sahip ortamlarda sıklıkla gözlemlenir. Bu ara-moleküler enerji transferi, uyarılmış durumun rahatlamasına katkı sağlayarak sonunda enerjinin sistemin içinde yeniden dağıtılmasına neden olur. Ayrıca, ROB, iç dönüşüm gibi molekül içi süreçleri de içermektedir. Bu mekanizma, fazla enerjinin aynı molekül içinde titreşimsel veya dönme modlarına kanalize edilmesini içerir. Molekül, elektronik temel durumuna doğru ilerlerken genellikle titreşimsel rahatlatma ile birlikte düşük enerjili elektronik durumlara geçer. Radyatif olmayan bozunma yollarının yaygınlığı ve çeşitliliği, elektronik olarak uyarılmış durumların kaderini belirleme konusundaki önemli rolünü vurgular ve bu, moleküllerin davranışını ve dinamiklerini birçok farklı bilim disiplini de etkileyen bir faktör olarak ortaya koyar (Larramendy ve ark 1994, Bastiaens ve ark 2001, So ve Dong 2001, Lichtman ve Conchello 2005, Valeur ve Berberan-Santos 2012, Limpouchová ve Procházka 2016, Feng ve ark 2020, Lincoln 2001, Deng ve ark 2001)

1.3.8. Harici Dönüşüm (External Conversion)

Harici Dönüşüm (HD), bir uyarılmış molekülün, bir foton yayınlamadan fazla enerjiyi bitişik bir moleküle transfer etmesini içeren önemli bir radyatif olmayan süreci ifade eder. Bu mekanizma, tek bir molekül içindeki içsel süreçlerin aksine, farklı moleküler varlıklar arasındaki etkileşimleri içerir. Harici dönüşümün belirgin bir örneği, uyarılmış donör molekül ile bir alıcı molekül arasındaki dipol-dipol eşleşmesinden kaynaklanan kuantum mekanik bir fenomen olan Förster rezonans enerji transferi (FRET) ile gösterilir. Bu senaryoda, donör molekül fazla enerjisini alıcıya aktararak, alıcıda bir elektronik geçişe neden olur. Buna ek olarak, Dexter elektron değişimi ile açıklanan tamamlayıcı bir mekanizma vardır. Bu mekanizma komşu moleküller arasında bir elektronun değiştirilmesini içerir ve fazla enerjinin dağıtılmasına izin verir. Dexter değişimi ve FRET, HD süreçlerinin geniş kategorisinin örneklerini sunar ve enerji transferi olgusunun temelinde yatan ara-moleküler etkileşimlere dair karmaşık açıklamalar sunar. Bir dizi

bilimsel bağlamda son derece önemli olan HD olgusu, özellikle fotosentez alanında, ışık yakalama komplekslerinin enerjiyi reaksiyon merkezlerine yönlendirdiği doğal sistemlerde gözlemlenen enerji transferi süreçlerinde kilit bir rol oynar. Ayrıca, HD mekanizmaları, özellikle organik ışık yayan diyotların (OLED'ler) işleyişinde, luminesan bileşenler arasındaki etkili enerji transferinin yüksek performanslı ışık yayan cihazlar elde etmek için kritik olduğu optoelektronik alanında pratik uygulamalar bulur. Bu nedenle, HD süreçlerinin aydınlatılması, doğal ve mühendislik sistemlerinde enerji transferi dinamiklerini anlamının temel bir yönünü oluşturur ve biyolojiden malzeme bilimine, fotonik alanına kadar bir dizi disiplindeki ilerlemelere katkıda bulunur (Larramendy ve ark 1994, Bastiaens ve ark 2001, So ve Dong 2001, Lichtman ve Conchello 2005, Valeur ve Berberan-Santos 2012, Wilke ve Castellano 2013, Limpouchová ve Procházka 2016, Feng ve ark 2020, Lincoln 2001, Deng ve ark 2001, Qi ve ark 2021).



Şekil 1.4 Stokes kayması

1.3.9. Stoke's shift (Stokes Kayması)

Stokes kayması (şekil 1.4), moleküler spektroskopinin temel bir foto-fiziksel olgusu olup bir molekülün emilim ve yayım olayları arasında meydana gelen belirgin spektral değişikliklere dair önemli veriler sunar. Fotonların emilmesi sonucunda, bir molekül dinlenme temel durumundan uyarılmış bir duruma geçiş yapar ve böylece enerji

seviyesinde yükselme yaşar. Daha sonra, molekül yavaşça daha düşük enerjili temel durumuna döndükçe, aşırı enerjiyi yayılan fotonlar şeklinde dışarı atar. Bu özgün yayılma genellikle ilk emilen dalga boylarını aşan dalga boylarında meydana gelir, bu da "kırmızıya kayma" olarak adlandırılan belirgin bir spektral kayma olayına yol açar. Stokes kaymasının kökeni, karmaşık bir dizi moleküler iç sürecin bir parçası olarak kabul edilebilir. Bu olgunun temel katkılarından biri olan titreşimsel rahatlama, uyarılmış durumun doğasında bulunan titreşimli modlar arasında enerjinin yeniden düzenlenmesiyle karakterizedir. Bu süreç, sistemin genel titreşimsel enerjisinde azalmaya yol açar ve uyarılmış durumdaki daha düşük titreşim seviyelerinin nüfusunun artışıyla sonuçlanır. Ayrıca, iç dönüşüm ve ara sistem geçiş gibi radyatif olmayan geçişler de Stokes kaymasını şekillendirmede önemli bir rol oynar. Bu mekanizmalar, fazla enerjiyi ara-moleküler etkileşimlere yönlendirir veya farklı spin çoğulluklarına sahip durumlar arasında geçişleri kolaylaştırarak fazla enerjinin dağıtılmasına katkıda bulunur. Bu süreçlerin toplu olarak düzenlenmesi, Stokes kaymasının temelini oluşturur ve sonuç olarak floresans ve fosforesans spektrumlarında gözlemlenen karakteristik spektral farklılığa yol açar. Bu olgunun önemi, kimya, biyofizik ve malzeme bilimi gibi çeşitli bilim disiplinlerinde ortaya çıkar. Stokes kayması, karmaşık ve çok yönlü sistemler içindeki moleküler dinamiklerin ve etkileşimlerin aydınlatılmasında vazgeçilmez bir araç olarak öne çıkar ve bir dizi bilimsel alanda ilerlemelerin temelini oluşturur (Stokes 1852, Johnson ve ark 1991, Paek ve ark 2009, Wu ve ark 2009, Liu ve ark 2013, Šípoš ve Šima 2020).

1.4. Viral Hastalıkların Tanısında Kullanılan Yöntemler

1.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Veteriner hekimliğinde, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniği, viral veya bakteriyel hastalıkların teşhisinde temel bir moleküler biyoloji yöntemidir. PCR, genetik materyalin çoğaltılması işlemiyle virusun varlığını belirleme kapasitesine sahip yüksek hassasiyetli bir moleküler biyoloji tekniğidir. Bu yöntem, hastalık belirtileri gösteren hayvandan uygun bir numune (kan, salya, dışkı, idrar, doku vb.) alınarak laboratuvar koşullarında işlenir. Numunedeki nükleik asit (DNA veya RNA) özel bir işlemle elde edilir. Daha sonra, hedef genin başlangıç ve bitiş bölgelerine bağlanacak olan özgül primerler ve Real time PCR kullanılacaksa prob tasarlanır. Termal döngüleyici cihazı reaksiyonun farklı aşamaları için belirli sıcaklıklara ayarlanır. Termal döngü, denatürasyon (DNA ayrışması), primer bağlanma (primerlerin hedef bölgeye bağlanması), ve uzama (DNA zincirinin uzatılması) adımlarını içerir. Bu süreç sonunda, hedef genin milyonlarca kopyası elde edilir.

Elde edilen ürünler, analiz için jel elektroforezi veya başka bir yöntemle ayrılır.

Sonuçlar, hedeflenen genin varlığını göstererek hastalığın teşhisini sağlar. Yüksek hassasiyeti ve spesifikliğı sayesinde veteriner hekimlik pratiğinde önemli bir teşhis aracı olarak kullanılır. Ancak, bazı olumsuz yönler de vardır. Diğer testlere kıyasla daha yüksek maliyetlidir ve uzmanlık gerektirir. Ayrıca, zaman alıcı bir süreçtir ve sonuçların elde edilmesi saatler sürebilir. Numunenin kalitesizliğı veya kontaminasyon riski, sonuçları etkileyebilir. Bu nedenle, her aşamada titizlikle çalışılması ve uygun kontrollerin yapılması önemlidir. PCR testleri, viral enfeksiyonların erken evrelerinde veya taşıyıcı hayvanlarda teşhisi daha etkili ve hızlı bir şekilde koymak için önemli bir araçtır (Senda ve ark 1995, Mahony ve ark 2007, Vandergeeten ve ark 2014).

1.4.2. Real-Time PCR

Veteriner hekimlik pratiğinde Real-Time PCR (RT-PCR) yöntemi, nükleik asitlerin çoğaltılması ve miktarının belirlenmesi için kullanılan bir moleküler biyoloji tekniğidir. İlk adım, hasta hayvandan uygun bir numunenin alınması ve bu numunedeki nükleik asidin özgül primerler ve prob ile hedeflenen genin çoğaltılması için işlenmesidir. RT-PCR, bu işlem sırasında gerçek zamanlı olarak floresansın ölçülmesi yoluyla hedef genin miktarını belirler. Bu, viral yükün veya hastalığın şiddetinin belirlenmesinde kritik bir rol oynar. Yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahiptir. Veteriner hekimlerin hastalıkların teşhisinde, tedavi stratejilerinin belirlenmesinde ve hayvan sağlığının korunmasında önemli bir araç olarak kullanılır. Ancak, RT-PCR'nin bazı olumsuz yönleri de vardır. Bu yöntem, diğer testlere kıyasla daha maliyetlidir ve uzmanlık gerektirir. Ayrıca, zaman alıcı bir süreçtir ve sonuçların elde edilmesi birkaç saat sürebilir. Numunenin kalitesizliğı veya kontaminasyon riski, sonuçları etkileyebilir. Yine de veteriner hekimliğinde viral hastalıkların teşhisinde hayati bir öneme sahiptir. Bu moleküler biyoloji tekniğı, virusun genetik materyalini tespit edebilme kapasitesiyle bilinir. Özellikle düşük düzeylerde dahi virusun varlığını belirleyebilme yeteneğı, enfeksiyonların erken aşamalarının teşhisi açısından son derece kıymetlidir. Ayrıca, reaksiyonun gerçek zamanlı olarak takip edilebilmesi, virusun nicel olarak ölçülmesini ve hastalığın şiddeti hakkında önemli bilgiler sağlar. Bu, tedavi stratejilerinin belirlenmesi ve hastaların izlenmesi açısından kritik önem taşır. Bununla birlikte, RT-PCR testlerinin maliyeti ve teknik gereksinimleri, yaygın kullanımlarını kısıtlayabilir. Bu testlerin uygulanabilmesi için özel ekipman ve reaktiflerin temini, ayrıca eğitimli personel gereklidir. Örnek ve çalışma ortamındaki kontaminasyonların sonuçları

etkileyebileceği için titiz çalışma koşulları ve steril tekniklerin benimsenmesi önemlidir.

Bu faktörler göz önünde bulundurulduğunda, Real-Time PCR'ın veteriner hekimliğindeki kullanımının dikkatli bir şekilde planlanması ve uygulanması kritik öneme sahiptir. Bu teknik, hastalıkların doğru teşhis koyma, etkili tedavi stratejileri belirleme ve hayvan sağlığını koruma açısından hayati bir araçtır (Reijans ve ark 2008, Mercier-Delarue ve ark 2014, Wu ve ark 2014, García-Arroyo ve ark 2016).

1.4.3. ELISA

Veteriner hekimliğinde ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) yöntemi, viral hastalık teşhisinde hayati bir öneme sahiptir. İlk olarak, numune hazırlığı yapılır ve pletyler ilgili antijen veya antikorlarla kaplanır. Numune eklenmesinin ardından pletyler yıkanır ve ikincil antikor eklenir. Bu antikor konjugat olarak adlandırılır ve test için gerekli enzimleri taşır. İlk antikorun yakaladığı antijenlere bağlanır. Daha sonra, bir enzimatik reaksiyon başlatan substrat ortama eklenir. Bu reaksiyon sonucunda bir renk üretilir. Optik yoğunluk değerleri, örneklerin antijen veya antikor miktarlarına orantılıdır ve mikroplyt okuyucusu ile ölçülerek sonuçlar değerlendirilir.

Bu teknik, belirli bir virusun ya da antikorun varlığını belirleme kapasitesiyle öne çıkar. Özellikle düşük seviyelerde bile virusun varlığını tespit edebilme yeteneği, hastalıkların erken aşamalarında doğru teşhisin konmasını sağlar. Ayrıca, reaksiyonun gerçek zamanlı olarak takip edilebilmesi, virus miktarının nicel olarak ölçülmesini mümkün kılar; bu da hastalığın şiddeti hakkında önemli bilgiler sağlar ve tedavi stratejilerinin belirlenmesinde kritik bir rol oynar. ELISA ayrıca, birçok numunenin aynı anda işlenebilmesine olanak tanıyan otomasyonu kolaylaştıran pletyler kullanarak büyük ölçekli epidemiyolojik çalışmalarda etkili olabilir.

Ancak, benzer antijenlere sahip farklı virüslerin çapraz reaksiyonlara neden olabilmesi ve çok düşük seviyelerdeki virusları tespit etme konusundaki sınırlamalar, ELISA'nın olumsuz yönlerindendir. Ayrıca, her bir numune için ayrı bir mikroplyt gerekliliği ve eğitimli personel olmaksızın doğru uygulanmasının zor olması, bu teknikle ilgili dikkat edilmesi gereken diğer noktalardır. Bu nedenle, ELISA'nın veteriner hekimliğindeki kullanımının planlanması ve uygulanması, dikkatli bir şekilde ele alınmalıdır. Bu teknik, hastalıkların doğru teşhis edilmesinde, etkili tedavi stratejilerinin belirlenmesinde ve hayvan sağlığının korunmasında kritik bir araç olarak değerlendirilir

(Engvall 1972, Mekuria ve ark 2003, Guzman ve ark 2010, Boonham ve ark 2014).

1.4.4. İmmünfloresans

Veteriner hekimlik pratiğinde, İmmünfloresans (IF) yöntemi, viral hastalıkların teşhisinde kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem, birkaç temel aşamadan oluşur. İlk olarak, uygun bir numune hazırlanır ve lam üzerine antijen veya antikor bağlanır. Daha sonra, numune blokaj işlemine tabi tutularak birincil antikor veya antijen eklenir. Fazlalıkların temizlenmesi için yıkama adımları uygulanır ve ardından floresan etiketli ikincil antikor eklenir. Numune, floresan mikroskop altında incelenerek antijen veya antikor varlığı, yayılan floresan ışık ile tespit edilir. Bu teknik, belirli bir virüsün veya antikorun varlığını belirleme kapasitesiyle yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahiptir. Özellikle hücresel düzeyde virusun veya antikorların varlığını doğrudan gözlemlene imkanı sunması, hastalığın tipini ve yayılımını belirleme açısından son derece değerlidir. Bu sayede, spesifik bir virus enfeksiyonunun hızla teşhis edilmesi ve tedavi sürecinin başlatılması mümkün olur. Ayrıca, IF yöntemi, birden fazla virus türünün belirlenmesine imkan tanır, bu da karma enfeksiyonların doğru teşhisi için önemlidir.

Bununla birlikte, IF testlerinin doğru bir şekilde uygulanabilmesi için uzmanlık ve eğitim gereklidir. Ayrıca, dışarıdan gelen kontaminasyonların sonuçları etkileyebileceği için titiz çalışma koşulları ve steril tekniklerin benimsenmesi gerekir. Teknik zorlukları ve maliyeti göz önünde bulundurularak, IF yönteminin veteriner hekimlik uygulamalarında dikkatlice değerlendirilmesi ve en uygun durumların belirlenmesi gereklidir. Bu teknik, hastalıkların doğru teşhis edilmesinde, etkili tedavi stratejilerinin belirlenmesinde ve hayvan sağlığının korunmasında kritik bir araç olarak değerlendirilir (Yamanouchi ve ark 1970, Ristic ve ark 1972, Pensaert ve ark 1981, Papafragkou ve ark 2013, Oxford ve ark 2021).

1.4.4.1. Direkt İmmünfloresans

Direkt İmmünofloresan (DIF), özel antikorların kullanıldığı bir tekniktir ve doku veya hücre örneklerinin incelenmesinde kullanılır. Bu yöntemde, belirli bir hastalığın teşhisi veya bazı hücresel özelliklerin belirlenmesi için floresanla işaretlenmiş antikorlar kullanılır. Örneğin, cilt biyopsilerinde DIF, pemfigus veya lupus gibi otoimmün hastalıkların teşhisi için önemlidir. İşlenen bir doku örneği, öncelikle belirli antikorlarla işlenir. Dokular laboratuvara ulaştığında, yıkanır, hızla dondurulur ve cam slaytlara

yerleştirilmiş 5 ila 6 µm kalınlığında kesitlere ayrılır. Slaytlar, hedef antijene yönlendirilmiş floresan etiketli antikorlarla inkübe edilir. Tipik olarak, farklı antikor izotiplerine (IgA, IgG, IgM) ve komplemente karşı yönlendirilmiş bir antikor paneli kullanılır. Her bir floresan etiketli antikorum bir damlası, uygun pozitif ve negatif kontrollerle birlikte ayrı bir doku kesitine damlatılır. Her bir antikorum çalışma konsantrasyonu, en yüksek sinyal-arkaplan oranını elde etmek için önceden optimize edilir. Slaytlar, karanlık, nemli bir odada oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilir. Antikor daha sonra boşaltılır, slaytlar yıkanır ve işaretlenmiş doku kesitleri kapatılarak floresan mikroskobu ile görüntülenir. Teşhis, bağlanma desenine dayanmakta olup (örneğin, hücreler arası, dermal-epidermal birleşimde lineer) saptanan antikorum izotipi (örneğin, IgG, IgA) gibi faktörlere bağlıdır (Coons ve ark 1942, Jordan ve ark 1967, Hinuma ve ark 1967, Benach ve ark 1983, Beutner 2003, Aoki 2007, Mysorekar ve ark 2015, Chanabasayya ve ark 2017, Kim ve Brinster 2020).

DIF, hastalıklı hücrelerin veya dokuların belirli bileşenleri üzerinde antikorların bağlandığı yerleri belirlemek için kullanılır. Özellikle otoimmün hastalıkların teşhisi için önemlidir çünkü bu hastalıklar genellikle vücudun kendi dokularına karşı oluşturduğu antikorlarla ilişkilidir. Bu yöntem, cilt biyopsileri gibi örneklerde, hastalıklı hücrelerin veya dokuların belirli alanlarında antikorların birikimini gözlemleyerek tanıya yardımcı olabilir. Bu şekilde, hastalığın karakteristik özellikleri ve lokalizasyonu belirlenebilir, doğru bir teşhis konulabilir ve uygun tedaviye yönlendirme yapılabilir.

Biyopsi materyalinde DIF teknikleri, ciltteki antikor olmayan hedefleri de tespit etmek için kullanılabilir. Enfeksiyöz mikroorganizmalar bu hedeflere bir örnektir. Bu durumda, şüpheli antijene yönlendirilmiş floresan etiketli birincil bir antikor kullanılarak organizmanın varlığı veya yokluğu tespit edilir. Bu teknik hızlı ve oldukça spesifiktir, ancak belirli hedefe bağlanabilen antikor sayısının sınırlı olması nedeniyle, diğer mikrobiyolojik tekniklere kıyasla daha az duyarlı olabilir (Coons ve ark 1942, Jordan ve ark 1967, Hinuma ve ark 1967, Benach ve ark 1983, Sano ve ark 2008, Minz ve ark 2010, Beutner 2003, Aoki 2007, Mysorekar ve ark 2015, Chanabasayya ve ark 2017, Kim ve Brinster 2020).

İmmünolojik reaksiyonlar, antijen-antikor etkileşimlerini görselleştirmek veya miktarlamak için farklı etiketleyiciler kullanılarak incelenebilir. Florokromlar, enzimler ve radyoaktif ile elektro-opak bileşikler, bu amaçla yaygın olarak tercih edilen

etiketleyicilerdir. Florokromlar, ultraviyole ışığı emerek uyarılan ve görünür ışık yayan boyalar olarak işlev görürler. Protein molekülleriyle kovalent bağlar oluşturabilen kimyasal grupları içermeleri, etiketleme işlevi için gereklidir. Dokulardan yayılan renkten farklı bir renkte ve görünür spektrumda yüksek floresans yaymaları gerekir. Etiketlenmiş proteinlerde, basit bir konjugasyonun yanı sıra antikor aktivitesinin korunması ve elde edilen floresan konjugatın stabilitesi önemlidir. Fitokromların en yaygın olanlarından biri FITC'tır ve sırasıyla 490 nm ve 520 nm dalga boylarında emilim ve yayılma piklerine sahiptir. Kırmızı renkli bir diğer madde olan rodamin, DIF'de kullanılan başka bir ajandır ve farklı emilim ve yayılma pik dalga boylarına sahiptir (sırasıyla 520 nm ve 610 nm). Epiluminesans ve konfokal mikroskopi tekniklerinden her ikisi de DIF sonuçlarını okumak için kullanılabilir (Coons ve ark 1942, Jordan ve ark 1967, Hinuma ve ark 1967, Benach ve ark 1983, Kulthanan ve ark 2007, Beutner 2003, Aoki 2007, Mysorekar ve ark 2015, Chanabasayya ve ark 2017, Kim ve Brinster 2020).

1.4.4.2. İndirekt İmmunfloresans

Indirect Immunofluorescence (IIF) yöntemi, hücre veya doku örneklerinde belirli antikorların varlığını veya belirli hedeflere karşı antikor üretimini tespit etmek amacıyla kullanılır. Özellikle otoimmün hastalıkların teşhisi ve spesifik antikorların varlığının belirlenmesi gibi durumlarda yaygın olarak tercih edilir. Başlangıçta, hücre veya doku örneği belirli antikorlarla işlenir. Bu antikorlar, genellikle hedeflenen antijene karşı spesifik olarak tasarlanmış ve etiketlenmiştir. Örneğin, anti-nükleer antikorlar (ANA), çeşitli otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilebilir ve özellikle çekirdekte bulunan belirli hedeflere karşı üretilirler.

Bir sonraki aşamada bu spesifik antikorlarla etkileşime giren, spesifik floresan etiketli antikorlar eklenir. Bu ikinci antikorlar, hedeflenen antikorlarla etkileşime geçer ve böylece belirli hücresel bileşenleri veya antikorları spesifik bir şekilde görselleştirir. Bu işlem sonucunda, hedeflenen antikorların bulunduğu bölgeler floresan ışık yayarak belirgin hale gelir. Örneğin, Anti-Nuclear Antibodies (ANA) gibi antikorlar, çeşitli otoimmün hastalıklarda belirtilere neden olabilirler. IIF, bu antikorların varlığını belirlemek için kullanılır. Bu yöntem, hastanın serumundan alınan örnekler üzerinde yapılır ve çeşitli hedeflere karşı reaksiyon gösteren antikorların varlığını veya yoğunluğunu gösterir. Bu bilgi, lupus, Sjögren sendromu, romatoid artrit gibi otoimmün hastalıkların teşhisinde önemli bir yardımcıdır. Bu yöntem, görsel olarak spesifik antikorların varlığını belirleyerek

belirli otoimmün hastalıkların teşhisine katkıda bulunur ve hastalık seyrini anlamak, tedavi stratejileri belirlemek için önemli bir araçtır (Aoki ve ark 2004, Lichtman ve Conchello 2005, Lakowicz 2006, Rigon ve ark 2007, Pohla-Gubo ve Hintner 2011, Valeur ve Berberan-Santos 2012, Murthy ve Virk 2014).

1.4.5. Viral Kültürler

Veteriner hekimlikte kullanılan Viral Kültürler yöntemi, virusların laboratuvar ortamında çoğaltılarak karakterize edilmesini sağlayan önemli bir tekniktir. İlk aşamada, hasta hayvandan alınan numune, laboratuvar koşullarında işlenir. Numune içerisindeki virüs partikülleri uygun hücre kültürüne inoküle edilir. Ardından, kültür periyodik aralıklarla incelenerek hücrelerin morfolojisi ve kültürün genel görünümü değerlendirilir. Eğer virus çoğalırsa, izole edilerek türü, alt tipi veya genotipi belirlenir. Ancak, Viral kültür yönteminin bazı olumsuz yönleri de bulunmaktadır. Öncelikle, bu yöntem oldukça zaman alıcıdır ve sonuçların elde edilmesi günler sürebilir. Ayrıca, virusun kültürde çoğalabilmesi için uygun bir hücre kültürünün oluşturulması gereklidir, bu da belirli bir uzmanlık seviyesi ve laboratuvar altyapısı gerektirir. Bununla birlikte, bu yöntemde bazı virusların kültürde çoğaltılması zor olabilir, bu da teşhisi zorlaştırabilir. Son olarak, virusun kültürde çoğalması için belirli sıcaklık ve besin koşullarının sağlanması gerektiğinden, bu faktörlerin dikkatli bir şekilde kontrol edilmesi önemlidir. Viral kültürler, veteriner hekimler tarafından özellikle yeni veya bilinmeyen virusların teşhisi, aşı geliştirme çalışmaları ve araştırma amaçlarıyla kullanılır. Bu yöntem, virusların laboratuvar ortamında çoğaltılmasını sağlayarak, etkili teşhis ve tedavi stratejilerinin oluşturulmasına yardımcı olur (Burgard ve ark 1992, Falsey ve ark 2002, Hodinka ve ark 2013, Jefferson ve ark 2021).

1.5. Moleküler Kenetlenme

Moleküler Kenetlenme (Docking), moleküler modelleme çalışmalarında sıkça başvurulan bir hesaplama yöntemidir. Bu yöntem, biyokimya ve ilaç tasarımıyla önemli bir yer tutar. Temel amacı, bir proteinin (ya da diğer büyük moleküllerin) içindeki bağlama bölgesine bir ligandın nasıl bağlandığını ve bu etkileşimin doğasını anlamaktır. Docking çalışmaları, moleküler etkileşimlerin ayrıntılı analizi için önemli veriler sağlar ve bu da ilaç geliştirme sürecinde kritik bir rol oynar. Ayrıca, bu yöntem, farklı ligandların bir hedef proteine olan bağlanma affinitesini ve tercihlerini değerlendirmek için kullanılır. Bu

bağlamda, docking, biyokimyanın yanı sıra ilaç endüstrisinde de yaygın olarak kullanılan değerli bir araçtır. Docking'ın başlıca kullanım alanları; (De Vries ve ark, 2010)

1. İlaç Tasarımı: Docking, ilaç tasarım sürecinin temel aşamalarından biri olarak kabul edilmektedir. Özellikle ilaç şirketleri, potansiyel ilaç moleküllerinin belirli bir proteinin bağlama bölgesine nasıl bağlandığını ve etkileşime girdiğini anlamak için bu yönteme başvururlar. Bu, ilaçların biyolojik hedefe olan etkilerini öngörmeye önemli bir rol oynar.

2. Moleküler Etkileşimlerin Detaylı İncelenmesi: Docking analizi, bir protein ile bir ligand arasındaki moleküler etkileşimlerin türünü ve gücünü anlama konusunda detaylı bir perspektif sunar. Bu, proteinin işlevselliği ile molekülün biyolojik sisteme olan etkilerinin daha derinlemesine anlaşılmasını sağlar.

3. Yapı-tabanlı İlaç Tasarımı: Docking, yapı-tabanlı ilaç tasarımının temel bir bileşeni olarak öne çıkar. Bilgisayar destekli tasarım programları, potansiyel ilaç moleküllerini milyonlarca olası konum ve yönelimde bağlama bölgesine yerleştirerek, en uygun etkileşimi tahmin etmeye çalışırlar. Bu, ilaç geliştirme sürecinde stratejik bir yaklaşımı temsil eder ve potansiyel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde kritik bir rol oynar.

4. Yenilikçi İlaç Keşfi : Docking analizi, farmasötik endüstrisinde potansiyel ilaç moleküllerinin detaylı bir şekilde incelenmesini sağlayarak, yenilikçi ve etkili ilaç adaylarının keşfi ve geliştirilmesi sürecine önemli bir katkı sunar. Özellikle, yeni ve mevcut hastalıklara yönelik tedavi seçeneklerinin artırılmasında, bu yöntemin sağladığı moleküler anlayış büyük bir öneme sahiptir.

5. Hız ve Maliyet Avantajı: Docking, laboratuvar deneylerine göre daha hızlı ve ekonomik bir şekilde potansiyel etkileşimleri tahmin edebilme yeteneği sunar. Bu durum, özellikle büyük veri setlerinin analiz edilmesinde, bilimsel araştırma ve geliştirme sürecinin hızlandırılmasında büyük avantajlar sağlar.

6. Deney Tasarımını Yönlendirme Potansiyeli: Docking sonuçları, deneysel çalışmaların nasıl tasarlanacağı konusunda önemli bir rehberlik sağlar. Bu, hangi moleküler etkileşimlerin daha fazla dikkat ve doğrulama gerektirdiğini belirleme konusunda araştırmacılara kılavuzluk eden kritik bir bilgi kaynağıdır.

7. Biyolojik Süreçlerin Moleküler Düzeyde İncelenmesi: Docking analizleri, biyolojik sistemlerdeki moleküler etkileşimlerin derinlemesine incelenmesine olanak tanır. Bu, hücresel düzeydeki biyolojik süreçlerin moleküler temellerini anlamamızı sağlayarak, tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde kritik bir rol oynar. Ayrıca, bu moleküler anlayış, farmakolojik ajanların etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına da kapı aralar. Moleküler kenetlenme bağlamında, bağlanma enerjisi, ligand ile reseptör arasındaki etkileşimin gücünü ölçen önemli bir faktördür. Ligand-reseptör kompleksinin stabilitesini temsil eder ve tipik olarak kenetlenme pozunun kalitesini değerlendirmek veya farklı ligandları tahmin edilen bağlanma afinitelerine göre sıralamak için kullanılır (Van ve ark 2005, Schmitz ve ark 2011, Hennig ve ark 2012). Bağlanma enerjisi, van der Waals etkileşimleri, elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağı ve çözme etkileri gibi çeşitli moleküller arası kuvvetlerin katkılarını içerir. Moleküler kenetlenmenin amacı genellikle, ligand ve reseptör arasında pozitif bir etkileşim gösteren, bağlanma enerjisini en aza indiren ligand konformasyonunu bulmaktır. Enerji minimizasyonu, sistemin potansiyel enerjisini en aza indirerek ligandın bağlanma bölgesi içindeki konformasyonunu optimize etmeyi amaçlar. Ligand optimizasyonunu ayarlayarak ve moleküller arası etkileşimleri hesaba katarak kenetlenme tahminlerinin doğruluğunu artırmaya yardımcı olur (Roel-Touris ve ark 2019). Docking sonrası enerji değişimlerinin yorumlanması, ligandın hedef molekül ile oluşturduğu kompleksin stabilitesini ve termodinamik dengesini değerlendirmektedir. Bu, ilgili bağlanma sürecinin enerjetik olarak avantajlı olup olmadığını belirlemek için önemlidir. Ayrıca, docking sonrası enerji kontrolü, ligandların hedef moleküle göre bağlanma afinitesini ve seçiciliğini değerlendirmek için önemli bir araçtır. Bu kontroller, ilaç tasarımı ve hedefe yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında başarılı sonuçlar elde etmek için kritik bir adımdır (Saponaro ve ark 2020, Solanki ve ark 2020).

Moleküler kenetlenme çalışmalarının sonucunda oluşan bağların detaylı bir şekilde değerlendirilmesi, bilimsel ve ilaç tasarım araştırmalarının yanı sıra antikör terapi çalışmalarında da hayati bir öneme sahiptir. Bu tür çalışmalar, potansiyel ilaç adayları veya antikörlerin hedef moleküllere nasıl bağlandığını anlamamıza olanak tanır. Bağların kalitesi, yani bağ oluşumu sırasındaki enerjetik stabilite, ilacın veya antikörün hedef molekül ile etkileşiminin etkinliğini belirleyen temel bir faktördür. Bununla birlikte, bağ mesafeleri de ayrıca göz önünde bulundurulmalıdır, çünkü uygun bir bağ mesafesi, bağlanma sürecinin stabilitesini artırarak ilacın veya antikörün etkinliğini artırabilir (Hennig ve ark 2012, Rao ve ark, 2023).

Farklı bağ türlerinin etkileri de önemlidir; iyonik, kovalent ve hidrojen bağları gibi farklı bağ türleri, ilacın veya antikorun hedef molekül ile olan etkileşim dinamiklerini etkiler. Bu bağların enerjetik analizi, ilaç-hedef etkileşimlerinin termodinamik ve kinetik özelliklerini incelememize yardımcı olur. Bu, ilacın veya antikorun etkinliği ve güvenliği hakkında önemli bilgiler sunar. Ayrıca, bağ kalitesi ve bağ mesafeleri yanı sıra farklı bağ türlerinin değerlendirilmesi, ilacın veya antikorun seçiciliğini ve yan etki profiline olan etkilerini de belirler. Yanıltıcı sonuçların önlenmesi ve yan etkilerin tahmin edilmesi de bu değerlendirmenin bir parçasıdır. Sonuç olarak, moleküler kenetlenme sonuçlarının bağlarının detaylı bir şekilde değerlendirilmesi, ilaç tasarımı ve moleküler biyoloji alanlarında ve antikor terapi çalışmalarında başarılı çalışmaların temelini oluşturur (Saponaro ve ark 2020)

1.5.1. Moleküler Kenetlenme Aşamaları

1.5.1.1.Docking Öncesi Aşamalar

Ligand Molekülünün Hazırlığı: Docking çalışmasının temel adımlarından biri, belirli bir proteinin bağlama bölgesine nasıl bağlandığını ve etkileşime girdiğini anlamak amacıyla bir ligand molekülünün kullanılmasıdır. Bu aşamada, moleküler çizim programları, ligand molekülünün kimyasal yapısını belirlemek ve bilgisayar tarafından işlenebilir hâle getirmek için kullanılır. Atomların türleri, konumları ve bağ yapıları belirlenir. Bu detaylı analiz, ligand molekülünün etkileşimde bulunduğu proteinle olan bağlanma sürecini daha iyi anlamamıza olanak sağlar.

Proteinin Hazırlığı: Docking çalışmasında temel bir unsur, proteinin yapısının belirlenmesidir. Bu, biyokimyasal deneyler veya protein veritabanları gibi kaynaklardan elde edilen verilerle gerçekleştirilir. Ardından, proteinin 3 boyutlu modeli oluşturulur. Bu modelde, amino asitlerin ve diğer bileşenlerin atomları, bağları ve konumları hassas bir şekilde belirlenir. Bu ayrıntılı analiz, proteinin bağlama bölgesine nasıl etki edeceğini anlamak için temel bir temel sağlar.

Bağlama Bölgesinin Belirlenmesi: Bağlama bölgesi, genellikle proteinin aktif bölgesi veya hedef alanı olarak adlandırılır. Burası, proteinin belirli işlevlerini gerçekleştirdiği ve dışarıdan gelen moleküllerle etkileşimde bulunabileceği yerdir. Bu alanın sınırları, literatürdeki bilgilere dayalı olarak titizlikle belirlenir. Bu, docking çalışmasının önemli bir aşamasıdır, çünkü bağlama bölgesinin doğru bir şekilde

tanımlanması, inhibitör molekülünün proteinle etkileşimini daha doğru bir şekilde simüle etmemizi sağlar.

Moleküler Modelleme Araçlarının Hazırlanması: Docking çalışmaları için temel, ligand ve protein yapısını içeren 3 boyutlu koordinat dosyalarının, docking yazılımlarının anlayabileceği biçimlere dönüştürülmesidir. Bu dosyalar, yazılımın ligand-reseptör etkileşimlerinin hesaplanabilmesi için gereklidir. Bu aşama, docking sürecinin başarıyla tamamlanabilmesi için kritik bir adımdır. Bu dosyaların doğru biçimde hazırlanması, doğru ve güvenilir sonuçlar elde edilmesi açısından hayati bir öneme sahiptir.

1.5.1.2.Docking Aşamaları

İlk Konum Tahmini: Bağlanacak molekül, proteinin üç boyutlu yapısına göre belirlenmiş olan bağlama bölgesine rastgele veya önceden belirlenmiş konum ve yönelimlerde yerleştirilir. Bu konumlar, moleküllerin etkileşime girebilecekleri farklı "docking pozisyonları" olarak adlandırılır.

Enerji Hesaplama ve Skorlama: Her bir docking pozisyonu için, molekül ile protein arasındaki etkileşim enerjisi hesaplanır. Bu enerji hesaplamaları, van der Waals etkileşimleri, hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler gibi farklı etkileşim türlerini içerir. Bu hesaplamalar sonucunda bir "skor" elde edilir; bu skorun düşük olması, molekülün o pozisyonda ne kadar stabil olduğunu gösterir.

En İyi Konumun Seçimi: Skorlar, molekülün en iyi etkileşimi gerçekleştirdiği pozisyonları gösterir. Daha düşük skorlar, daha istikrarlı ve güçlü etkileşimler anlamına gelir. Bu nedenle, genellikle en düşük skora sahip olan konum, "en iyi" docking konumu olarak seçilir.

Sonuçların Analizi: Seçilen en iyi docking konumu detaylı bir şekilde analiz edilir. İlaç molekülü ile protein arasındaki etkileşimler, hidrojen bağları, elektrostatik çekimler ve van der Waals etkileşimleri gibi faktörler göz önünde bulundurularak değerlendirilir. Bu analiz, ilaç molekülünün bağlama bölgesine nasıl yerleştiğini ve etkileşime girdiğini anlamamıza yardımcı olur.

1.5.1.3. Docking Sonrası Aşamalar

Sonuçların Doğrulanması: Tahmin edilen docking sonuçları, laboratuvar deneyleri veya literatürde bulunan deneysel verilerle titizlikle karşılaştırılır. Bu karşılaştırma,

modelin gerçek dünyadaki durumu ne kadar yansıtıldığını belirlemede kritik bir rol oynar. Eğer tahminler, deneysel sonuçlarla uyumluysa, modelin güvenilirliği artar. Ayrıca, farklı koşullar altında yapılan deneylerle sonuçların karşılaştırılması, modelin genellikle ne kadar doğru alıştıldığını belirler.

Sonuçların İyileştirilmesi: Doğrulama aşamasından elde edilen verilere dayanarak, başlangıçta yapılan modellemelerde tespit edilen hatalar veya yanlışlar düzeltilir. Bu, modelin daha kesin ve güvenilir sonuçlar üretmesini sağlamak amacıyla gerçekleştirilir. Gerekirse, moleküler yapılar üzerinde ayarlamalar ve optimizasyonlar yapılır.

Yorum ve Karar Verme: Doğrulama sonuçları, dikkatlice yorumlanması gelecekteki adımların belirlenmesinde temel bir rol oynar. İlaç tasarımı veya araştırma sürecinde nasıl bir yol izleneceği, bu yorumlara dayanarak belirlenir. Özellikle, hangi bileşenlerin daha fazla odaklanmayı gerektirdiği ve potansiyel geliştirmelerin neler olduğu gibi konular bu aşamada değerlendirilir.

İleriki Adımların Planlaması: Docking sonuçlarından elde edilen bilgiler, gelecekteki çalışmaların planlanmasında kılavuz olarak kullanılır. Hangi ilaçların deneysel olarak test edilmesi gerektiği, moleküler yapıda yapılacak olası değişiklikler veya yeni araştırma yolları gibi konular bu aşamada belirlenir. Bu, ilaç tasarımı ve araştırmanın gelecekteki yönünü şekillendirir (De Vries ve ark 2010, Spiliotopoulos ve ark 2016, Saponaro ve ark 2020, Solanki ve ark 2020).

1.6. Viral Hastalılarda Hızlı Teşhisin nemi

Viral enfeksiyon hastalıkları, dünya genelinde ciddi halk sağlığı sorunları arasında yer alır. Bu tür hastalıkların hızla yayılabilme ve önemli sağlık sorunlarına yol açabilme potansiyeli, erken teşhisin kritik bir önem taşıdıldığını göstermektedir. Hızlı teşhis, epidemiyolojik kontrolün sağlanması ve bireylerin sağlıklarının korunması bakımından temel bir rol oynar. Hızlı bir teşhisle, enfekte olmuş bireylerin izole edilmesi veya karantinaya alınması gibi acil önlemler alınabilir. Bu, hastalığın yayılmasını sınırlamak ve hem toplum hem de hayvan sağlığını korumak için vazgeçilmezdir.

Hızlı teşhis ayrıca, hastalığın türü ve tedavi seçeneklerinin belirlenmesi açısından da kritik bir öneme sahiptir. Viral hastalıkların semptomları birbirine benzer olabilir, bu nedenle doğru tanı, uygun tedavi yöntemlerinin seçilmesi için hayati önem taşır. Ayrıca, hızlı teşhis, salgınların ve epidemilerin etkili bir şekilde kontrol edilmesine olanak tanır. Halk sağlığı yetkilileri ve veteriner hekimleri, doğru verilere dayalı kararlar alarak gerekli

önlemleri alabilirler. Özellikle yeni ve potansiyel olarak tehlikeli viral patojenlerin tanımlandığı durumlarda, hızlı teşhis, bu patojenlerin yayılmasını kontrol etmek ve potansiyel pandemilere engel olmak için kritik bir öneme sahiptir.

Hızlı teşhis ayrıca laboratuvar kapasitesinin etkin bir şekilde kullanılmasına olanak tanır. Gelişmiş moleküler ve serolojik testler, viral patojenlerin tanımlanmasını hızlandırır ve epidemiyolojik araştırmalar için temel verileri sağlar. Bununla birlikte, hızlı teşhis, hastaların yönetimi ve bakımının da geliştirilmesine imkan tanır. Doğru tedaviye erken başlamak, hastalığın seyrini olumlu yönde etkileyebilir. Ayrıca, hızlı teşhis, hastaların ve toplumun psikolojik olarak daha iyi bir durumda olmasına yardımcı olabilir. Belirsizlik ve endişe, hızlı teşhis ile azaltılabilir (Gavin, 2004 Heeney, 2006 Crawford, 2007 Gongal ve ark 2022).

Birden fazla virusun taranması gereken durumlarda hızlı teşhis, kritik bir öneme sahiptir. Özellikle aynı anda birden fazla virüsün aynı hayvanda birlikte varlığı durumunda, doğru teşhisin konulabilmesi için hızlı bir tarama gereklidir. Bu, karma enfeksiyonların ayırt edilmesini sağlayarak, hastalığa hangi virusun neden olduğunu belirleme ve buna göre uygun tedavi planı oluşturma imkanı sunar. Ayrıca, epidemiyolojik kontrollerin etkili bir şekilde yapılabilmesi için hızlı teşhis önemlidir. Özellikle salgın dönemlerinde, farklı virusların hızla tanımlanması ve izlenmesi, epidemiyolojik araştırmalar ve salgının kontrolü için kritik bir öneme sahiptir. Bunun yanı sıra, potansiyel olarak tehlikeli veya yeni keşfedilen virüslerin varlığı durumunda, hızlı teşhis, bu virüslerin yayılmasını kontrol etmek ve potansiyel pandemilere engel olmak için vazgeçilmezdir. Laboratuvar kapasitesinin etkin bir şekilde kullanılması da bu bağlamda önemlidir; hızlı ve doğru teşhisler, laboratuvar kaynaklarının verimli bir şekilde yönetilmesini sağlar.

Sonuç olarak, birden fazla virusun tespit edilmesi gereken durumlarda hızlı teşhis, vakaların doğru şekilde yönetilmesi, epidemiyolojik kontrolün sağlanması ve laboratuvar kapasitesinin etkin bir şekilde kullanılmasını sağlar, böylece toplum ve hayvan sağlığına olumlu katkı sağlar (Gavin 2004, Heeney 2006, Crawford 2007, Lucht ve ark 2007, Minakshi ve ark 2014, Dilnessa 2017, Gongal ve ark 2022).

Hayvan sürülerinin hastalık taramalarında çok sayıda patojene eş zamanlı olarak odaklanılmasında, hızlı teşhis yöntemlerinin kullanılmasıyla beraber sağlanan avantajları belirtmek gerekirse, bu tür teknolojilerin sektördeki sağlık ve güvenlik perspektifinde önemli bir ilerleme temsil ettiği ifade edilebilir. Geleneksel teşhis yöntemlerinin genellikle

tek bir patojene odaklanarak zaman alıcı olduğu göz önünde bulundurulduğunda, hızlı teşhis teknolojileri, büyük gruplar halinde bulunan hayvan sürülerinde veya vahşi yaşam popülasyonlarında, çoklu patojenleri eş zamanlı olarak tespit etme kabiliyetine sahiptir. Bu, hem hayvan sağlığı hem de insan sağlığı açısından kritik bir öneme sahiptir. Özellikle hayvancılık ve tarım sektörlerinde, hayvanlardan elde edilen ürünlerin insan tüketimi için önemli bir kaynak oluşturduğu düşünüldüğünde, bu tür taramaların hayvan sağlığını kontrol altında tutarak gıda güvenliğini artırmak için kritik olduğu anlaşılır. Hızlı teşhis yöntemleri ayrıca, salgın hastalık tehditlerine hızlı ve etkili bir yanıt verme kapasitesi sağlar. Özellikle hayvan sürülerinde bir hastalık patlak verdiğinde, bu hastalık hızla yayılabilir ve ciddi ekonomik kayıplara yol açabilir. Ancak hızlı teşhis, bu tür salgınların erkenden belirlenmesini ve kontrol altına alınmasını sağlar. Bunun yanı sıra, hızlı teşhis yöntemleri aynı zamanda laboratuvar kaynaklarının daha etkin bir şekilde kullanılmasına olanak tanır. Bu, maliyetleri düşürerek daha fazla teşhisin yapılmasını ve daha fazla hayvan sürüsünün veya popülasyonunun izlenmesini mümkün kılar (Gavin 2004, Heeney 2006, Crawford 2007, Lucht ve ark 2007, Minakshi ve ark 2014, Dilnessa 2017, Gongal ve ark 2022).

2.GEREÇ VE YÖNTEM

Çoklu teşhis kitinin geliştirilmesi için örneklerin toplanması, sınıflandırılması, testte kullanılmak üzere hazır hale getirilmesi, çalışma ortamının hazırlanması, test kitinin hazırlanması ve görüntüleme işlemleri yapıldı. Bu işlemler sırasında bir çok noktada bilgisayar simülasyonlarından ve deneme testlerinden de faydalandı.

2.1. Örneklerin toplanması ve hazırlanması

Çalışmada kullanılan gaita örnekleri Adana Büyükşehir Belediyesi Geçici Hayvan Bakım Evi (N=170), Osmaniye Belediyesi Geçici Hayvan Bakım Evi (N=160), pozitif ve negatif kontrol örnekleri ise Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı stokları ve Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı stoklarından sağlandı.

Örnekler, başta diare olmak üzere klinik semptom gösteren, teşhis yöntemleriyle CPV veya CCoV taşıdığı tespit edilen veya tam tersi, herhangi bir semptom göstermeyen ve/veya teşhis yöntemleri ile CPV veya CCoV taşımadığı tespit edilen farklı yaş, ırk ve cinsiyetteki köpeklerden alındı. Örneklem için tek kullanımlık steril swap kullanıldı. Rektum içerisinden sürüntü şeklinde alınan örnekler soğuk zincir bozulmaksızın laboratuvara ulaştırıldı. Ayrıca bakteriyel diare şüpheli hayvanlardan alınan örnekler bakteriyel kontaminasyon riskini en aza indirecek şekilde antibiyotikli PBS (fosfat tampon tuzu) içerisinde muhafaza edildi. Mevcut stoklarda bulunan örnekler (N=50) ise çalışmada kullanılmak üzere doğrudan koleksiyona alındı.

2.1.1. Örneklerin hazırlanması

Toplanan örnekler laboratuvara ulaştıktan sonra öncelikle uygun yöntemle örneklem yapılması, yabancı madde içermesi ve taşıma sırasında kuruma, bozulma, kokuşma, küflenme gibi belirtilerin varlığı açısından kontrol edildi. Uygun olan örnekler 5ml hacimli eppendorf tüpleri içerisinde PBS (Sigma, USA, Cat no: P4417) ile 1/10 oranında sulandırıldı. Sulandırmadan sonra örnek tüplerinde katı partikül kalmaması için örnekler 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant ayrıldı. Bazı örneklerdeki katı partikül miktarının çok fazla olması veya örnek süpernatantının normalden daha bulanık görünmesi, testlerin uygulanması aşamasında olası hatalara sebep olabileceğinden süpernatantlar sırasıyla 0.44 ve 0.22µm (mikrometre) por çapına sahip enjektör filtrelerden geçirildi. Hazırlanan sulandırmalar doğrulama testlerinde kullanılmak üzere 1ml, çalışma testlerinde

kullanılmak üzere 2 ml ve yedek olarak saklanmak üzere 2ml olacak şekilde farklı tüplere ayrıldı ve numaralandırılarak kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı. Koleksiyon kayıt çizelgesi oluşturuldu, her bir örneğin menşesi, alındığı hayvanın türü/ırkı, örnek alma tarihi ve örnek alınan bölge bu çizelgeye kaydedildi. Ayrıca olası hastalık tanıları ile özellikle barınak hayvanlarında hızlı test ile teşhis edilen hastalık bilgileri ve varsa diğer bilgileri de koleksiyon çizelgesine kaydedildi.

2.2. Nükleik asit ekstraksiyonları ve Real Time PCR Analizleri

Oluşturulan koleksiyonun CPV ve CCoV yönünden pozitiflik durumunun ortaya konması için Real Time PCR analizlerinden faydalandı. Bu analizler için daha önceden PBS ile 1/10 oranında sulandırılmış olan gaita örnekleri kullanıldı. CVP için DNA, CCoV için RNA ekstraksiyonu PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (cat no: 12280050) ile üretici firmanın talimatlarına uygun olarak yapıldı. CCoV için cDNA (complementer DNA) sentez kiti (abm OneScript Plus, Kanada) (şekil 2.1) kullanılarak 4µl rt buffer, 1µl dNTP, 1µl random primer, 2.5µl örnek, 2µl Rtase, 10.5µl nükleaz free su karışımı ile 55°C’de 15 dakika izotermal amplifikasyon yapıldı. RT-PCR analizleri için melt curve analizli eva green metodu tercih edildi ve hairpin potansiyeli ve kendi üzerine katlanma analizleri yapılmış olan, CPV VP-2 gen bölgesini hedef alan 93 bp uzunluğunda primerler ile, CCoV için HLJ-073 izolatını hedef alan primerler kullanıldı (tablo 1.1).



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan cDNA sentez kiti gösterilmektedir.

Virus	Forward 5' - 3'	Reverse 5' - 3'	Ürün Uzunluğu
CPV	AAACAGGAATTAAGTATACTAAT ATATTTA	AAATTTGACCATTGATATAACT	93bp
CCoV	TTGATCGTTTTTATAACGGTTCTA CAA	AATGGGCCATAATAGCCACATAAT	99bp

Tablo 2.1. CPV ve CCoV teşhisinde kullanılan primerler ve ürün uzunlukları (Yunjun ve ark 2017, Decaro ve ark 2004)

Örneklerin RT-PCR analizleri termal döngüleyici cihazda (Applied Biosystems Step One Plus) optik PCR stripleri ile 95°C’de 1 dakika ön denaturasyon, 95°C’de 15sn annealing, 60 °C’de 1dk extantion, 45 siklus protokolü izlenerek gerçekleştirildi. Eva Green master mix (şekil 2.2) kullanılan testlerde reaksiyon hem CPV hem CCoV için 4µl Eva green mastermix (HOT FIREpol evagreen qPCR Mix Plus, Estonia) 0.5µl forward primer, 0.5µl reverse primer, 2.5µl dna/rna ekstratı ve 12,5µl nükleaz free su şeklinde hazırlandı. Örneklerin pozitiflik durumu incelenirken Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı ve Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı’ndan temin edilen pozitif ve negatif kontrol örnekleri kullanıldı.



Şekil 2.2 Real Time PCR analizlerinde kullanılan master mix ve primerler

2.3. Mikropleyt seçimi

Çalışmada kullanılacak olan mikropleytler 96 sabit gözlü, düz tabanlı ve polistiren kaplı, tek tek paketlenmiş ve steril olması özelliklerine göre seçildi. Floresans görüntüleme sırasında ortaya çıkabilecek arka plan yansımalarının (back scattering) önüne geçmek amacıyla mikropleytler arka yüzlerinden mat siyah renge boyandı. Boyanan pleytlerin 0°

+45° ve -45° açı ile üzerine gönderilen ışınları yansıtması boyasız pleytlerle karşılaştırıldı. Boyanan pleytlerde daha az holografik yansıma olduğu görülmeye karşın, boyanmayanlara oranla daha fazla materyal içi ışın akışı olduğu görüldü. Bu durumun floresans görüntüleme sırasında optik interferansa sebep olabileceği sebebiyle pleytlerin boyanmasından vaz geçildi.

2.4. Çalışma ortamının hazırlanması

Çözeltilerin hazırlanmasından test sonuçlarının görüntülenmesine kadar olan tüm süreçte testin dış etkenlerden etkilenmemesi için steril laboratuvar ortamında çalışıldı. HEPA ve ULPA filtre sistemlerini kullanan steril havalandırma ve iklimlendirme özellikli laboratuvar, çalışma öncesinde mekanik olarak temizlendi. Daha sonra uygun yüzeylerde uygun dezenfektan seçimi ile (virkon, sodyum hipoklorid) tezgah yüzeyleri, duvarlar, tavan ve zemin dezenfekte edildi. Ulaşılamayan bölmelerin dezenfeksiyonu için laboratuvar da potasyum permanganat fumigasyonu yapıldı (15ml formaldehid içerisine 1gr $KMNO_4$) ve laboratuvar tam güçte çalışan (10000 KPH) havalandırma ile 24 saat havalandırıldı (şekil 2.3).



Şekil 2.3 Laboratuvarın temizlenmesi ve operatörlerin giyinme aşamaları

Antikor kaplama sırasında damlaların daha net görülmesi için gerekli noktalara doğrusal beyaz led ışık kaynakları ile FITC konjugat ile çalışılacak aşamalarda boyanın bozulmasını önlemek için kırmızı ışık kaynakları yerleştirildi. Laboratuvardaki tüm pencereler ışık geçirmez film ile kapatıldı ve mühürlendi. Aynı zamanda laboratuvar kapısı da çalışma boyunca kapalı tutuldu.

Antikor kaplama aşamasında laboratuvara girecek olan tüm operatörler duş aldı. Eller dirsek üstlerine kadar cerrahi sabunlu sünger ile usulüne uygun olarak yıkandı. Tüm vücut antiseptikli ve antistatik tek kullanımlık temizlik mendili ile silindikten sonra minimum elektrostatik etki için (tozdan korunmak amacıyla) steril cerrahi önlük ve eldiven, n95 tipi maske ve boneden oluşan koruyucu ekipmanlarını giydi. Laboratuvara girecek her türlü alet, ekipman ve malzeme yüzey dezenfektanı ile dezenfekte edildikten sonra laboratuvara alındı (şekil 2.3). Laboratuvara giriş ve çıkış sırasında hava kilitli kapı bulunmadığı için minimum hava akımı oluşturacak şekilde yavaş ve dikkatli hareketlerle laboratuvara erişim sağlandı, mümkün olduğunca az hava akımı oluşturuldu.

2.5. Çözeltilerin hazırlanması

Çalışma boyunca farklı amaçlarla bir çok çözelti kullanıldı. Bu çözeltiler laboratuvar ortamında hassas terazi (Weightlab WL-603, Türkiye) ile tartılan saf kimyasallar ve distile su kullanılarak hazırlandı. Çözeltilerin fiziksel saflığı ve pH değerleri çalışma başarısı açısından yakından takip edildi.

Wash buffer; antikor ve örneklerin yıkanması işlemlerinde kullanıldı ve PBS çözeltisi içerisinde %05 oranında tween20 formülü ile hazırlandı (Şekil 2.4).

FA Wash buffer; Wash buffer içerisine %1 oranında NaCL eklenerek elde edildi. Bu çözelti FITC konjugatın taşıdığı boyaya zarar vermeden konjugat yıkaması yapmak için kullanıldı (Şekil 2.4).

Blocking buffer: Wash buffer içerisine %1 oranında BSA (Bovine Serum Albumin) eklenerek elde edildi. Solid faz kaplamasından sonra açık kalan pleyt zeminine yabancı antijen bağlanmasını engellemek amacıyla kullanıldı (Şekil 2.4).

Sodyum Azid: %0.09 oranında oranında hazırlanan sodyum azid çözeltisi Anti-CPV ve Anti-CCoV FITC konjugatlarının sulandırılmasında kullanıldı (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Çalışmada kullanılmak üzere hazırlanan çözeltiler

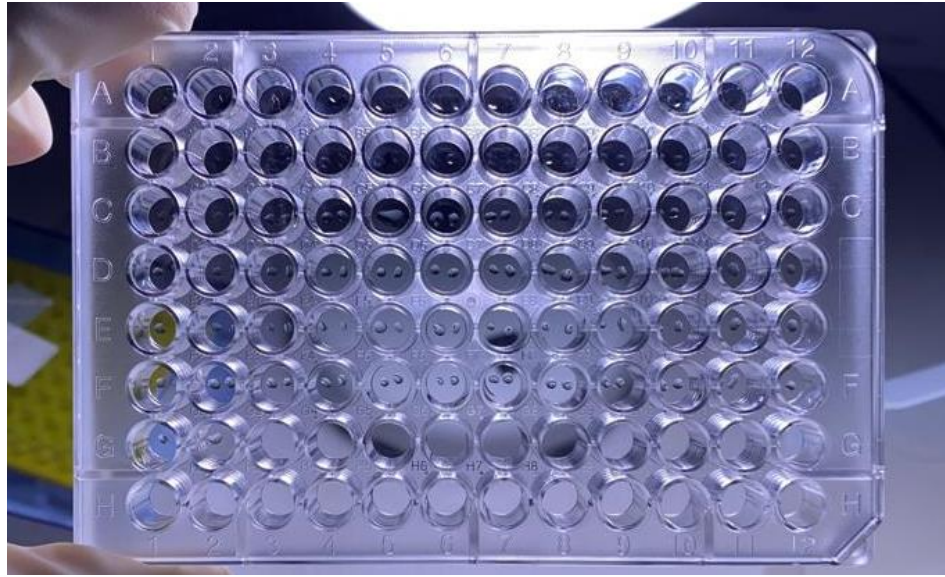
2.6. Yakalayıcı antikorlar

Tüm diğer serolojik teşhis metodlarında olduğu gibi MIFADA metodunda da spesifik antijenlerin solid fazda bağlanması gerekmektedir. Bu metodunun özel gereksinimi olan çok bölgeli antikor kaplamasında kullanılacak olan antikorlar, in-silico testler ile hedef antijen bağlanırlığı, bağlantı kararlılığı ve bağlanma enerjileri yönünden değerlendirilerek seçildi. CPV için monoklonal antikor 5G7 (H69D mouse clone, invitrogen ABD), CCoV için ise monoklonal antikor M87073 (MyBioSource, ABD) kullanıldı.

2.7. Antikor kaplamaları

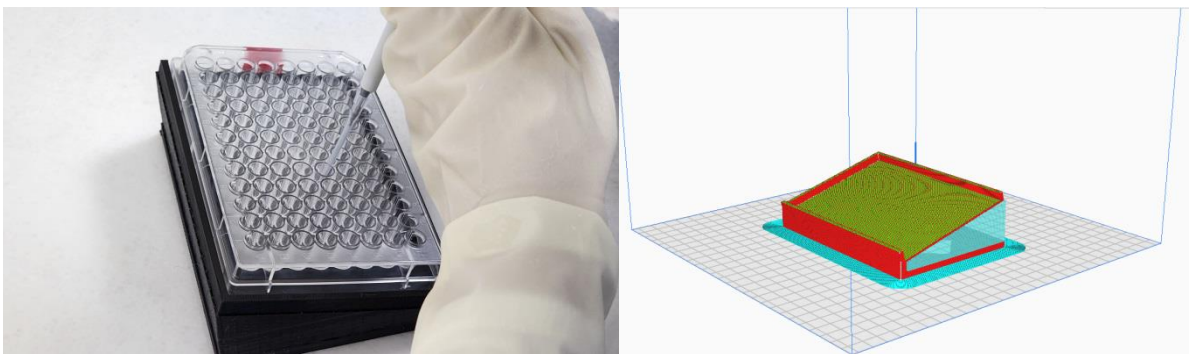
Seçilen antikorların solid faz kaplamaları ELISA pleyti kaplamalarına benzer bir yöntemle yapıldı. ELISA pleytleri hazırlanırken yüksek volümde düşük konsantrasyonlu antikor süspansiyonu göz içerisine damlatılır ve değişen süre/sıcaklıklarda bekletilerek solid faza tutunma sağlanır.

Çalışmada uygulanacak olan MIFADA metodunda solid fazın bölgesel olarak kaplanması ve kaplanan bölgelerin tüm pleyt boyunca sabit bir yerleşim göstermesi gerektiğinden, ELISA pleyti kaplama protokolünün modifiye edilerek çalışmaya uyarlanması gerekti. Düşük volüm yüksek konsantrasyon prensibi benimsenerek 2.5 µl'lik pipet uçları ile 1µl hacminde antikor süspansiyonu mikropleyt gözlerinin sağ ve sol yarımı içerisine damlatıldı. Antikorların sulandırılmasında karbonat/bikarbonat tampon çözeltisi kullanıldı. Çalışma boyunca hazırlanan tüm pleytlerde sol taraf CPV, sağ taraf CCoV olarak kullanıldı (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Mikropleyt üzerine yerleştirilen antikor damlaları. Her gözün solundaki damla Anti-CPV, sağındaki damla ise Anti-CCoV antikorlarını içermektedir.

Bu tür noktasal antikor kaplamasının en büyük zorluğu damlanın pleyt zeminine bırakıldıktan sonra gerek yer çekimi gerekse de uzaklaşan pipet ucunun etkisiyle dağılması ve planlanan alan dışına çıkması veya sağ ve soldaki iki damlanın birbirine karışması oldu. Bu sorunun çözümü için pleytleri 15° açı ile sabit tutacak bir aparat tasarlandı ve 3D yazıcı ile aparatın baskısı alındı (Şekil 2.6). Bu aparat üzerinde çalışıldığı zaman hem operatörün görüş alanı genişledi ve çalışma kolaylığı sağlandı, hem de bırakılan damla kısmen asılı damla konumunda olduğu için daha fazla yüzey gerilimi üreterek pipetin uzaklaşması sırasında dağılmaması sağlandı.



Şekil 2.6 Üç boyutlu yazıcı ile bastırılan pleyt tutucu aparat (solda) ve aparatın bilgisayar çizimi (sağda)

Antikor damlaları yerleştirilirken kaybedilen vaktin damlaların buharlaşması ve pleytin kurummasına sebep olmaması için sağ ve sol damlaları bırakılan her bir göz hızlıca mikropleyt bandı ile izole edildi. Tüm gözlere antikor yerleştirme işlemi bittikten sonra

pleyt +4°C sıcaklıkta 16 saat süre ile inkübe edildi. Bu süre boyunca antikor damlaları kurumuş olan gözler işaretlenerek deney dışı bırakıldı. Pleyt Wash Buffer (PBS içinde %05 Tween20) ile 5 sefer yıkandıktan sonra blocking buffer (%1 BSA'lı PBS) ile 37°C'de 1 saat bloklama işlemi yapıldı. Pleytler tekrar wash buffer ile 3 sefer yıkandı ve hava geçirmez paketler içerisinde kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.

2.8. Konjugatların hazırlanması

Çalışmada Anti-CPV-FITC / monoklonal antikor H69D ve Anti-CCoV-FITC / monoklonal antikor M87073 (wmrd, cat no:CJ-F-CPV-MAB-10ML, CJ-F-CCV-MAB-10ML ABD) kullanıldı. Her iki konjugatında sulandırılmasında ikisinin de ortak sulandırıcısı olan %0.09 sodyum azid çözeltisi kullanıldı. Konjugatlar ışık geçirmez kutular içerisinde kullanılıncaya kadar +4°C sıcaklıkta saklandı ve mikropleyte damlatılmadan 5dk önce sulandırıldı. Fazladan sulandırılan konjugatlar daha sonra tekrar kullanılmak üzere saklanmadı.

2.9. Optimizasyon çalışmaları

Test tekniğinin temel süre ve konsantrasyon optimizasyonları için bir dizi ön çalışma yapıldı. Bu çalışmaların bir bölümü in-silico olarak bilgisayar ortamında, bir bölümü ise in-vitro olarak laboratuvar ortamında yapıldı. Her bir optimizasyon çalışması, her iki virüs için de ayrı ayrı yapıldıktan sonra beraber değerlendirme için uygun ortak noktalar tespit edildi.

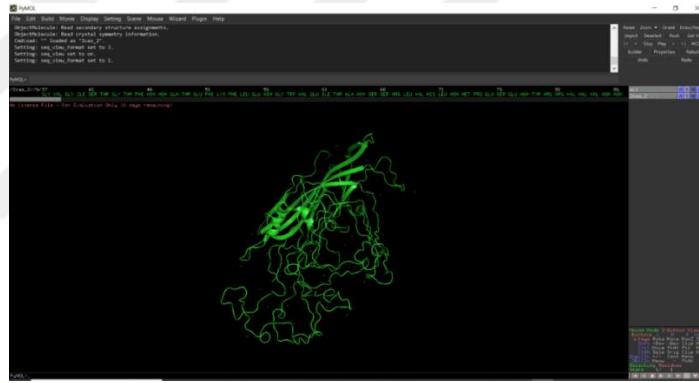
2.9.1. In-Silico analizler

CPV'nin teşhisinde kullanılmak üzere monoklonal antikor 5G7 (H69D) ve monoklonal antikor 8H7 alternatifleri mevcut idi. Bu alternatiflerden hangisinin in-vitro ortamda daha doğru sonuç vereceğinin tespiti için öncelikle bir dizi in-silico analiz yapıldı. Analizlerde kullanılan bilgisayar konfigürasyonu tablo 2.1'de gösterilmiştir.

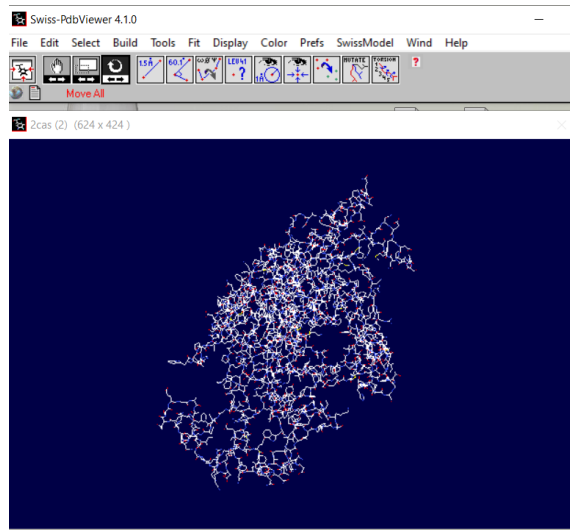
CPU	AMD Ryzen 9 5950x, 16 core 32 threat, 360 mm sıvı soğutma radyatörlü
GPU	NVIDIA RTX 4070 12gb vram gaming hızlandırılmış sürüm
Anakart	Asus TUF Gaming ddr4 6000mhz, atx
Ram	64gb 3600mhz ECC hata düzeltmeli bellek
SSD	12TB nvme, sata m2, sata 6g tiplerinde
PSU	850Watt atx 3.0 standartlarında akım korumalı psu

Tablo 2.2 In-Silico analizlerde kullanılan bilgisayarın konfigürasyonu

İn silico çalışmaları için öncelikle VP2'nin 3 Boyutlu yapısı ile 5G7 ve 8H7 antikorlarının fab-heavy ve light zincirleri bir protein data bankası olan RSCB PDB'den elde edildi. Çalışmada kullanılan H69D antikorunun fare klonu olan 5G7 antikoru, yaygın veri tabanı bulunabilirliği ve enerji yükü ve kompozisyonu açısından 5G7 ile çok yüksek benzerlik göstermesi ile In-Silico analizlerde tercih edildi. Elde edilen 3D yapıların kontrolü için PyMOL yazılımı (Şekil 2.7) kullanıldı. PyMOL yazılımı kullanılarak, elde edilen 3D yapıların detaylı analizi gerçekleştirildi. Bu aşamada, yapı içindeki fazla atomlar ve su molekülleri temizlendi. Ayrıca, polar hidrojen bağları eklenerek, kimyasal doğruluk artırıldı ve yapı içinde herhangi bir eksik dizi olup olmadığı kontrol edildi. Enerji minimizasyonu için Swiss-PdbViewer 4.1.0 (Şekil 2.8) kullanıldı. Bu aşama, yapıdaki atomların ve bağların enerjilerini dengeleyerek, molekülün termodinamik olarak en kararlı konformasyona ulaşmasını sağladı.

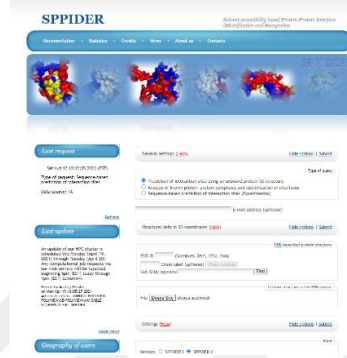


Şekil 2.7 PyMOL yazılımının ekran görüntüsü



Şekil 2.8 Swiss-PdbViewer.4.1.0 yazılımının ekran görüntüsü

Enerji minimalizasyonu yapılmasının ardından moleküler kenetlenme öncesi çok önemli olan bir diğer adım ise olası bağlanmaya açık bölgelerin belirlenmesidir. Bunun için kullanılan önemli araçlardan bir tanesi SIPPIDER programıdır (Şekil 2.9). Bu araç sayesinde olası bağlanma bölgeleri çıkartılarak kör şekilde moleküler kenetlenme yapılması, buna bağlı olarak da hatalı sonuçlar alınması önlenmiş oldu.



Şekil 2.9 SIPPIDER yazılımının ekran görüntüsü

Docking işlemlerinin yapılması için moleküler kenetlenme uygulaması olan Haddock 2.4, moleküler kenetlenme sonucu elde edilen verilerin analizi ve bağlanma bölgelerin açığa çıkarılması için ise PyMOL uygulaması kullanıldı. Bu aşama, VP2 proteini ile 5G7 ve 8H7 antikorları arasındaki etkileşim modellerini belirledi. Elde edilen sonuçlar ve etkileşim bölgeleri, tekrar PyMOL yazılımı kullanılarak detaylı bir şekilde analiz edildi. Bu aşama ile elde edilen verilerin yorumlanmasını ve moleküler etkileşimlerin daha derinlemesine anlaşılmasını sağladı.

2.9.2. In-Vitro çalışmalar

In-Silico analizlerden elde edilen verilere göre seçilen antikorlar kullanılarak antikor titresi, konjugat titresi ve inkübasyon süresi optimizasyonlarını yapmak amacıyla bir seri test pleyti hazırlandı.

Hazırlanan pleytler 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 ve 1/100 oranlarında karbonat/bikarbonat tampon çözeltisi ile sulandırılmış yakalayıcı antikor sulandırmasından oluşan sütunlar ile 1/10, 1/20, 1/40, 1/60, 1/80 ve 1/100 oranlarında yapılan konjugat sulandırmalarının çaprazlama deneneceği xopt (çapraz optimizasyon) pleytleri olarak kullanıldı (Tablo 2.3). Bu pleytler ile yapılan çalışmada 1/10 oranında PBS ile sulandırılmış pozitif kontrol örnekleri kullanıldı ve inkübasyon süresi olarak 60dk sabit süre uygulaması esas alındı. Bu yöntem ile her bir antikor sulandırmasının 6 farklı konjugat sulandırılması

ile vereceği sonuç hakkında veriler elde edildi.

Satır/Sütun	1	2	3	4	5	6
a	1/1 1/10	1/1 1/20	1/1 1/40	1/1 1/60	1/1 1/80	1/1 1/100
b	1/2 1/10	1/2 1/20	1/2 1/40	1/2 1/60	1/2 1/80	1/2 1/100
c	1/4 1/10	1/4 1/20	1/4 1/40	1/4 1/60	1/4 1/80	1/4 1/100
d	1/8 1/10	1/8 1/20	1/8 1/40	1/8 1/60	1/8 1/80	1/8 1/100
e	1/16 1/10	1/16 1/20	1/16 1/40	1/16 1/60	1/16 1/80	1/16 1/100
f	1/32 1/10	1/32 1/20	1/32 1/40	1/32 1/60	1/32 1/80	1/32 1/100
g	1/64 1/10	1/64 1/20	1/64 1/40	1/64 1/60	1/64 1/80	1/64 1/100
h	1/100 1/10	1/100 1/20	1/100 1/40	1/100 1/60	1/100 1/80	1/1001/100

Tablo 2.3 XOPT pleytinin yerleşimi gösterilmektedir. Her bir hücrede sol tarafta antikor sulandırması, sağ tarafta konjugat sulandırması verilmiştir.

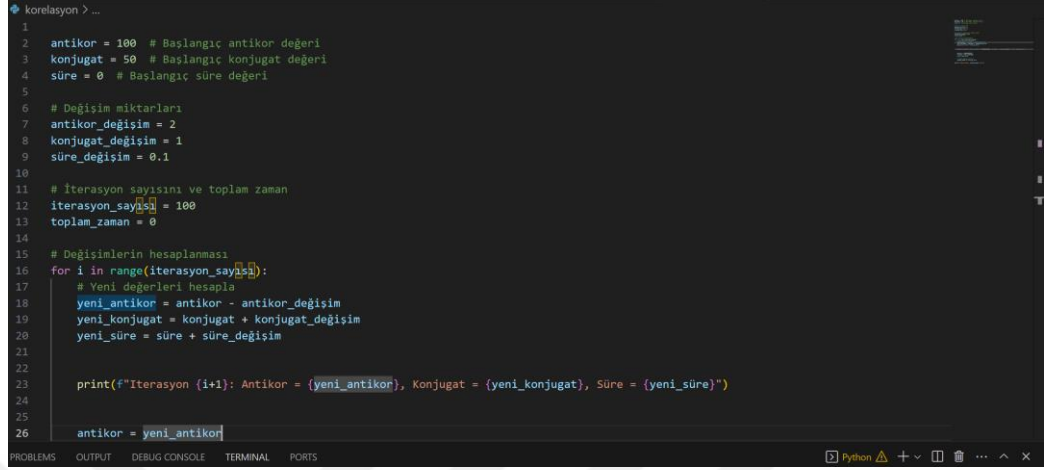
İkinci aşamada zaman optimizasyon pleytleri hazırlandı (time-opt). Bu pleytler ise xopt çalışmasından elde edilen optimum antikor ve konjugat titreleri kullanılarak hazırlandı. 10 dakika ile 60 dakika arasında 10'ar dakikalık sürelerde sonuç okuması yapılarak optimum süreler hesaplandı (Tablo 2.4).

Satır/Sütun	1	2	3	4	5	6
a	10dk CPV	20dk CPV	30dk CPV	40dk CPV	50dk CPV	60dk CPV
b	10dk CPV	20dk CPV	30dk CPV	40dk CPV	50dk CPV	60dk CPV
c	10dk CPV	20dk CPV	30dk CPV	40dk CPV	50dk CPV	60dk CPV
d	10dk CPV	20dk CPV	30dk CPV	40dk CPV	50dk CPV	60dk CPV
e	10dkCCoV	20dkCCoV	30dkCCoV	40dkCCoV	50dkCCoV	60dkCCoV
f	10dkCCoV	20dkCCoV	30dkCCoV	40dkCCoV	50dkCCoV	60dkCCoV
g	10dkCCoV	20dkCCoV	30dkCCoV	40dkCCoV	50dkCCoV	60dkCCoV
h	10dkCCoV	20dkCCoV	30dkCCoV	40dkCCoV	50dkCCoV	60dkCCoV

Tablo 2.4 Time-OPT pleytinin yerleşimi gösterilmektedir. Her bir hücrede sol tarafta inkübasyon süresi, sağ tarafta hedef antijen verilmiştir.

Optimizasyon çalışmalarında karşılaşılan en büyük sorun, iki farklı virusun beraber teşhisi için protokollerin uyumsuz olması idi. Yapılan denemelerde CPV için bulunan optimum süre ile CCoV için bulunan optimum sürenin farklı olması, testin kullanılamaz duruma gelmesi ile sonuçlanacaktı. Bunun önüne geçmek için antikor titresini, konjugat titresini ve zaman değişkenleri arasındaki bağıntıyı yorumlayarak tek bir değişkeni sabit tutmak koşuluyla diğer değişkenler üzerinde hesaplama yapabilecek python tabanlı bir yapay zeka modeli oluşturuldu. Optimizasyon çalışmalarında her bir gözden elde edilen veri, a,c,t (antikor, konjugat, süre) formatında yazılan paket programa girildi ve makine öğrenmesinden faydalanılarak bir model eğitildi (Şekil 2.10). Eğitilen bu model geriye doğru çalıştırıldığında hali hazırda in-vitro şartlarda elde edilmiş olan değerlere %95 oranında benzer değerler vererek güvenilirliğini kanıtladı ve iki virus için gereken şartların beraberce optimize edilmesinde kullanıldı.

Optimizasyon çalışmalarının tamamlanması ile birlikte toplanan numunelerin test edileceği pleytler hazırlandı ve hazırlanan gaita numuneleri ile gerçek dünya testlerine başlandı.



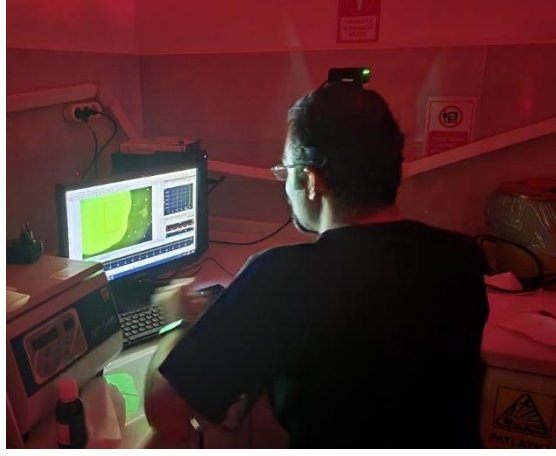
```
1 antikor = 100 # Başlangıç antikor değeri
2 konjugat = 50 # Başlangıç konjugat değeri
3 süre = 0 # Başlangıç süre değeri
4
5
6 # Değişim miktarları
7 antikor_değişim = 2
8 konjugat_değişim = 1
9 süre_değişim = 0.1
10
11 # İterasyon sayısını ve toplam zaman
12 iterasyon_sayısı = 100
13 toplam_zaman = 0
14
15 # Değişimlerin hesaplanması
16 for i in range(iterasyon_sayısı):
17     # Yeni değerleri hesapla
18     yeni_antikor = antikor - antikor_değişim
19     yeni_konjugat = konjugat + konjugat_değişim
20     yeni_süre = süre + süre_değişim
21
22
23     print(f"İterasyon {i+1}: Antikor = {yeni_antikor}, Konjugat = {yeni_konjugat}, Süre = {yeni_süre}")
24
25
26 antikor = yeni_antikor
```

Şekil 2.10 a,c,t korelasyonu modeli için kullanılan kodun örnek görüntüsü

2.10. Floresans görüntüleme

Test sonuçlarının görüntülenmesi için Nikon Eclipse E400 model floresans mikroskobu kullanıldı. Mikroskop tablası üzerinde 96 gözlü mikropleyt düz durmadığından dolayı lam tutucu tertibat yerinden söküldü ve tabla düz bir konuma getirildi. En düşük büyötmeye sahip olan 4x plan-flo özellikli objektif kullanılarak 470nm filtreli LED (Light Emitting Diod) UV kaynağı ile epilüminesans yapılarak görüntüleme sağlandı. Göz ile yapılan değerlendirmede ortamın çok karanlık olduğu, floresans odaklarının zorlukla seçildiği dikkati çekti. Bunun üzerine mikroskoba kamera ataçmanı (nikon DS-Fi3) eklenerek görüntüleme bilgisayar üzerinden yapıldı (Şekil 2.11). Yüksek ışık hassasiyeti ve uzun pozlama süresine sahip CMOS tipi kameranın kullanılması ile floresans odakları net bir şekilde görünür hale geldi.

Kamera görüntüsü baz alınarak kontrol slaytları ile yapılan bir dizi optik ayarlama sonucu mikroskop preparat/arka plan görüntüsü yönünden en uygun ayarlara getirildi. Işık şiddetinin yüksek olması cam preparatlarda görüntüyü daha net hale getirirken, plastik mikropleytte çok fazla yansıma oluşturması sebebiyle kademeli azaltılan ışık şiddeti ve apertür açıklığı denemeleri ile en az yansımaya sebep olacak konfigürasyon (4X Flo, %60 ışık şiddeti, F3.6 diyafram, 12mm odak uzaklığı) tespit edildi ve çalışma boyunca bu konfigürasyon kullanıldı.

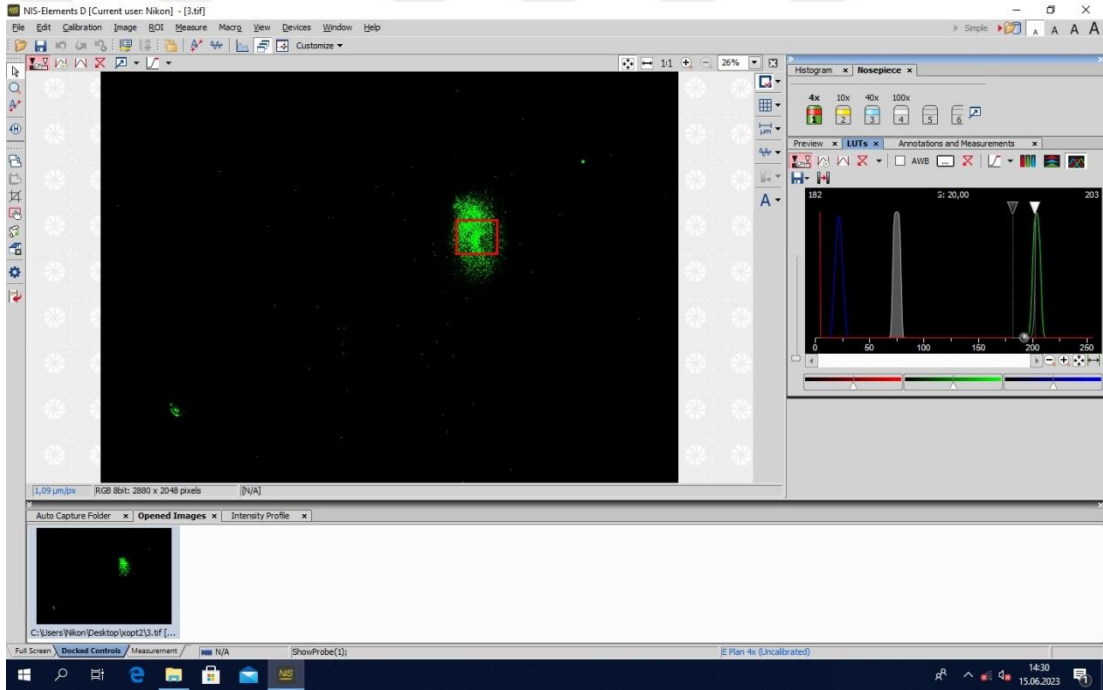


Şekil 2.11 Kamera ataçmanlı mikroskop ile görüntüleme yapılması işlemi gösterilmektedir.

Her parlak yüzeyli cisim gibi mikropleyt de yansıtma özelliğine sahiptir. Hem üstten gelen ultraviyole ışığın yansıması, hem de pleyt yüzeyinde oluşan floresansın yansıması sonucu pleyt konumuyla korele şekilde yer değiştiren hayalet görüntüler ortaya çıktı. Bu görüntülerin varlığı, sonuçların değerlendirilmesi için her ne kadar sorun teşkil etmese de, yapılan renk kodu ve renk dağılım analizlerini olumsuz yönde etkileyeceği için bir şekilde ayırt edilip görüntüden temizlenmesi gerekiyordu. Bu amaçla alınan görüntüyü gerçek zamanlı olarak işleyip hangi piksellerin sabit, hangi piksellerin hareketle yer değiştirdiğini tespit ederek görüntü temizleme işlemi (denoising) yapacak, aynı zamanda NVIDIA tarafından yayınlanan açık kaynak kodlu Tensorflow kütüphanesinden yararlanarak GPU ışın izleme çekirdekleri üzerinde çalışan, yansıma olan görüntü piksel kümelerini görüntüden çıkartacak, python tabanlı bir kod ve model dosyası oluşturuldu (Şekil 2.12). Model dosyasının eğitilmesi için RayOptics yazılımı ile oluşturulan bir yansıma simülasyonu temel alındı (Şekil 2.14, Şekil 2.15, Şekil 2.16). Bu dosya Visual Studio Code programı üzerinde çalıştırılarak mikroskoptan kaydedilen görüntüler işlendi ve temizlendi. Son görüntüler tekrar Nikon NIS-Elements yazılımı (Şekil 2.13) ile değerlendirilerek fotoğrafların RGB (Red/Green/Blue, Adobe) renk kodları, renk dağılım matrixi, yoğunluk ve frekans analizleri yapıldı.

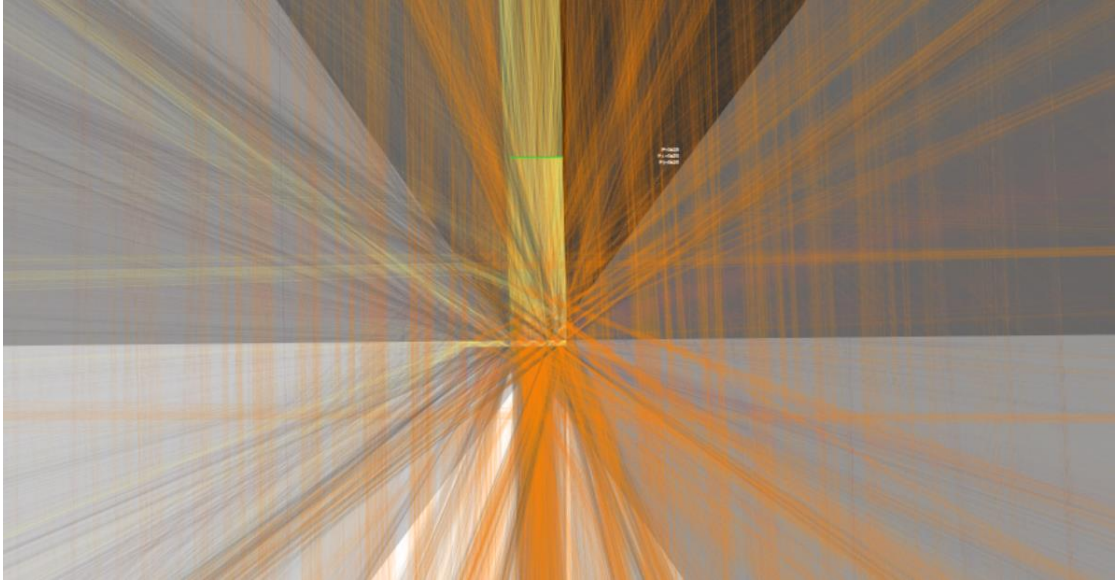
```
15 OptixProgramGroupDesc raygenProgDesc = {};  
16 raygenProgDesc.kind = OPTIX_PROGRAM_GROUP_KIND_RAYGEN;  
17 raygenProgDesc.raygen.module = nullptr; // Replace with your ray generation module  
18 raygenProgDesc.raygen.entryFunctionName = "__raygen__raygen_program";  
19 optixProgramGroupCreate(context, &raygenProgDesc, 1, nullptr, 0, 0, &raygenProgGroup);  
20  
21 // Create pipeline and pipeline options  
22 OptixPipeline pipeline;  
23 OptixPipelineCompileOptions pipelineCompileOptions = {};  
24 optixPipelineCreate(context, &pipelineCompileOptions, nullptr, 0, nullptr, 0, &pipeline);  
25  
26 // Create shader binding table  
27 OptixShaderBindingTable sbt;  
28 // Initialize the shader binding table with appropriate shader program handles  
29  
30 // Launch the ray tracing pipeline  
31 OptixStackSize stackSizes;  
32 optixUtilComputeStackSizes(&raygenProgDesc, &stackSizes);  
33 uint32_t maxTraversableGraphDepth = 2; // Adjust as needed  
34 uint32_t maxCallableProgramDepth = 1; // Adjust as needed  
35 uint32_t directCallableProgramDepth = 2; // Adjust as needed  
36  
37 OptixPipelineLaunchParams launchParams = {};  
38 launchParams.traversable = // Specify the traversable handle  
39  
40 optixLaunch(pipeline, 0, &launchParams);  
41
```

Şekil 2.12 ışın izlemeli denoising işlemi için kullanılan kodun örnek görüntüsü gösterilmektedir.

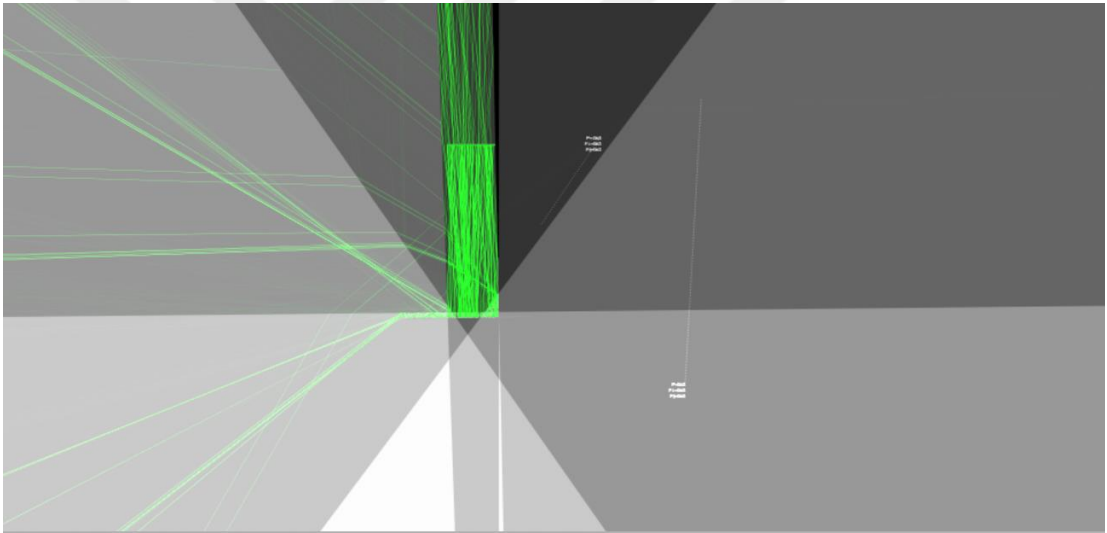


Şekil 2.13 Nikon NIS-Elements yazılımı ile yapılan renk matrixi ölçümleri gösterilmektedir.

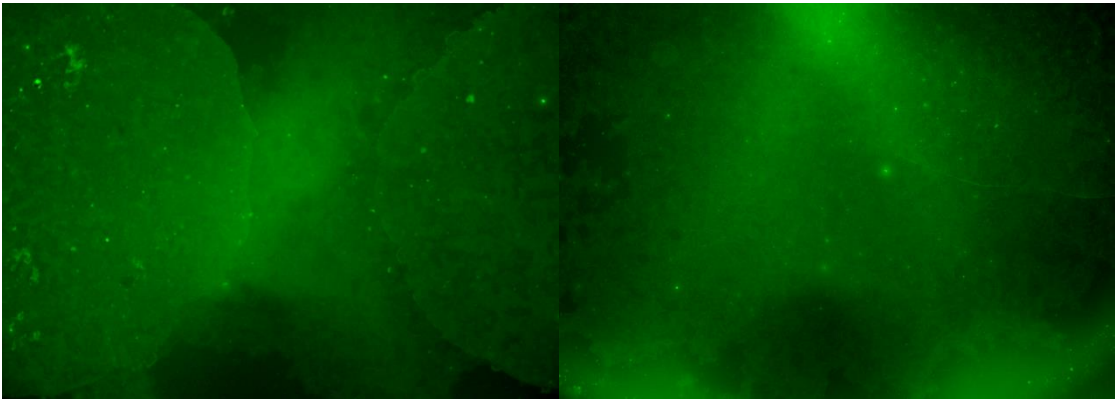
Tüm çalışma boyunca gerek in-siliko analizler gerekse de optimizasyon analizlerinin yapılması için toplam 12 farklı paket program kullanıldı ve farklı amaçlara yönelik 15 farklı python kodu yazıldı.



Şekil 2.14. RayOptics yazılımı ile oluşturulan yansıma simülasyonuna ait ekran görüntüsü



Şekil 2.15 RayOptics yazılımı ile oluşturulan floresans yansıması simülasyonuna ait ekran görüntüsü



Şekil 2.16 Yansıma bulunan floresans görüntü (solda) ve kod tarafından hesaplanan yansıma sahası (sağda)

2.11. Test Protokolü

Tüm süre ve titre optimizasyonları ile görüntüleme tekniklerinin standardizasyonu tamamlandıktan sonra sağ ve sol taraflı CPV/CCoV kaplaması yapılan pleytler ve çözeltiler optimum konsantrasyonlarda tekrar hazırlandı ve test kitini oluşturan bileşenler olarak listelendi. Buna göre test kiti;

- ✓96 gözlü çok bölgeli kaplanmış pleyt
- ✓100x Wash Buffer
- ✓4x FA Wash Buffer
- ✓PBS (Sample Dilution Buffer)
- ✓Sodyum Azid (Conjugate Dilution Buffer)
- ✓Konjugat 1 (Anti-CPV)
- ✓Konjugat 2 (Anti-CCoV) bileşenlerinden oluşacak şekilde hazırlanmış oldu.

Çalışmada kullanılan örnekler daha önce oluşturulan örnek koleksiyonundan seçildi. Örneklerin pozitiflik durumları ayrı bir listeye yazıldı ve örnekler ikincil bir şekilde tekrar numaralandırıldı. Pozitiflik durumları operatöre söylenmeyen ve rastgele sırayla dizilen örnekler gerçek dünya testlerinde kullanıldı.

Öncelikle tüm örnekler ve test kiti bileşenleri oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi. Testin yapılacağı çok bölgeli kaplama yapılmış 96 gözlü mikropleyt koruyucu ambalajından çıkarıldı. Her göze 50µl örnek ve uygun gözlere 50µ pozitif/negatif kontrol eklendi. Etüv ortamında 30dk süre ile inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda pleyt distile suyla 1X'e sulandırılan wash buffer ile 3 sefer yıkandı. Yıkama işleminde sadece pipetleme tekniği kullanıldı. Daldırma veya dökme metodları gözler arasında kontaminasyona sebep olabileceğinden tercih edilmedi. Pleyt mekanik olarak temizlendikten sonra gözler içerisinde hiç sıvı kalmadığından emin olundu.

Konjugat 1 ve konjugat 2 stok çözeltileri eşit hacimde bir falcon tüpü içerisinde karıştırıldıktan sonra sodyum azid çözeltisi ile 10 kat sulandırıldı (1X). Her bir göze 50µl konjugat eklenerek etüv ortamında 30dk süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonunda konjugatların taşıdığı FITC boyasına zarar vermeden yıkama yapabilmek için 1X FA wash buffer kullanıldı. Her göz yine pipetleme yöntemi ile 3 sefer yıkandı ve pleyt mekanik olarak temizlendi.

Görüntüleme işlemine geçilmeden önce nemli veya ıslak pleyt yüzeyinin UV ışığı dağıtarak görüntü kalitesini düşürmemesi için pleyt 15 dk havada kurutuldu. Floresan mikroskobu altında FLO470 filtresi ve 4X objektif ile görüntüleme yapıldı ve fotoğraflar kaydedildi.

Floresan konjugatın ışık ile reaksiyona girerek bozunmaya uğramasından kaçınmak için konjugatların hazırlanmasından görüntülemenin bitimine kadar olan süreç boyunca laboratuvar yalnızca zayıf kırmızı LED ışık ile aydınlatıldı.

Hazırlanan bu test yöntemi, çok bölgeli immunfloresan antikor belirleme testi (Multi Regional Ummunofluorescence Antibody Determination Assay) olarak adlandırıldı ve MIFADA olarak kısaltıldı.



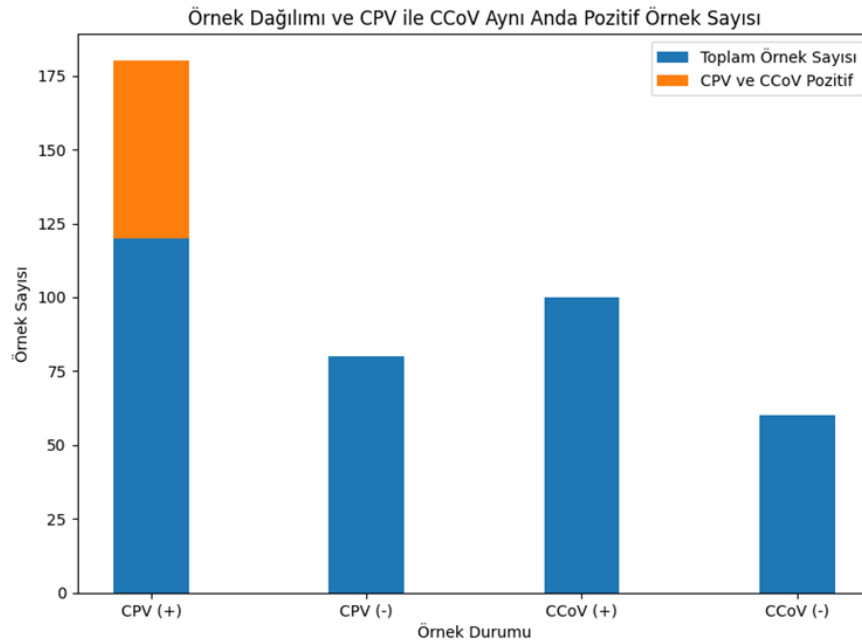
3.BULGULAR

3.1. Örnek koleksiyonu

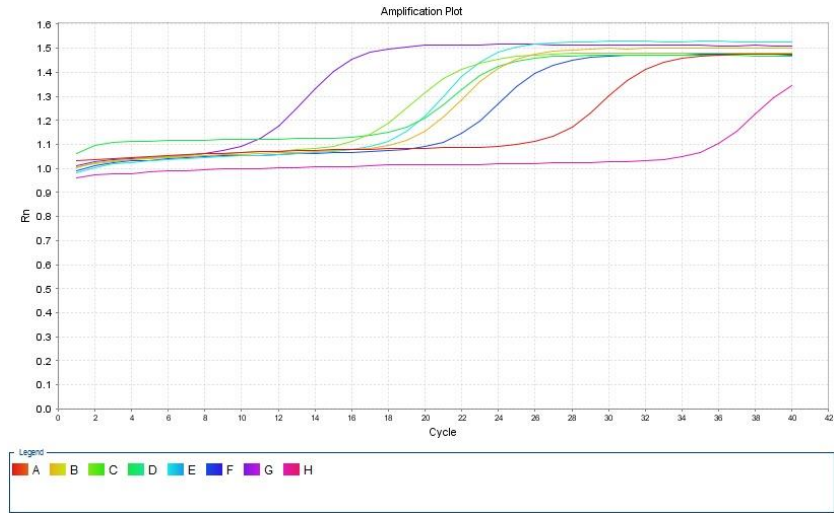
Çalışmada RT-PCR ile pozitiflik durumu belirlenen (Şekil 3.2) toplam 200 adet örnek ile pozitif ve negatif kontrol örnekleri kullanıldı. Bu örneklerin bir kısmı hem CPV hemde CCoV yönünden pozitifken(N=60), bir kısmı da her iki virus için negatif (N=160) veya tek bir virus için pozitif (Tablo 3.1, Şekil 3.1). Tüm numuneler eva green master mix kullanılarak RT-PCR ile teşhis edildi ve pozitiflik durumlarına göre gruplandırıldı. Testin bir virus yönünden pozitifliği yakalaması ve yanlış yönden floresans vermesi durumunun değerlendirilmesi için tek virus yönünden pozitif örnekler, aynı anda iki virusun pozitifliğini yakalamak için her iki virus yönünden pozitif örnekler, hatalı pozitiflik durumunun ortaya konması için ise her iki virus yönünden negatif örnekler önemli idi.

Örnek Durumu	CPV (+)	CPV (-)	CCoV (+)	CCoV (-)	CPV/CCoV (+)	CPV/CCoV (-)
Örnek sayısı	120	80	100	80	60	160
Toplam Örnek Sayısı	380					

Tablo 3.1 Toplanan örneklerden Real Time PCR ile elde edilen pozitif/negatif sayıları gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Örneklerin pozitiflik durumlarını gösteren grafik görülmektedir.



Şekil 3.2 RT-PCR sonuçları (G:Pozitif Kontrol, H:Negatif Kontrol)

3.2. Primer tasarımlarının kontrolü

Tablo 3.2’de gösterildiği gibi, CPV teşhisinde kullanılan primer, virusun VP2 gen bölgesini hedef almakla birlikte RT- PCR için uygun olan 93bp’lik bir ürün uzunluğuna sahipti. Aynı zamanda GC% ve kendi üstüne bağlanma değerlerinin kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu görüldü. Primerlerin potansiyel hairpin formasyonları olduğu (Tablo 3.3) ancak stabil bir şekilde reaksiyona girerek sonuçları etkilemeyeceği anlaşıldı. Bu analize göre forward primer üzerinde ATTA sekansının TAAT sekansı ile komplementer olduğu ancak minimum self dimerizasyon limiti olan 5 baz uzunluğunun altında olduğu için bir sorun teşkil etmediğine karar verildi. Reverse primer üzerinde herhangi bir hairpin potansiyeli veya kendi üzerine bağlanma olasılığı olmadığı dikkati çekti (Tablo 3.3).

CPV/VP2	Sequence (5'→3')	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward (5'-3')	AAACAGGAATTAAGTA TACTAATATATTTA	30	421	450	52.20	16.67	12.00	12.00
Reverse (5'-3')	AAATTTGACCATTTG GATAAAGT	23	513	491	53.08	26.09	6.00	6.00
Product length	93							

Tablo 3.2 CPV teşhisinde kullanılan forward ve reverse primerlerin analiz sonuçları

Primer	Minimum Self-Dimerization	Minimum Hairpin
Forward	5	4
Potential Hairpin Formation: 5' AAACAGGAATTAAC TATACTA ATATATTTA 3'		
3'	ATTTATATAATCATATCAATTAAGGACAAA 5'	
Complementarity:		
None !		
Potential Self-Annealing Sites (1 Mis-Match Allowed):		
1. 5' AAACAGGAATTAAC TATACTA ATATATTTA 3'		
3'	ATTT ATATAAT CATATCAATTAAGGACAAA 5'	
2. 5' AAACAGGA TTAACT TATACTAATATATTTA 3'		
3'	ATTTATATAATCATATC AATTA AGGACAAA 5'	
3. 5' AAACAGGAATTAAC TATACTA ATATATTTA 3'		
3'	ATTTATATAATC ATATCA ATTAAGGACAAA 5'	
4. 5' AAACAGGAATTAAC TATACTAATATATTTA 3'		
3'	ATTT TATATAAT CATATCAATTAAGGACAAA 5'	
Reverse	5	4
Potential Hairpin Formation: 5' AAATTTGACCATTGGATAAACT 3'		
3'	AGTTATCCAAATGGTCGGAAATTT 5'	
Complementarity:		
None !		
Potential Self-Annealing Sites (1 Mis-Match Allowed):		
None !		

Tablo 3.3, CPV primerlerinin kendi üzerine bağlanma ve potansiyel hairpin formasyonları (NCBI Blast)

Aynı analizler, çalışmadaki diğer virus olan CCoV teşhisinde kullanılacak primerler için de yapıldı (Tablo 3.4). Bu analizler sonucunda CCoV için seçilen primerlerin Tm değerlerinin kabul edilebilir sınırlar içerisinde ancak normal değerlerden daha yüksek (58) olduğu, buna karşın kendi üzerine bağlanma potansiyelinin çok düşük olması sebebiyle çalışmada kullanılmasının uygun olduğuna karar verildi.

CCoV	Sequence (5'→3')	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward(5'-3')	TTGATCGTTTTTA TAACGGTTCTACA A	27	25921	25947	58.01	29.63	9.00	9.00
Reverse(5'-3')	AATGGGCCATAAT AGCCACATAAT	24	26019	25996	58.41	37.50	9.00	3.00
Product lenght	99							

Tablo 3.4 CCoV teşhisinde kullanılan forward ve reverse primerlerin analiz sonuçları (NCBI Blast)

Primer	Minimum Self-Dimerization	Minimum Hairpin
Forward	5	4
Potential Hairpin Formation: 5' TTGATCGTTTTTATAACGGTTCTACAA 3'		
3'	AATGGGCCATAATAGCCACATAAT 5'	
Complementarity:		
None !		
Potential Self-Annealing Sites (1 Mis-Match Allowed):		
5'	TTGATCGTTTATAACGGTTCTACAA	3'
3'	AACATCTTGCAATATTTTGCTAGTT	5'
5'	TTGATCGTTTATAACGGTTCTACAA	3'
3'	AACATCTTGGAATATTTTGCTAGTT	5'
5'	TTGATCGTTTATAACGGTTCTACAA	3'
3'	AACATCTTGCAATATTTTGCTAGTT	5'
3'	ATTATATAATCATATCAATTAAGGACAAA	5'
Reverse	5	4
Potential Hairpin Formation: 5' AATGGGCCATAATAGCCACATAAT 3'		
Complementarity:		
None !		
Potential Self-Annealing Sites (1 Mis-Match Allowed):		
None !		

Tablo 3.5, CCoV primerlerinin kendi üzerine bağlanma ve potansiyel hairpin formasyonları (NCBI Blast)

Yapılan analizlerde CCoV forward ve reverse primerlerinin potansiyel hairpin formasyonları oluşturulduğunda self dimerizasyon limitinin üzerinde, ancak limiten 1 baz fazla olduğu için kullanılmasında bir sakınca olmadığına karar verildi (Tablo 3.5). Her ihtimale karşı test esnasında pozitif ve negatif kontrol sinyallerinin ve tm değerlerinin dikkatlice incelenerek sonuçların irdelenmesine karar verildi ve yapılan kontrollerde olumsuz bir durumla karşılaşılmadı.

Primerlerin uygunluğuna karar verildikten sonra RT-PCR analizleri yapıldı ve örnekler pozitiflik durumlarına göre sınıflandırıldı. Tüm örnek ve kontrol gözlerinden sigmoidal sinyallerin alınması ve tm değerlerinin anlamlı sonuçlar vermesi ile doğrulama testleri başarıyla tamamlanmış oldu.

3.3. Moleküler Kenetlenme (Docking) Analizleri

Çalışmada kullanılmaya aday Anti-CPV antikoru olan 8H7 ve 5H7 antikoru ile CPV VP2 proteini hedeflenerek yürütülen bir dizi docking işlemi sonucunda bağlanma

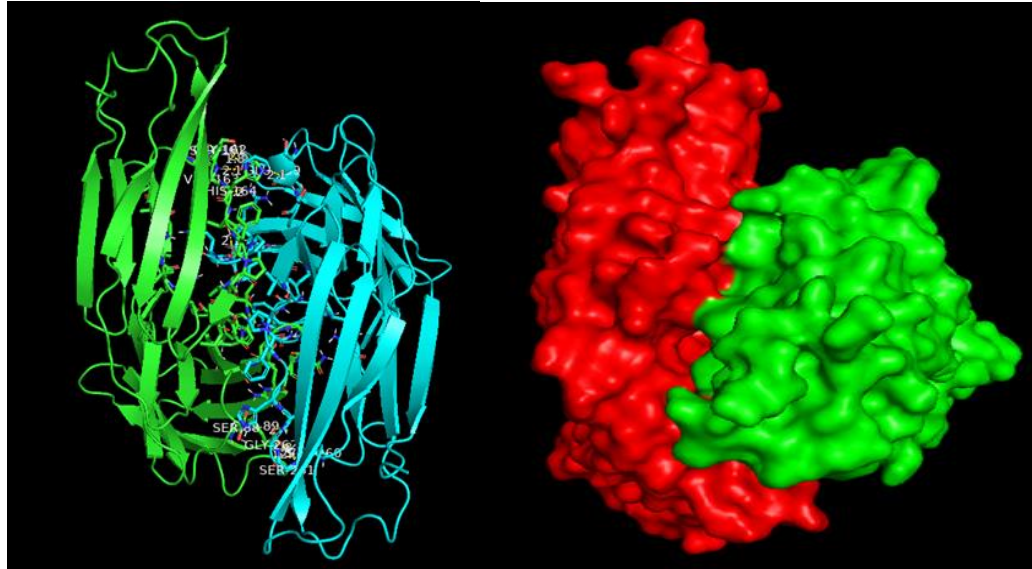
enerjileri ve bağlanma kalitesi üzerine elde edilen veriler değerlendirildi (Tablo 3.6).

Yapı	Enerji minimalizasyonu öncesi	Bağlanma Öncesi	Bağlanma Sonrası
VP2	6294.152	-22665.602	null
8H7 HEAVY CHAIN	-6763.448	-9114.699	-12232.299
8H7 LIGHT CHAIN	-8762.589	-11227.045	-15032.643
5G7 HEAVY CHAIN	-6186.683	-8289.174	-29840.113
5G7 LIGHT CHAIN	-6867.917	-8770.587	-28951.811

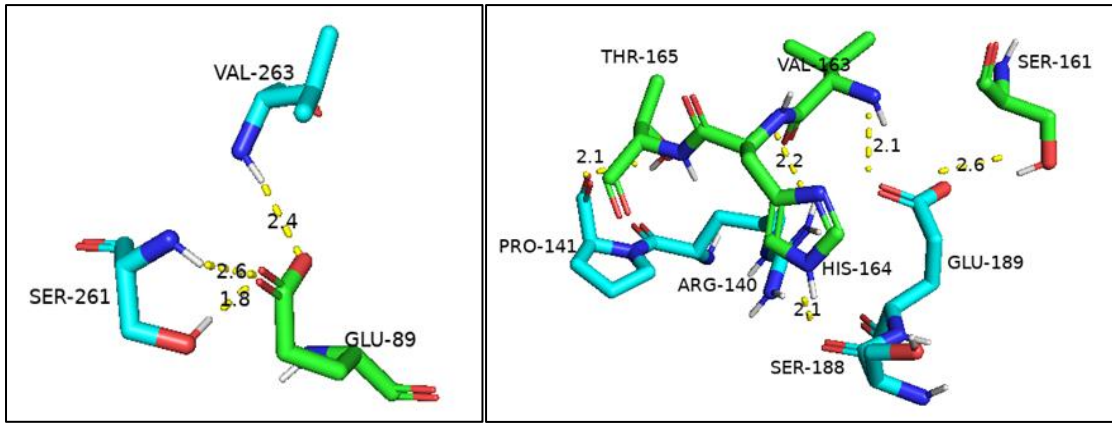
Tablo 3.6 CPV VP2 proteini ile 8H7 ve 5G7 antikorlarının farklı aşamalarda bağlanma enerjileri CCal cinsinden gösterilmektedir

Bu verilere bakıldığında VP2-8H7-H kompleksinin enerji değerinin düşük olduğu ve hedef moleküle güçlü bir şekilde bağlandığı, ayrıca bağlanma potansiyelinin yüksek olduğu, VP2-8H7-L kompleksinin de benzer özellikler gösterdiği görüldü. VP2-5G7-L ve VP2-5G7-H komplekslerinin enerji değerlerinin ise 8H7 komplekslerine göre çok daha düşük olduğu, dolayısıyla VP2 proteini ile güçlü bir bağ yapma olasılığının daha yüksek olduğu dikkati çekti.

Daha kesin verilere ulaşmak için yapılan modellemeler ile bağlantı bölgelerinin analizleri yapılarak söz konusu antijen-antikor komplekslerinin bağ yapıları (Şekil 3.3) ve bağlanma bölgeleri (Şekil 3.4) de araştırıldı.



Şekil 3.3 VP2 ve 8H7 Heavy Chain'nin oluşturduğu bağlar, 3D yapı içerisinde



Şekil 3.4 VP2-8H7H Heavy Chain arasında oluşan hidrojen bağlarının konumları

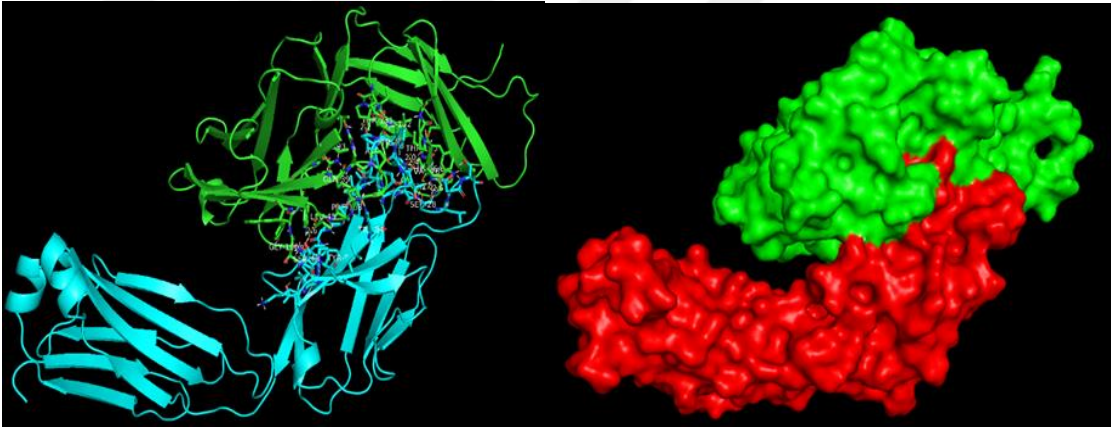
8H7-H1	VP2	BAĞLANTI SAYISI	BAĞLANTI AÇISI
SER-261	GLU-89	2	2.6
			1.8
VAL-263	GLU-89	1	2.4
GLU-189	VAL-163	1	2.1
	SER-161	1	2.6
SER-188	HIS-164	1	2.1
ARG-140	VAL-163	1	2.1
PRO-141	THR-165	1	2.1

Tablo 3.7 VP2-8H7H kompleksinin bağlanma noktaları ve bağlanma açıları

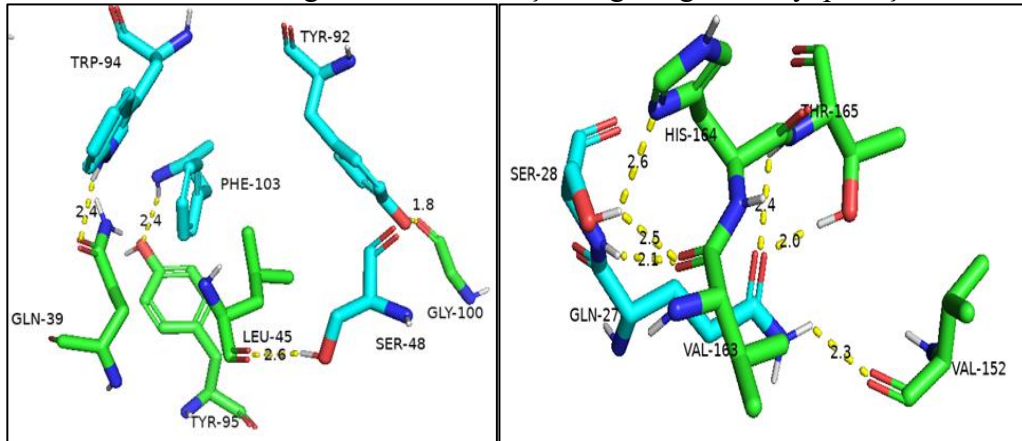
Elde edilen verilere göre, 8H7 antikoruna ile CPV2 arasında oluşan bağlar incelendi. SER-261 - GLU-89 bağlarının farklı konformasyonlarda gözlemlendiği belirlendi, bu da antikorun VP2'ye karşı çok yönlü bir etkileşim sergilediğini göstermektedir. VAL-263 - GLU-89 bağı düşük açıda olmasına rağmen hala güçlü bir bağlılık göstermekte, CPV2'ye karşı etkili bağlanmayı vurgulamaktadır. Öte yandan, GLU-189 - VAL-163 bağı, 8H7 antikorunun CPV2'ye karşı etkili bir bağ oluşturduğunu göstermektedir, bu da virüsün nötralizasyonunda önemli bir bileşen olarak kabul edilebilir. SER-161 - GLU-189 bağı, antikorun CPV2 ile etkili bir bağ oluşturduğunu göstermekte olup, etkileşimin stabilitesi ve etkinliği açısından kritik öneme sahiptir (Tablo 3.7). Sonuç olarak, bu bağlantı verileri, 8H7 antikorunun CPV için yakalayıcı antikor olarak kullanılabileceği anlaşılmıştır.

8H7 Light Chain'in VP2 ile olan moleküler etkileşimleri (Şekil 3.5, Şekil 3.6)

dikkate alındığında, belirli amino asitler arasındaki bağlantılar incelenmiştir. TRP-94 ve GLN-39 arasındaki bağın 2.4 derece ile ölçülmesi, antikorun VP2'ye bağlanabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde, PHE-103 ve TYR-95 arasındaki bağın açısı da 2.4 derecedir. Bu etkileşim, antikorun VP2'nin belirli bölgelerine karşı yüksek bir bağlılık göstermesine işaret edebilir. Bununla birlikte, SER-48 ve LEU-45 arasındaki bağın 2.6 derece açı ile gözlemlenmesi, 8H7 Light Chain'in VP2 ile etkileşimlerindeki belirgin rolünü vurguladı. TYR-92 ve GLY-100 arasındaki bağın 1.8 derece açı ile ölçülmesi, bu etkileşimin stabil ve güçlü olduğunu gösterdi. Ayrıca, SER-28 ve HIS-164 arasındaki bağın 2.6 derece ile belirlenmesi, antikorun VP2 ile etkileşiminin kritik bir bileşeni olabilir. SER-28 ve VAL-163 arasındaki bağların 2.1 ve 2.5 derece açıları ile ölçülmesi, antikorun VP2'ye spesifik bir şekilde bağlanmasının temelini oluşturabilir. Son olarak, GLN-27 ve THR-165 arasındaki bağların sırasıyla 2.4 ve 2.0 derece açıları ile belirlenmesi, 8H7 Light Chain'in VP2 ile etkileşimlerindeki (Tablo 3.7) önemli rolünü vurgudı.



Şekil 3.5 VP2 ve 8H7 Light Chain'nin oluşturduğu bağlar, 3D yapısı içerisinde

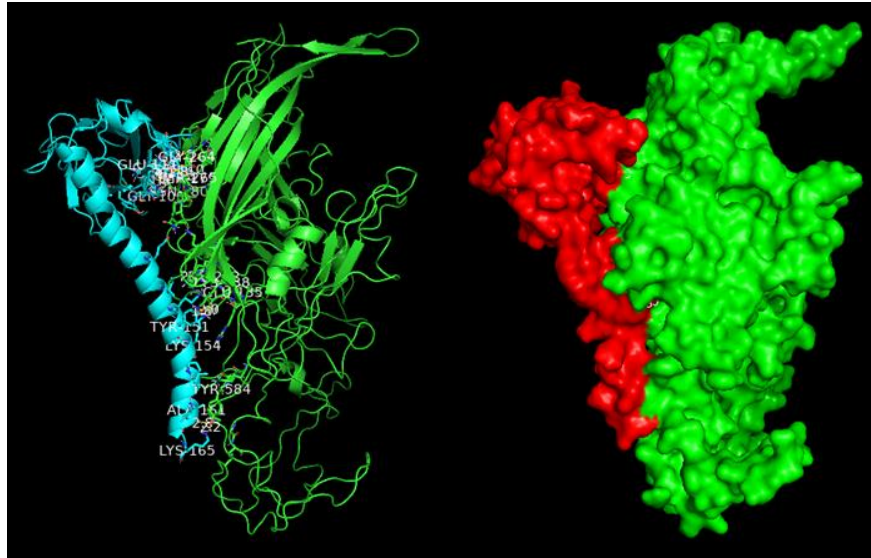


Şekil 3.6 VP2-8H7 Light Chain arasında oluşan hidrojen bağlarının konumları

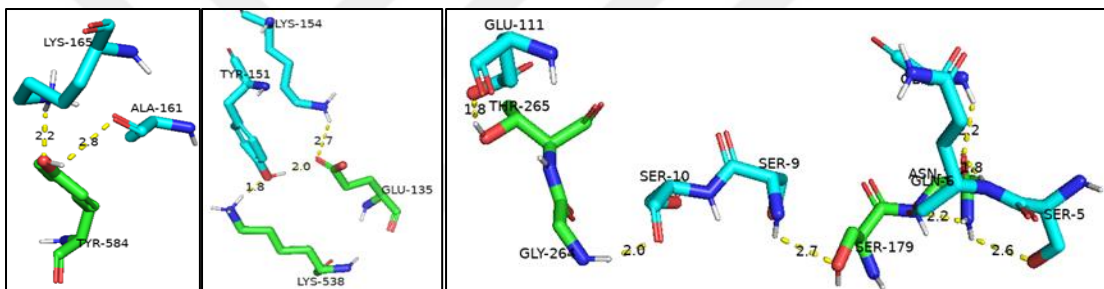
8H7 LIGHT CHAIN	VP2	BAĞLANTI SAYISI	BAĞLANTI AÇISI
TRP-94	GLN-39	1	2.4
PHE-103	TYR-95	1	2.4
SER-48	LEU-45	1	2.6
TYR-92	GLY-100	1	1.8
SER-28	HIS-164	1	2.6
SER-28	VAL-163	2	2.1
			2.5
GLN-27	THR-165	2	2.4
			2.0
GLN-27	VAL-152	1	2.3

Tablo 3.8 VP2-8H7-L kompleksinin bağlanma noktaları ve bağlanma açıları

5G7 Light Chain'in VP2 proteini ile gerçekleştirdiği moleküler etkileşimler incelendiğinde özellikle, LYS-165 ve TYR-584 arasındaki bağın 2.2 derecede ve ALA-161 ve TYR-584 arasındaki bağın 2.8 derece olduğu gözlemlendi. Bu durum, antikorun VP2 proteini ile belirli bir bölgeye özgü bir bağlılık oluşturabileceğini işaret etmektedir. TYR-151'in LYS-538 ve GLU-135 ile olan bağları, antikorun VP2 ile etkileşimlerinin temel bileşenleridir. Bu bağlantıların stabilitesi, antikorun VP2'ye spesifik bir bağlılık sağlamasında kritik önem taşır. Bununla birlikte, GLN-6 ve ASN-180 arasındaki bağların farklı açılarda olması, bu bağların belirli konumlarda bulunduğunu ve VP2'ye spesifik bir bağlılık sağladığını göstermektedir. Sonuç olarak, bu analizler, 5G7 Light Chain'in VP2 ile çok yönlü bir etkileşim gösterebildiğini ve bu etkileşimin adaptif ve esnek bir yapıya sahip olduğunu gösterdi.



Şekil 3.7 VP2 ve 5G7 Light Chain'in oluşturduğu bağlar, 3D yapısı içerisinde



Şekil 3.8 VP2-5G7 Light Chain arasında oluşan hidrojen bağlarının konumları

5G7 Heavy Chain'in VP2 proteini ile yaptığı moleküler etkileşimlerin detaylı bir analizi gerçekleştirilmiştir. Özellikle, GLU-89 ve TRP-545 arasındaki bağın 2.3 derece ve GLY-102 ve VAL-555 arasındaki bağın 2.6 derece açı oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu bağlantının stabilitesi, 5G7 Heavy Chain'in VP2 proteini ile belirli bir bölgeye spesifik bir bağlılık geliştirebileceğini işaret etmektedir. LYS169'un THR-433 ile olan bağı, antikorun VP2 ile etkileşimlerinin temel bileşenlerindendir ve 1.7 derece bir açı ile belirlenmiştir. Bu bağlantının stabilitesi, antikorun VP2 proteini ile belirli bir bölgeye spesifik bir bağlılık sağlamasında kritik öneme sahiptir. Ayrıca, ASP-164 ve ASN-426 arasındaki bağın 1.8 derece olduğu gözlemlenmiştir. Bu bağlantı, 5G7 Heavy Chain'in VP2 proteini ile etkileşimlerinin önemli bir bileşenidir.

GLU-150'un ARG-313 ve GLN-310 ile olan bağları, antikorun VP2 ile etkileşimlerinin diğer temel bileşenleridir. Bu bağlantıların farklı açılarda olması, antikorun VP2 proteini ile belirli konumlarda belirli bir bölgeye spesifik bir bağlılık sağladığını göstermektedir.

Sonuç olarak, bu analizler, 5G7 Heavy Chain'in VP2 proteini ile çok yönlü bir etkileşim gösterebildiğini ve bu etkileşimin adaptif ve esnek bir yapıya sahip olduğunu işaret etmektedir. Bu bilgiler, antikor tabanlı terapötik stratejilerin geliştirilmesi ve virüs enfeksiyonlarının kontrol altına alınması için önemli bir temel oluşturabilir.

5G7 LIGHT CHAIN	VP2	BAĞLANTI SAYISI	BAĞLANTI AÇISI
LYS-165	TYR-584	1	2.2
ALA-161	TYR-584	1	2.8
TYR-151	LYS-538	1	1.8
TYR-151	GLU-135	1	2.0
LYS-154	GLU-135	1	2.7
GLU-111	THR-265	1	1.8
SER-10	GLY-264	1	2.0
SER-9	SER-179	1	2.7
GLN-6	ASN-180	2	2.2
			1.8
SER-5	ASN-180	1	2.6
ASN-180	GLY-106	1	2.2

Tablo 3.9 VP2-5G7-L kompleksinin bağlanma noktaları ve bağlanma açıları

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde dört kompleksin de kullanıma uygun olduğu ve VP2 proteinini yüksek doğrulukla tanımlayabileceği görüldü. Bununla birlikte 5G7 komplekslerinin bağlanma enerjilerinin 8H7 komplekslerine oranla daha yüksek olduğu görüldü ve 5G7 komplekslerinin test sırasında bağlantı kararlılığını daha iyi koruyabileceği düşünüldü. Kesin kararı vermek üzere Haddock analizleri yapıldı (Tablo 3.10).

YAPI	HADDOCK score (higher is better)	RMSD from the overall lowest-energy structure (lower is better)	Van der Waals energy (higher is better)	Electrostatic energy (lower is better)	Desolvation energy (lower is better)	Buried Surface Area (higher is better)	Z-Score (lower is better)
VP2-8H7-H	2776.5 +/- 106.5	14.1 +/- 0.0	-61.7 +/- 11.6	-95.4 +/- 25.7	-16.6 +/- 2.9	2015.2 +/- 182.5	-2.0
VP2-8H7-L	-29.8 +/- 6.4	29.1 +/- 0.1	-91.2 +/- 6.2	-91.3 +/- 12.1	-43.5 +/- 5.7	2518.5 +/- 89.1	-0.4
VP2-5G7 L	812.3 +/- 78.1	1.1 +/- 0.6	-44.7 +/- 4.3	-156.8 +/- 29.5	-2.8 +/- 1.8	2121.0 +/- 241.1	-1.7
VP2-5G7 H	829.6 +/- 14.1	16.8 +/- 0.1	-84.4 +/- 7.5	-325.3 +/- 54.8	-13.3 +/- 10.6	3808.6 +/- 60.3	-1.0

Tablo 3.10 VP2 kompleks yapılarının haddock analiz sonuçları gösterilmektedir.

Sonuç olarak, bu kapsamlı yapısal analiz, VP2 proteini ile 5G7 antikoruunun ağır (VP2-5G7 H) ve hafif (VP2-5G7 L) zincirleri arasındaki etkileşimleri ortaya koydu. Güçlü bağlanma affinitesini gösteren yüksek HADDOCK skorları, hem VP2-5G7 H hem de VP2-5G7 L'nin VP2 ile etkileşimde bulunma potansiyelinin yüksek olduğunu gösterdi. Bu potansiyel, energetik olarak tercih edilen konformasyona yapısal olarak yakın olmalarını gösteren düşük RMSD değerleri ile desteklenmektedir. Ayrıca, VP2-5G7 H ve VP2-5G7 L'nin, VP2-8H7 kompleksinin ağır (VP2-8H7-H) ve hafif (VP2-8H7-L) zincirlerine kıyasla belirgin avantajlar sunduğu görüldü. Bu, VP2-5G7 H ve VP2-5G7 L'nin, diğer komplekslere kıyasla yüksek Van der Waals enerjilerine sahip olmalarıyla belirginleşmektedir; güçlü bir kovalent olmayan bağlanma etkileşimini işaret etmektedir. Özellikle, VP2-5G7 L'nin elektrostatik enerji skoru, diğer komplekslere göre belirgin bir avantaj sunarak avantajlı elektrostatik tamamlayıcılığı göstermektedir. Buna ek olarak, her iki zincir için azalmış desolvasyon enerjileri, çözücü kaynaklı kararsızlaşmanın azaldığını göstermektedir. Test boyunca likit fazda bulunması muhtemel farklı sıvılar göz önünde bulundurulduğunda bu değerlerin önemi daha iyi anlaşılmaktadır. VP2-5G7 kompleksi içindeki gömülü yüzey alanındaki belirgin artış temel bir gözlem olup, bu durum VP2 ile 5G7 antikoru arasında geniş bir ara yüzey etkileşimine işaret etmektedir. VP2-5G7 H için -

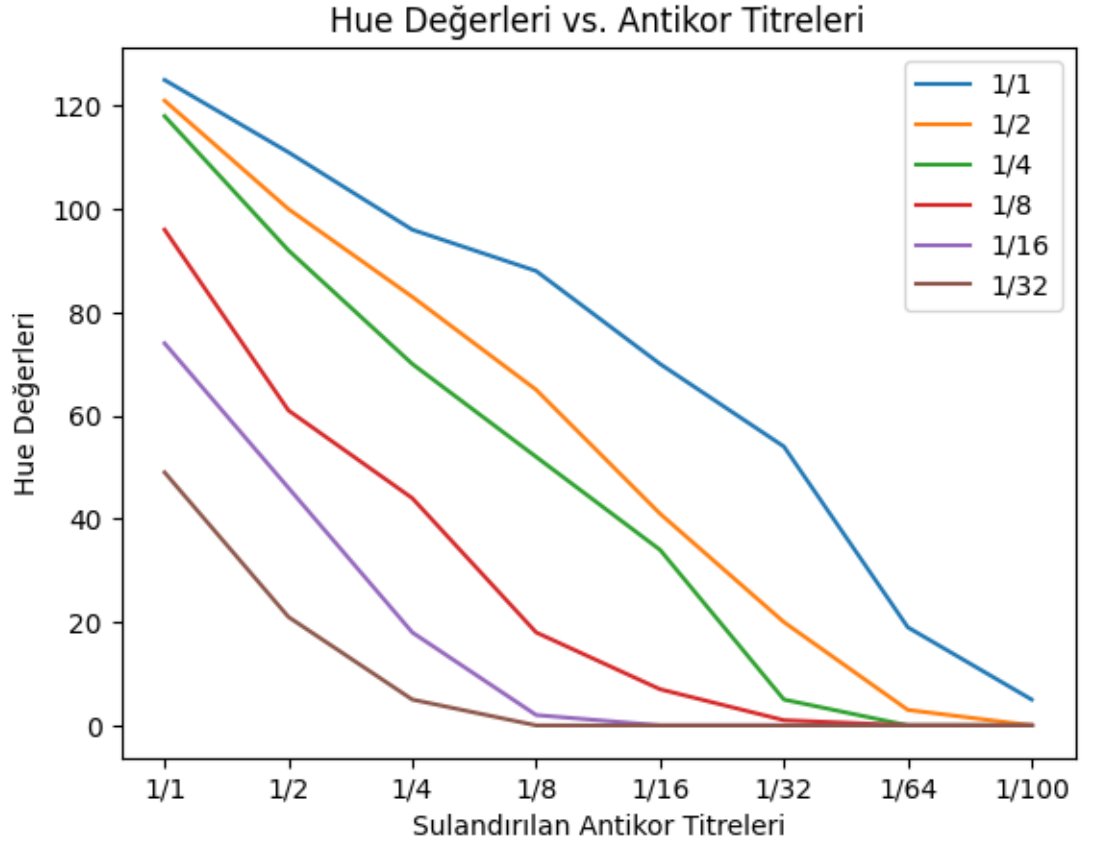
1.0 olan Z-Skoru, olumlu bir yapısal uyum olasılığını destekleyerek, stabil kompleks oluşumunun muhtemelliğini güçlendirdi. Genel olarak, bu derinlemesine analiz, 5G7 (H69D) antikörünün hem ağır hem de hafif zincirlerinin VP2 hedef antijenini yakalamak için solid faz antikoru olarak kullanılmasının daha uygun olduğunu ortaya koydu.

3.4. Optimizasyon çalışmaları

Çalışmada, CPV ve CCoV için ayrı ayrı yapılan optimizasyon çalışmalarının in-vitro aşamaları inkübasyon süresi, yakalayıcı antikor titresini ve konjugat titresinin hesaplanmasından oluşmakta idi. Her bir virus için ayrı ayrı yapılan değerlendirmelerde sabit zaman fonksiyonu (60dk) kullanılarak titre hesapları için dama tahtası metodu ile seri antikor sulandırılmaları ve seri konjugat sulandırılmaları test edildi. Sonuçların görüntülenebilmesi için her bir optimizasyon çalışmasının sonunda görüntüleme yapıldı. Görüntüleme ile elde edilen grafikler python ortamında hue değeri baz alınarak oluşturulan üç boyutlu grafiklere dönüştürüldü (tablo 3.13) ve hue değerleri baz alınarak sonuçlar değerlendirildi. Bu çalışma, her iki virus için de ayrı ayrı yapılarak değerler kaydedildi (CPV için tablo 3.11, şekil 3.9, CCoV için tablo 3.12, Şekil 3,10).

AB/CJG	1/10	1/20	1/40	1/60	1/80	1/100
1/1	125	121	118	96	74	49
1/2	111	100	92	61	46	21
1/4	96	83	70	44	18	5
1/8	88	65	52	18	2	0
1/16	70	41	34	7	0	0
1/32	54	20	5	1	0	0
1/64	19	3	0	0	0	0
1/100	5	0	0	0	0	0

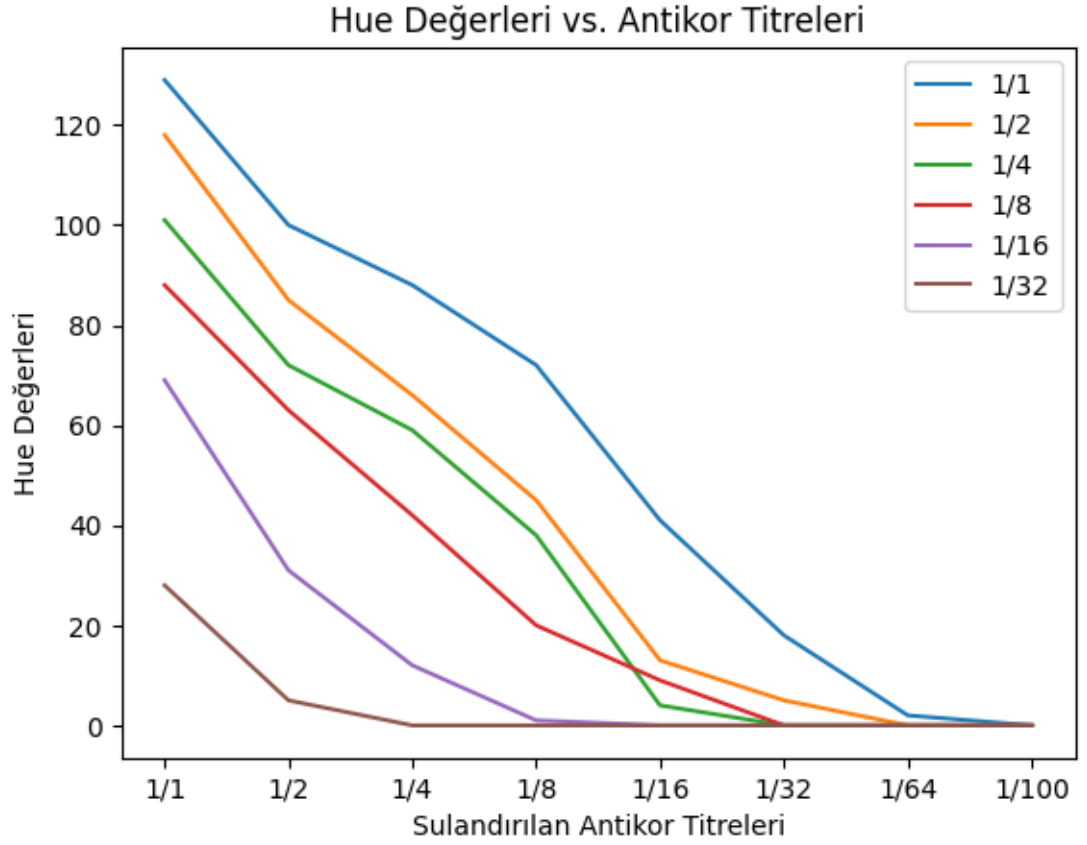
Tablo 3.11 CPV için yapılan titre optimizasyon çalışmasından elde edilen hue değerleri gösterilmektedir (x eksenini konjugat titresini, y eksenini antikor titresini göstermektedir).



Şekil 3.9 CPV için yapılan titre optimizasyon çalışmasından elde edilen hue değerlerini gösteren grafik görülmektedir.

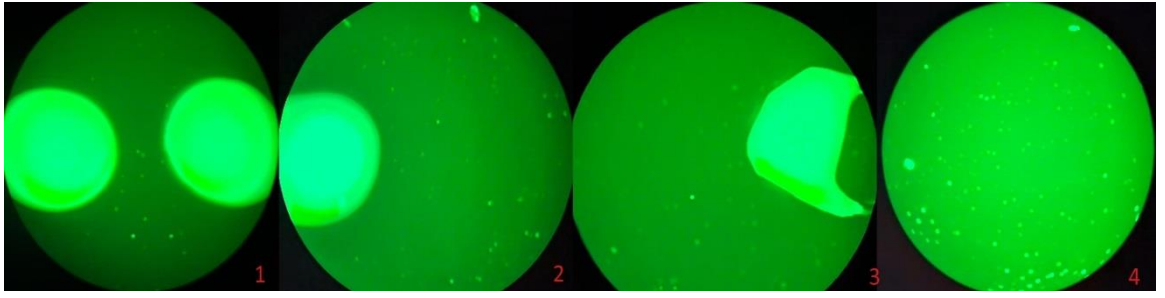
AB/CJG	1/10	1/20	1/40	1/60	1/80	1/100
1/1	129	118	101	88	69	28
1/2	100	85	72	63	31	5
1/4	88	66	59	42	12	0
1/8	72	45	38	20	1	0
1/16	41	13	4	9	0	0
1/32	18	5	0	0	0	0
1/64	2	0	0	0	0	0
1/100	0	0	0	0	0	0

Tablo 3.12 CCoV için yapılan titre optimizasyon çalışmasından elde edilen hue değerleri gösterilmektedir (x eksen konjugat titresini, y eksen antikor titresini göstermektedir).

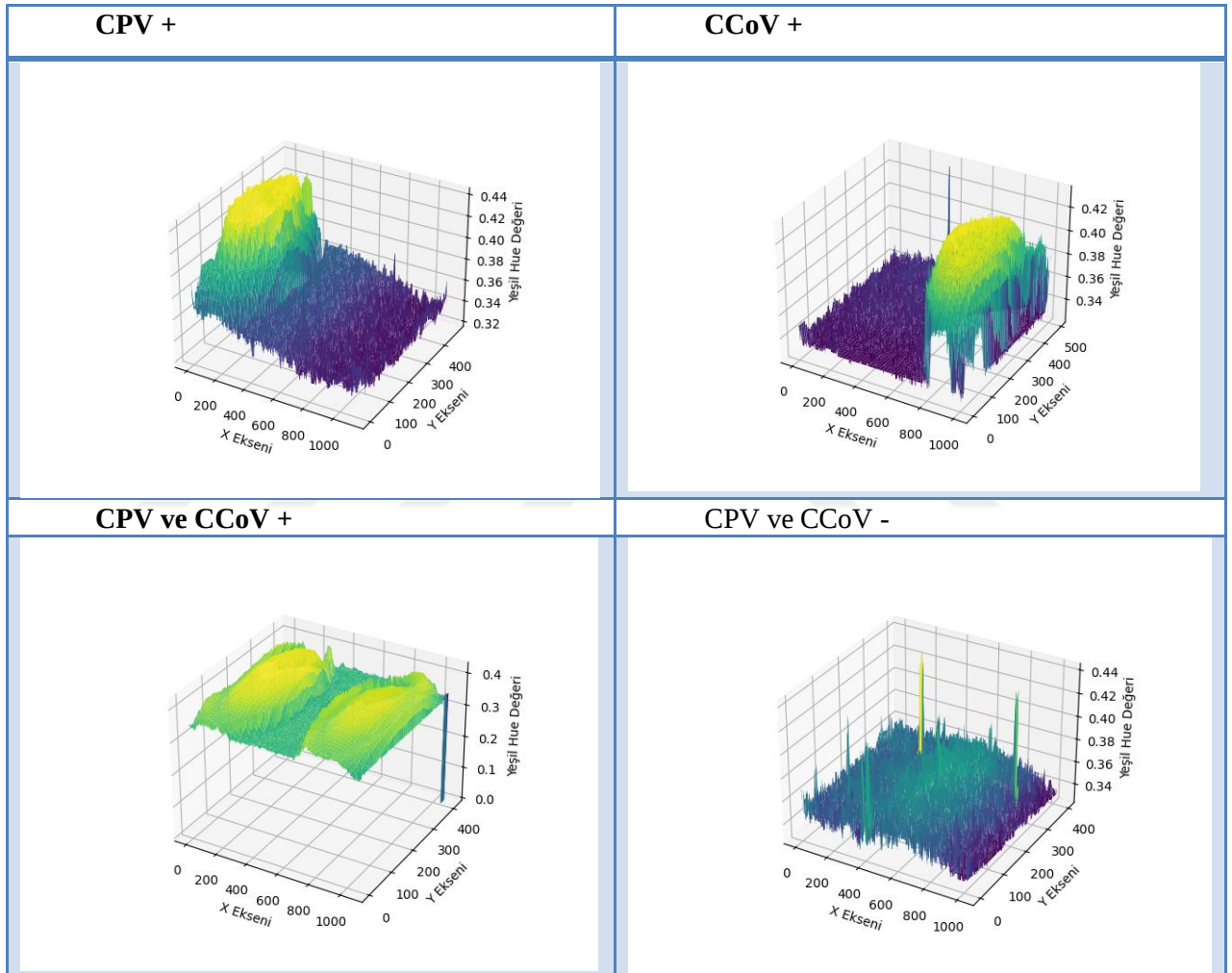


Şekil 3.10 CCoV için yapılan titre optimizasyon çalışmasından elde edilen hue değerlerini gösteren grafik görülmektedir.

Elde edilen veriler kullanılarak ortak inkübasyon zamanı olan 30dk içerisinde mikroskop okülerinde gözle ve çoğu kullanıcının sahip olabileceği yaygın mikroskop kamerası modelleri ile görüntüleme yapılabilecek antikor ve konjugat titrelerinin belirlenmesi için math kütüphanesini kullanan pyton tabanlı yazılan bir kod ile matematiksel hesaplama yapılarak Nikon n-elements yazılımından elde edilen optimum G (green) kodu olan (Adobe RGB) 120 değerini sağlayacak ortak bir titre hesabı yapıldı. Bu hesaplama göre CPV için optimum antikor titresi 1/1 (1mg/ml) ve optimum konjugat titresi 1/40 iken CCoV için optimum antikor titresi 1/1 (1mg/ml) ve optimum konjugat titresi 1/20 olarak hesaplandı. Bu titrelerde hazırlanan pleyt ve konjugat karışımı ile elde edilen sonuçlar herkes tarafından anlaşılabilir şekilde görüntülenebildi (Şekil 3.11 ışın izlemeli denoising işlemi uygulanmış) ve 3 farklı gözlemcinin rastgele değerlendirmesinde %100 tutarlı sonuç gösterdi.



Şekil 3.11 optimize titrelerde elde edilen test sonuçları gösterilmektedir. (1 CPV+/CCoV +, 2 CPV+/CCoV-, 3 CPV-/CCoV+, 4 CPV-/CCoV-)



Tablo 3.13 Şekil 3.10’da gösterilen fotoğrafların pyton ortamında oluşturulan 3D hue grafikleri gösterilmektedir.

Tablo 3.13’de gösterilen veriler, optimize edilmiş ve yazılımsal olarak temizlenmiş fotoğraflar kullanılarak elde edildi. Bu grafiklerden hassas bir hue ortalaması ve piksel koordinatlarına göre FITC floresansının odak noktaları belirlenerek ışın izlemeden arta kalan bazı ektopik floresans odakları (toz, sıvı vb.) görüntüden ayrıştırıldı. Bu yöntem

ile gerçek dünya testlerinde alınacak olan ham görüntülerin de işlenebilirliği için kod (Şekil 3.13) üzerinde bazı değişiklikler yapılarak daha etkin bir kanal filtreleme sağlayacak ve piksel koordinatı bazında hata düzeltme işlemlerinde yapabilecek hale getirildi. Ancak tek bir girdideki piksel sayısı (5 milyon piksel) ile ortaya çıkan ham verinin işlenmesi için gereken sistem arabelleği 64GB sınırını aştı. Bu durumun giderilmesi için iterasyon bazlı hesaplama yapmak üzere GPU çekirdeklerinden faydalanan ve OpenCV kütüphanesi tabanlı bir eklenti paketi yazılarak işlemin grafik kartında gerçekleştirilmesi sağlandı. Ancak bu teknik çok fazla sistem kaynağı tükettiği için rutin işlemlerde kullanımının pratik olmadığına, yalnızca optimizasyon çalışmalarında kullanımının etkin fayda sağlayacağına karar verildi.

```
siyahsız > ...
1 import numpy as np
2 import matplotlib.pyplot as plt
3 from PIL import Image
4
5 # Girdi
6 image_path = '555.jpg'
7 image = Image.open(image_path)
8 width, height = image.size
9
10 # HSV renk uzayı
11 hsv_image = image.convert('HSV')
12
13 # Hue (ton) verilerini
14 hue_data = np.array(hsv_image)[:, :, 0]
15
16 # Siyah pikseller
17 black_mask = hue_data != 0
18
19 # maske
20 green_mask = np.logical_and(hue_data >= 60, hue_data <= 180)
21
22 # yeşil piksel (siyah pikseller hariç)
23 green_pixels = np.zeros_like(hue_data)
24 green_pixels[green_mask] = hue_data[green_mask]
25
26 # Üç boyutlu grid
```

Şekil 3.13 3D grafiklerin çizimi için kullanılan kodun örnek görüntüsü

Optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra elde edilen veriler toplu halde değerlendirildi ve hem test kitinin üretimi hemde kullanımı için optimum parametreler elde edildi. Son kullanıcının sahip olması muhtemel ekipmanlar ile testin sağlıklı bir şekilde çalışabilmesi ve uygulanabilir olması açısından özellikle yakalayıcı antikor titrelerinin %5 fazlasının kullanılması ve yine son kullanıcının test sonuçlarını görüntülerken ışın izlemeli denoising yapacak donanıma sahip olmayabileceği göz önüne alınarak floresansın yoğunlaştırılması için konjugat titrelerinin de %5 oranında artırılmasına karar verildi.

Testin uygulanabilmesi için gereken asgari laboratuvar şartları;

- Doğrudan güneş ışığına maruz kalmayan, mümkünse karanlık bir ortam sağlanması
- 50-100-200µl hacimlerde otomatik pipetlerin ve uygun steril tiplerin bulundurulması
- FLO470 veya eşdeğer epilüminesans tipi floresans mikroskobu bulundurulması olarak belirlenmiştir.

Test kitinin üretimi sırasında gereken asgari laboratuvar şartları;

- Tam karanlık, güneş ışığı izolasyonu yapılmış, doğrusal rehber beyaz led aydınlatma ve konjugatı korumak için kırmızı led aydınlatma şartlarının sağlanması
- Tüm çalışma yüzeyleri, malzeme, alet ve ekipmanın dezenfekte edilmesi, mikropleyt ile teması olacak her türlü malzemenin steril edilmesi
- Ortamın tozdan arındırılması, gerekli bölgelere steril örtüler örtülerek toz kalkmasının önüne geçilmesi
- Ortam havasının hava temizleyici cihaz ve/veya hepa filtreli havalandırma sistemi ile toz ve mikroorganizmalardan arındırılması
- Tüm operatörlerin laboratuvara girmeden önce cerrahi hassasiyette temizlenmesi ve steril koruyucu ekipmanlar kullanması
- Özellikle antikor kaplamaları sırasında laboratuvarın giriş ve çıkışlarının kapatılması, sıradışı hava akımı oluşturulmaması olarak belirlenmiştir.

Optimizasyon çalışmalarının sonuçları dikkate alınarak hazırlanan, son kullanıcıya yönelik kitin içeriği ve muhteviyatı tablo 3.13'te verilmiştir.

Testin uygulama aşamaları şu şekildedir;

- ✓ Örnekleri PBS ile 1/10 oranında sulandır ve katı partikülleri uzaklaştır
- ✓ Her göze 50µl örnek ekle, pozitif ve negatif kontrol gözlerine 50µl kontrol ekle
- ✓ Mikropleyti kilitli paket içerisinde 37C° de 30 dakika inkübe et
- ✓ 300µl 1x yıkama tamponu ile 3 sefer yıka
- ✓ Her göze 50µl konjugat ekle (1x hacimde konjugat 1 ve 1x konjugat 2'yi 2x hacimde konjugat sulandırma tamponu ile karıştır)
- ✓ Mikropleyti kilitli paket içerisinde 37C° de 30 dakika inkübe et
- ✓ 300µl 1x FA yıkama tamponu ile 3 sefer yıka

- ✓ Mikropleyti havada kurut ve floresans mikroskobunda görüntüleme yap
Testin başından sonuna kadar harcanan süre;
- Örneklerin sulandırılması 20dk
- Örneklerin pleyte yüklenmesi 5dk
- Örneklerin inkübasyonu 30dk
- Pleytin yıkanması 5dk
- Konjugatın pleyte yüklenmesi 5dk
- Konjugatın inkübasyonu 30dk
- Pleytin yıkanması 5dk
- Pleytin kuruması 5dk

Toplam 105 dakika olarak belirlendi. Örneklerin hazırlanması ve pleytin kuruması işlemi ana protokolden çıkarıldığı takdirde testin uygulanma süresinin 80 dakika olduğu dikkati çekti.

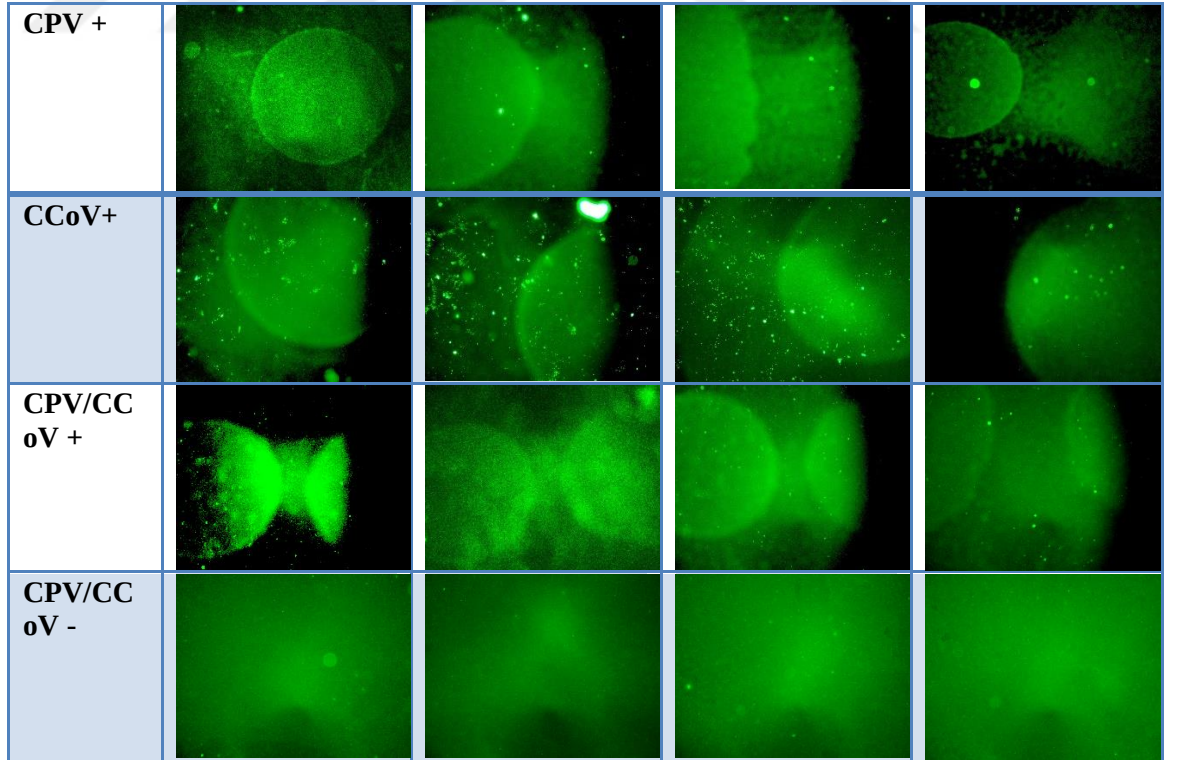
No	Bileşen	Kullanım Amacı	İçeriği
1	96 Gözlü Mikropleyt	Testin Solid Fazı	CPV ve CCoV yakalayıcı antikorları ile kaplanmış ve BSA ile bloklanmış, paketli
2	Örnek Sulandırma Tamponu	Örneklerin Sulandırılması	Standart PBS çözeltisi, filtre edilmiş
3	Konjugat 1	CPV'nin floresan işaretleme konjugatı	Anti-CPV FITC konjugat, 1/10 titrede
4	Konjugat 2	CCoV'un floresan işaretleme konjugatı	Anti-CCoV FITC konjugat, 1/5 titrede
5	Konjugat Sulandırma Tamponu	Konjugat karışımının hazırlanması	%0.09 Sodyum Azid
6	Yıkama Tamponu 100X	Örnek inkübasyonundan sonra yıkama işleminin yapılması	PBS içerisinde %1 Tween20
7	FA Yıkama Tamponu	Konjugat inkübasyonundan sonra yıkama işleminin yapılması	1 lt. Distile su içerisinde Sodyum Karbonat 11.4gr, Sodyum Bikarbonat 33.6gr, Sodyum Klorür 8.5gr pH 9.0
8	Pozitif Kontrol	Test Doğrulaması	PBS içerisinde hem CPV hemde CCoV yönünden pozitif olan stok süspansiyon
9	Negatif Kontrol	Test Doğrulaması	PBS içerisinde hem CPV hemde CCoV yönünden negatif olan stok süspansiyon

Tablo 3.14 Son kullanıcıya yönelik test kitinin içeriği ve muhteviyatı

3.5. Gerçek dünya testleri

Optimizasyon çalışmalarının tamamlanması ile birlikte MIFADA test kiti kullanıma hazır hale gelmiş oldu. Asgari gereklilikleri karşılayan bir laboratuvarında, test kitinin kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi için yapılan testlerde, 1 hafta ile 6 ay arasında -20C° sıcaklıkta dondurulmuş halde saklanan dışkı numuneleri kullanıldı ve herhangi bir özel aydınlatma düzeneği kurulmadı.

Koleksiyon içerisinde rastgele 100 örnek seçilerek 2 farklı eppendorf tüpü içerisinde sulandırma yapıldı ve operatörün kör şekilde çalışması için örnekler ikincil bir numaralandırma yapılarak kaydedildi. Toplamda her biri benzersiz bir numara ile numaralandırılmış ve aynı örneğin 2 sefer farklı numaralar ile tekrar ettiği 200 örnek elde edildi. Testler tamamlandı sonuçlar liste halinde yazılncaya kadar örneklerin gerçek pozitiflik durumları operatörden gizli tutuldu. Bu testlerde kullanılmak üzere 10 adet kit hazırlandı. Optimizasyon çalışmalarında elde edilen protokol uygulanarak gerçekleştirilen testler herhangi bir özel işleme tabi tutulmadan elde edilen ham görüntüler (Tablo 3.14) üzerinden değerlendirilerek liste halinde kaydedildi ve RT-PCR ile belirlenen gerçek pozitiflik durumları ile karşılaştırıldı (tablo 3.15).



Tablo 3.15 Gerçek dünya testlerinden elde edilen görüntü örnekleri

Çalışma sırasında sonuçlar değerlendirilirken bir takım hatalı yorumlamaların yapıldığı farkedildi. Bu hatalı yorumlamaların büyük çoğunluğunun sebebinin mikroskop alanının yanlış kadrajlanması olduğu ortaya çıktı. Floresans mikroskobunun en düşük büyütme oranı olan 4X objektif ve 10X oküler büyütme katsayısı olan 40X büyütmede göz ile yapılan incelemede mikrolept gözünün tamamı kadrage girmektedir. Ancak kamera ile yapılan görüntüleme sırasında kamera bağlantı tüpünün 0.5X katsayısı ve kameranın prizmaya olan uzaklığı ile sensör düzeltme amacıyla uygulanan crop (kırpma) oranları devreye girdiğinde kadraj büyük oranda kaybedilmektedir. Bu durum gözün tamamının kamerada görüntülenmesine engel olmakta ve sonuçların yorumlanmasını zorlaştırmaktadır. Daha düşük büyütme oranına sahip bir floresans mikroskobu kullanılarak daha doğru sonuçlar alınabileceği ancak teknik imkanlar dahilinde görüntüleme tekrarına gidilmesi yolu ile sonuçların kaydedilmesine karar verildi.

Gerçek dünya testlerinde amaç MIFADA testinin genel amacı olan kısa sürede çoklu teşhisin gerçekleştirilmesi olduğundan, görüntüleme sonrası ışın izlemeli denoising işlemi yapılmadan sonuçların değerlendirilmesi hedeflendi. Gerek mikroskop okülerinde göz ile muayenede, gerekse de mikroskop kamerası ile yapılan muayenede sonuçlar 4 farklı gözlemci için de benzer şekilde yorumlandı. Bu durum, teknik imkanları kısıtlı laboratuvarlarda dahi testin uygulanabileceğini, herhangi bir yazılım desteği olmadan sonuç alınabileceğini gösterdi. Dolayısıyla testin herkes tarafından kullanılabileceğine karar verildi.

Örnek	Rt-PCR	MIFADA	Örnek	Rt-PCR	MIFADA	Örnek	Rt-PCR	MIFADA	Örnek	Rt-PCR	MIFADA
1	-/-	-/-	51	+/-	+/-	101	-/-	-/-	151	-/-	-/-
2	+/+	+/+	52	-/-	-/-	102	+/-	+/-	152	+/-	+/-
3	+/+	+/+	53	-/-	-/-	103	+/-	+/-	153	+/-	+/-
4	+/-	+/-	54	+/-	+/-	104	-/-	-/-	154	+/-	+/-
5	+/+	+/+	55	+/+	+/+	105	+/-	+/-	155	+/-	+/-
6	-/-	-/-	56	+/-	+/-	106	-/-	-/-	156	-/-	-/-
7	-/-	-/-	57	-/-	-/-	107	-/-	-/-	157	-/+	-/+
8	+/-	+/-	58	+/+	+/+	108	-/-	-/-	158	-/+	-/+
9	+/-	+/-	59	+/+	+/+	109	-/+	-/+	159	-/-	-/-
10	-/-	-/-	60	+/+	+/+	110	-/+	-/+	160	-/+	-/+
11	-/-	-/-	61	-/-	-/-	111	-/+	-/+	161	+/+	+/+
12	-/+	-/+	62	+/+	+/+	112	+/-	+/-	162	+/+	+/+
13	+/-	+/-	63	+/+	+/+	113	+/+	+/+	163	-/+	-/+
14	+/+	+/+	64	+/-	+/-	114	+/-	+/-	164	-/+	-/+
15	+/+	+/+	65	+/+	+/+	115	+/-	+/-	165	-/-	-/-
16	+/-	+/-	66	+/-	+/-	116	+/-	+/-	166	-/+	-/+
17	+/-	+/-	67	+/+	+/+	117	+/-	+/-	167	-/+	-/+
18	-/-	-/-	68	+/+	+/+	118	-/+	-/+	168	-/+	-/+
19	-/-	-/-	69	+/+	+/+	119	-/+	-/+	169	+/+	+/+
20	+/+	+/+	70	+/-	+/-	120	+/+	+/+	170	-/+	-/+
21	-/-	-/-	71	+/-	+/-	121	-/-	-/-	171	+/-	+/-
22	+/+	+/+	72	+/-	+/-	122	+/-	+/-	172	-/+	-/+
23	-/-	-/-	73	-/+	-/+	123	-/+	-/+	173	-/+	-/+
24	-/-	-/-	74	+/+	+/+	124	-/-	-/-	174	-/+	-/+
25	-/-	-/-	75	+/+	+/+	125	+/+	+/+	175	-/-	-/-
26	-/-	-/-	76	-/+	-/+	126	+/-	+/-	176	-/+	-/+
27	-/-	-/-	77	-/+	-/+	127	+/-	+/-	177	-/+	-/+
28	+/-	+/-	78	-/-	-/-	128	-/-	-/-	178	-/+	-/+
29	+/-	+/-	79	-/+	-/+	129	-/+	-/+	179	-/+	-/+
30	-/-	-/-	80	-/-	-/-	130	-/+	-/+	180	+/-	+/-
31	+/+	+/+	81	+/-	+/-	131	+/-	+/-	181	+/+	+/+
32	-/-	-/-	82	+/-	+/-	132	-/+	-/+	182	+/+	+/+
33	+/+	+/+	83	+/+	+/+	133	-/+	-/+	183	-/+	-/+
34	-/-	-/-	84	+/+	+/+	134	+/-	+/-	184	+/-	+/-
35	+/-	+/-	85	+/+	+/+	135	+/+	+/+	185	-/+	-/+
36	+/-	+/-	86	+/+	+/+	136	-/+	-/+	186	+/-	+/-
37	-/-	-/-	87	+/+	+/+	137	+/+	+/+	187	+/-	+/-
38	+/-	+/-	88	-/+	-/+	138	+/-	+/-	188	+/-	+/-
39	-/-	-/-	89	+/-	+/-	139	+/-	+/-	189	-/-	-/-
40	-/-	-/-	90	-/+	-/+	140	+/+	+/+	190	-/+	-/+
41	+/+	+/+	91	+/+	+/+	141	+/-	+/-	191	-/+	-/+
42	-/+	-/+	92	-/+	-/+	142	+/+	+/+	192	+/+	+/+
43	+/-	+/-	93	-/+	-/+	143	+/+	+/+	193	+/-	+/-
44	+/+	+/+	94	+/+	+/+	144	+/-	+/-	194	-/+	-/+
45	+/+	+/+	95	-/+	-/+	145	+/+	+/+	195	-/-	-/-
46	-/-	-/-	96	-/+	-/+	146	-/+	-/+	196	-/+	-/+
47	+/+	+/+	97	-/-	-/-	147	-/+	-/+	197	-/-	-/-
48	+/+	+/+	98	-/+	-/+	148	-/+	-/+	198	+/-	+/-
49	+/-	+/-	99	-/+	-/+	149	+/+	+/+	199	+/+	+/+
50	+/+	+/+	100	-/+	-/+	150	+/+	+/+	200	-/-	-/-

Tablo 3.16 Gerçek dünya testi RT-PCR ve MIFADA sonuçları gösterilmektedir. Hatalı sonuçlar kırmızı ile işaretlenmiştir. (CPV/CCOV)

Daha önceden hazırlanan 960 göz ile yapılan denemelerde RT-PCR ile karşılaştırıldığında MIFADA testinin her 100 örneğin 94'ünü hem CPV hemde CCoV yönünden doğru teşhis ettiği, Hatalı pozitiflik oranının %1'den küçük, hatalı negatiflik oranının %4, değerlendirilemeyen sonuç oranının ise %1 olduğu görüldü. Aynı pleytler yazılımsal olarak değerlendirildiğinde de benzer sonuçlara ulaşıldı.

Sensitivite (duyarlılık): gerçek pozitif sonuçların toplam pozitif vakalara yüzdesi olarak ifade edilen testin doğru pozitif sonuç verme yeteneğini ölçer. Sensitivite aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$\text{Sensitivite} = (\text{Gerçek Pozitif} / (\text{Gerçek Pozitif} + \text{Yanlış Negatif})) * 100$$

$$\text{Gerçek pozitif sayısı} = 94 \text{ (CPV ve CCoV doğru teşhisi)}$$

$$\text{Yanlış negatif sayısı} = 100 - 94 = 6 \text{ (doğru teşhis edilemeyenler)}$$

$$\text{Sensitivite} = (94 / (94 + 6)) * 100 = (94 / 100) * 100 = 94\%$$

Spesifite (özgüllük): gerçek negatif sonuçların toplam negatif vakaların yüzdesi olarak ifade edilen testin doğru negatif sonuç verme yeteneğini ölçer. Spesifite aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$\text{Spesifite} = (\text{Gerçek Negatif} / (\text{Gerçek Negatif} + \text{Yanlış Pozitif})) * 100$$

Hatalı pozitiflik oranı %1'den küçüktür, bu nedenle yanlış pozitif sayısı ihmal edilebilir.

$$\text{Spesifite} = (\text{Gerçek Negatif} / (\text{Gerçek Negatif} + 0)) * 100 = (\text{Gerçek Negatif} / \text{Gerçek Negatif}) * 100 = 100\%$$

Bu durumda, MIFADA testinin sensitivitesi %94 ve spesifitesi %100 olarak hesaplanmıştır.

4. TARTIŞMA

4.1. Bulguların Anlamı ve Yorumlanması

Bu çalışma boyunca elde edilen veriler sağlık, fizik ve mühendislik alanlarında yapılan bir çok çalışma ve gerçekleştirilen bir çok buluş sayesinde ortaya konulmuştur. Bu çalışma, farklı bilimsel disiplinler arasında organik bir işbirliği gerektiren karmaşık sorunlara yönelik derinlemesine etkileşim ve çözüm odaklı bir metodolojiyi benimsemiştir.

Fotoğrafçılık teknolojisinin sunduğu yüksek çözünürlüklü görüntüleme ve detaylı analiz araçları, virusların genetik yapısı, evrimi ve davranışları üzerine geniş bir bilgi birikimine sahip viroloji bilimi, bilgisayar programcılığının karmaşık veri setlerini analiz etme ve modelleme yetenekleri ve doğadaki olayların temelindeki prensipleri inceleyen fizik kanunlarını inceleyen fizik bilimi bir araya geldiğinde, bilim dünyasında daha önce benzeri görülmemiş bir sinerji ve ilerleme potansiyeli ortaya çıkabilir.

Bu disiplinler arası yaklaşım, her bir bilimsel disiplinin kendi başına ele almasının zor olduğu veya yetersiz kaldığı sorunlara odaklanma kapasitesini arttırarak, bilimde çığır açıcı sonuçlara ulaşma imkanı sunabilir. Örneğin, bir virologun virusların genetik özellikleri konusundaki bilgisi, bir bilgisayar programcısının analitik becerileriyle birleştiğinde, virusların evrimi ve adaptasyonu gibi karmaşık süreçlerin daha iyi anlaşılmasını mümkün kılabilir. Aynı zamanda, fotoğrafçılık teknolojisinin sunduğu görüntüleme araçları, bir virologun laboratuvar çalışmalarını destekleyerek, virusların yapısal özelliklerine daha derinlemesine bir bakış açısı kazandırabilir.

Bu çalışma, disiplinler arası işbirliğinin sadece belirli bir sorunu çözmekle kalmayıp aynı zamanda yeni keşiflere de kapı açabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, modern bilimde, bilimsel disiplinler arasındaki bu entegre yaklaşımın önemi giderek artmaktadır. Her bir bilim dalının kendi uzmanlık alanındaki sınırlamaları aşarak, ortak bir anlayış ve perspektif geliştirilerek, bilimsel araştırmalarda daha kapsamlı ve etkili sonuçlara ulaşma potansiyeli ortaya çıkmaktadır.

Bu bağlamda çalışma boyunca elde edilmiş verilerin anlamlandırılması ve yorumlanması noktasında yine multidisipliner bir görüş hakim olmuştur. Geleneksel test yöntemlerinde çoğunlukla görsel işaretler belirleyici rol oynar. Lateral flow immunassay tekniğinde test ve kontrol bandlarında oluşan sinyaller veya IFAT tekniğinde floresansın

gözle görülmesi buna bir örnektir (Pedras ve ark 2008, Anna ve ark 2019). Gelişen teknolojinin teşhis biliminde kullanılmaya başlanması ile test sonuçları da matematiksel değerler haline almaya başlamıştır. Yaygın olarak kullanılan ELISA tekniğindeki optik dansite veya RT-PCR tekniğindeki floresans sinyallerinin dijital olarak yorumlanması buna bir örnektir (Richards ve ark 2003, Wu ve ark 2014).

Dijital yorumlama yöntemlerinin teşhis biliminde şüphesiz ki çok önemli bir yeri vardır. Ancak bilgisayar algoritmalarının kesincil bir çalışma prensibi olduğundan yorum yapmaya kapalıdır ve değerlendirmesi gereken bilgi kesin ayrımlarla yazılmış olmalıdır. Bir mikropleyt okuyucu cihaz ile ELISA sonuçları değerlendirilirken cihazın işlemci birimi mikropleyte gönderilen ışık miktarı ile optik sensöre ulaşan ışık miktarını karşılaştırarak mikropleyt gözünde bulunan sıvının optik absorbansını hesaplar ve 0 ile 4 arasında bir değer olarak çıktı birimine ulaştırır. Bu teknoloji uzun yıllardan beri teşhis biliminde kullanılmaktadır ve oldukça güvenilirdir (INNO Corp.). Ancak bu teknik, bu çalışmada geliştirilen MIFADA'da kullanılabilir nitelikte değildir.

MIFADA testinin yorumlanmasında yalnızca floresansın varlığı veya bir ışık sensörüne düşen ışığın oluşturduğu elektriksel sinyalin varlığının değerlendirilmesi yeterli değildir. Çok bölgeli kaplama ile birden fazla virusun tespit edilmesi için çok daha karmaşık işlemlere gerek duyulur. Bu noktada standart sensörlerden faydalanılamayacağından dolayı görüntü işleme ve makine öğrenmesi teknolojilerine ihtiyaç duyulmuştur. Dünya çapında renkli ekran ve dijital materyallerin neredeyse tamamında kullanılan, en yaygın şekilde kabul görmüş renk matriksi Adobe RGB'dir. Bu renk matriksi, dijital olarak gösterilen her bir pikselin tam rengini kırmızı, yeşil ve mavi tonlarının hangi oranda karıştırıldığını belirterek belirler. Bu üç rengin her birisi bir renk kanalı olarak tanımlanır ve 255 farklı tona bölünür. Her bir kanalın adı ve renk tonu yan yana yazılarak bir renk ismi oluşturulur ve o renk, görüntüleme yapılan monitörün özellikleri gözetilmeksizin universal olarak standardize edilmiş olur. Her kanaldaki renk sayılarının kombinasyonları $255 \times 255 \times 255$ formülü ile hesaplanır ve 16.581.375 benzersiz rengi tanımlar (Adobe 2005).

MIFADA testinin sonuçlarının bilgisayar ortamında yorumlanmasında da bu renk matriksi kullanılmıştır. Mikroskop kamerası ile alınan görüntüler, ışın izlemeli denoising işlemi sonrasında dijital olarak filtrelenmiş ve yeşil kanal renk kodlarını baz alıp yeşil kanal katkısı olmaksızın oluşmuş diğer tüm renkleri susturarak matematiksel veriler

kaydeden bir algoritma kullanılmıştır. Sonuç olarak bu algoritma FITC kaynaklı oluşan floresansı yansıma ışık, ektojik floresans veya sekonder saçılım ışıklarından ayırt etmiş ve verilerin en doğru şekilde tanımlanması için renk kodu tabanlı bu değerlendirmeyi kullanmıştır. Ancak MIFADA’da birden fazla floresans odağının beraber takibi gerektiğinden bu algoritma tek başına yetersiz kalmış ve birden fazla odaktan alınan verinin beraber takibi için makine öğrenmesi ve ışın izleme yöntemlerinin beraber kullanılması ile yazılmış ikincil bir özgün programa da ihtiyaç duymuştur.

Prototip aşamasında olan bu test yönteminin geliştirilmesinde bu tür bilgisayar destekli uygulamaların kullanılması ile daha kesin veriler elde edilmiş ve insan göreceliliği ve insan hatası gibi optimizasyon açısından olumsuzluk oluşturabilecek durumlardan kaçınılmıştır. Ancak son kullanıcının bütün bu dijital işlemlere ihtiyaç duymadan sonuçları değerlendirebilmesi de gerekmektedir. Bu sebeple yapılan optimizasyon çalışmalarında tespit edilen yakalayıcı antikor ve konjugat titrelerinin üzerinde titreler kullanılmış ve test sonuçlarının floresans mikroskopunda göz ile kolayca değerlendirilmesi sağlanmıştır. İnsan değerlendirmesinde baz “alınan floresans odaklarının varlığı ve yönü” parametresi, bilgisayar değerlendirmesinde baz alınan “G120-G175 hue değerindeki piksellerin varlığı, kümeleşmesi ve 2D matriksteki yeri” parametreleri temelde aynı bilgiyi vermekte ve aynı sonucu işaret etmektedir. Bu noktada test sonuçlarının yorumlanmasında yalnızca bilgisayar temelli değerlendirmeler değil insan değerlendirmelerinin de kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

4.2. Test Kitinin Klinik Uygulamalardaki Potansiyeli

Günümüzde viral teşhis yöntemleri, genellikle özel ekipman ve cihazlar gerektiren karmaşık prosedürler içermektedir. Bu yöntemlerin uygulanabilirliği genellikle düşük olabilir, çünkü bu ekipmanlar genellikle yüksek maliyetlidir ve uzmanlık gerektirir (Harith ve ark 1987, Decaro ve ark 2004, Boonham ve ark 2014). Bu durum, özellikle gelişmekte olan ülkelerde sağlık hizmetlerine erişimde ve yaygın kullanımda önemli engeller oluşturabilir.

Örneğin PCR, viral genomları çoğaltmak ve belirli bir virüsü tespit etmek için yaygın olarak kullanılan bir moleküler biyoloji yöntemidir. Ancak, bu yöntemin uygulanabilirliği, pahalı ekipmanların yanı sıra eğitilmiş personel gerektirmesinden dolayı sınırlı olabilir. Ayrıca, PCR'nin uzun süreçleri ve karmaşıklığı, teşhis sürecini

yavaşlatabilir. (Senda ve ark 1995, Koutna ve ark 2003, Mekuria ve ark 2003) Benzer şekilde ELISA, antikorlar aracılığıyla virus varlığını tespit etmek için kullanılan bir immünolojik yöntemdir. Ancak, bu yöntem genellikle özel ekipmanlar ve kontrollü laboratuvar ortamları gerektirir (Engvall ve ark 1972, Litster ve ark 2012). Özellikle sahadaki sağlık tesislerinde kullanımı zorlaşabilir.

Viral enfeksiyonları teşhis etmek için kullanılan serolojik testler, genellikle belirli antikorları tespit etmek amacıyla yapılır (Martinez ve ark 2020 Yadav ve ark 2022). Ancak, bu testlerin doğruluğu ve güvenilirliği, virusun tipine ve bireysel faktörlere bağlı olarak değişebilir. Ayrıca, bu testlerin yaygın kullanımı için eğitimli personel ve laboratuvar olanakları gerekebilir. Antijen hızlı testler, virusun varlığını belirlemek için spesifik antijenleri tespit eden hızlı ve taşınabilir testlerdir. Ancak, bu testlerin hassasiyeti genellikle PCR gibi yöntemlere göre daha düşüktür ve belirli bir virus türünü tespit etme yetenekleri sınırlı olabilir (Anna ve ark 2019, Martinez ve ark 2020)

Elektron mikroskobu veya floresan mikroskopisi gibi mikroskopi tabanlı yöntemler, virusları gözlemlemek ve teşhis etmek için kullanılabilir (Deerinck ve ark 1994, Gari ve ark 2008). Ancak, bu tür ekipmanlar genellikle yüksek maliyetlidir ve uzmanlık gerektirir, bu da onların geniş çapta kullanılabilirliğini sınırlar.

Sonuç olarak, viral teşhis yöntemlerinin uygulanabilirliği, özel ekipmanlara ve uzman personelin varlığına bağlı olarak değişebilir. Bu durum, özellikle düşük gelirli bölgelerde ve acil durumlarda, hızlı ve etkili teşhisin zorluğuna neden olabilir. Bu sorunların çözümü, daha taşınabilir, uygun maliyetli ve basit kullanımlı teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi olabilir. Bu çalışmada geliştirilen MIFADA tekniği ise gerek üretim maliyetinin düşük oluşu gerekse de uygulamasının hızlı ve kolay oluşu ile kısıtlı eğitim almış kişilerce bile kullanılabilir. Böylece MIFADA'nın, özellikle COVID pandemisi gibi acil durumlarda veya rutin sürü taramalarında kısıtlı miktarda örnek ile aynı anda birden çok parametreyi/antijeni/antikoru teşhis edebilmesi ile ön plana çıkabileceği düşünülmektedir.

Devlet işletmeleri ve özel işletmelerde bulunan hayvanlara özellikle ihbarı zorunlu hastalıklar (Resmi Gazete 2011) yönünden her sene sürü taraması yapıldığı düşünülürse bu durum daha iyi anlaşılır. Bir hayvanın 6 farklı hastalığı taşıyıp taşımadığının anlaşılması için en iyi ihtimalle 6 farklı ELISA yapılmaktadır. ELISA'nın maliyeti,

uygulama süresi ve harcanan iş gücü hesaplandığında, 6 bölgeli olarak hazırlanmış bir MIFADA testinin kullanılmasının maliyet olarak çok daha ucuz olduğu ve ELISA ile kıyaslandığında 6 kat daha az iş gücü ve zaman gerektirdiği görülmektedir. Bu durum tam zamanlı olarak teşhis yapan bir laboratuvarın bir haftalık mesai ile ulaştığı işlem hacmine bir günde ulaşabilmesi anlamına gelir.

Birden fazla hastalığın birlikte hızlı teşhisi için RT-PCR analizleri de kullanılabilir. Aynı pleyt üzerinde farklı test setupları hazırlanarak yürütülen veya aynı göz içerisinde birden fazla primer-prob takımının kullanılması ile yürütülen multiplex PCR metodları mevcuttur (Pfeffer ve ark 2002, Koutna ve ark 2003, Lam ve ark 2007). Ancak bu metodların maliyet açısından çok pahalı olması, özel laboratuvar imkanları gerektirmesi, nükleik asit ekstraksiyonu ve bir çok virusta cDNA sentezi gerektirmesi ve yalnızca uzman personel tarafından uygulanabilirliği gibi bir çok dezavantajı bulunmaktadır. Ayrıca çok fazla işlem basamağının bulunması, çok fazla hata yapma potansiyeli yaratmakta ve gerçekleşen hatanın kaynağının tespit edilmesindeki zorluk sebebiyle uygulayıcıya çok fazla zaman kaybettirmektedir. Bütün bu sebeplerden dolayı viral teşhiste PCR yöntemlerinin kullanımı konvansiyonel PCR ve Real Time PCR metodları ile tek bir virusun varlığını aramaya yönelmiştir. Bu noktada RT-PCR ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek bir sensitivite (%94) ve spesifite (%100) göstermiş olan MIFADA tekniğinin kullanılabilirliği ve uygulama potansiyeli ön plana çıkmaktadır.

Tavakoli ve arkadaşları (2017) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, influenza H1N1 virus antikorlarının tespiti için ELISA tabanlı mikronötralizasyon (microNT-ELISA) ve geleneksel HI testlerinin sensitivite ve spesifiteleri karşılaştırılmıştır. Mikronötralizasyon ELISA testinin yüksek sensitivite (%87) ve spesifite (%73) oranları, altın standart test sonuçlarına yakın bir performans göstermiştir. Bu bulgular, mikronötralizasyon ELISA'nın influenza H1N1 virüs antikorlarının tespiti için güvenilir bir yöntem olabileceğini desteklemektedir. Sensitivite ve spesifite değerleri açısından MIFADA tekniği ile karşılaştırma yapıldığında daha yüksek sensitivite (%94) ve spesifite (%100) değeri elde edildiği görülmektedir. Her ne kadar teşhis hedefleri farklı olsa da microNT-ELISA tekniğine kıyasla MIFADA testi daha yüksek başarımlar göstermiştir.

Richards ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan çalışmada, ELISA'nın performansını gastroenterit salgınlarına karışan hastalardan alınan gaita örneklerinin sonuçlarını elektron mikroskobu ve reverse transkripsiyon PCR (Rt-PCR) ile karşılaştırılmıştır. ELISA'nın sensitivitesi ve spesifitesi sırasıyla %55.5 ve %98.3 olarak

bulunmuştur. Bu sonuçlar, elektron mikroskopunun sensitivitesi ve spesifitesi ile karşılaştırıldığında (%23.9 ve %99.2), ELISA'nın daha yüksek performansa sahip olduğu dikkati çekmiştir. Farklı test tekniklerinin, farklı özellikleri ile öne çıktığını ve diğer teknikler ile karşılaştırıldığında avantajları ve dezavantajları olduğunu gösteren bu çalışmanın sonuçları incelendiğinde MIFADA tekniğinin de özellikle yüksek spesifite değerine sahip olması ile tanısal doğrulukta ön plana çıktığı anlaşılmaktadır. Bu bulgular, MIFADA'nın klinik kullanımında ve hastalık kontrolü çabalarında etkili bir araç olarak potansiyelini vurgulamaktadır.

Litster ve arkadaşları (2012), Canine Parvovirus ve Canine Distemper Virus serum antikorlarını tespit etmek için kullanılan ELISA kitinin tanısal doğruluğuna odaklanmıştır. Lister ve arkadaşlarına göre, test kitinin saha koşullarında doğru sonuçlar verdiği görülmüştür (CPV: sensitivite %92.3, spesifite %93.5; CDV: sensitivite %75.7, spesifite %91.8). Litster ve arkadaşlarının çalışmasıyla kıyaslandığında, MIFADA tekniği ile elde edilen sensitivite ve spesifite değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuç uygun yakalayıcı antikorlar ile hazırlanacak olan MIFADA testi ile CPV ve CDV antikorlarını tespit edilmesinin potansiyel etkinliğini güçlendirmektedir.

Bu çalışmada geliştirilmiş olan MIFADA tekniğinin sonuçlarının görüntülenmesinde baz alınan yöntem, floresans varlığının takibi açısından IFAT tekniğine benzerlik göstermektedir. Yapılan çalışmalar (Harith ve ark 1987, Gari ve ark 2008, Pedras ve ark 2008) incelendiğinde, IFAT tekniğinin diğer bilinen test yöntemlerine kıyasla daha yüksek sensitivite ve spesifite değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Yüksek sensitivite ve spesifite değerlerine sahip olan MIFADA tekniğinin sonuçları da bu sonuçlar ile uyumludur. Viral teşhiste IFAT tekniğinin verimli kullanımı için preparat hazırlanması, hücre kültürüne viral ekim yapılması veya enfekte doku kesitlerinde çalışılmasının gerekliliği bildirilmiştir (Hughes ve ark 1988, Coffin ve ark 1995, Madeley ve ark 2002). Bu çalışmanın sonuçları ile ortaya konulan, solid faz üzerinde çok bölgeli antijen yakalaması ve bu antijenlerin floresans konjugatlar ile işaretlenerek likit faz bulunmaksızın görüntüleme yapılabilmesi ile MIFADA tekniği IFAT tekniğinden ayrılmaktadır.

4.3. Test Kitinin Avantajları ve Dezavantajları

PCR, moleküler biyolojide genetik materyalin detaylı analizi için temel olan bir tekniktir. Bu teknik, patojenlerin teşhisinde ve genetik materyalin çoğaltılmasında etkili bir araç olarak öne çıkar. MIFADA, çeşitli virusları eş zamanlı olarak teşhis edebilme

yeteneği ve düşük maliyet avantajı ile dikkat çekerken, PCR, yüksek hassasiyet ve özgüllük ile tanınan ancak daha yüksek maliyetli bir yöntemdir. Her iki tekniğin avantajları ve dezavantajları, performans özellikleri, kullanım alanları ve teknik özellikler açısından ayrıntılı bir şekilde ele alındığında, bu tekniklerin benzersiz özellikleri daha net bir şekilde ortaya çıkar.

MIFADA'nın avantajlarından biri, geniş bir patojen yelpazesini aynı anda analiz edebilme yeteneğidir. Bu, özellikle hastalık salgınlarının tespitinde veya birçok patojenin aynı anda var olduğu karmaşık klinik durumlarda kullanımını ne çıkarır. Ayrıca, MIFADA'nın düşük maliyetli olması, toplu tarama programları ve geniş nüfus gruplarında kullanımını teşvik eder. Ancak, bu tekniğin hassasiyeti, özellikle çok düşük konsantrasyonlardaki viral titrenin tespiti konusunda PCR kadar yüksek olmayabilir.

MIFADA'nın dezavantajları arasında, çoklu patojen analizi için gereken kompleks altyapı ve laboratuvar becerileri bulunmaktadır. Bu durum, teknik uygulama ve üretim süreçlerini karmaşıklaştırabilir ve daha uzun eğitim süreçleri gerektirebilir.

Öte yandan, PCR, genetik materyali belirli bir hedef bölgeden çoğaltma yeteneği ile bilinir. Bu, düşük konsantrasyonlardaki genetik materyallerin dahi hassas bir şekilde tespit edilebilmesini sağlar. PCR'nın spesifik prob ve primer kullanımıyla belirli patojenleri tespit etme yeteneği, özellikle tanısal doğruluk açısından avantaj sağlar. Ancak, yüksek maliyeti ve tek bir analiz için gereken uzun süre, hızlı tarama veya acil durumlar için pratik olmayabilir (Mekuria ve ark 2003, Mercier-Delarue ve ark 2014).

PCR'nın avantajları arasında yüksek hassasiyet ve özgüllük bulunsa da (Lam ve ark 2007), bu tekniğin yüksek maliyeti ve daha karmaşık bir laboratuvar altyapısı gerektirmesi, geniş çaplı kullanımını sınırlayabilir. Ayrıca, PCR tabanlı testlerin daha uzun analiz süreleri, sonuçların alınmasında gecikmeye neden olabilir.

Sonuç olarak, MIFADA ve PCR, viral teşhiste önemli roller oynayan ancak farklı avantajlar ve dezavantajlara sahip iki tekniktir. Hangi yöntemin tercih edileceği, testin amaçları, bütçe kısıtlamaları, kullanılabilirlik ve hedeflenen patojenlerin özellikleri gibi faktörlere bağlı olarak dikkatlice değerlendirilmelidir. Bu değerlendirme, en uygun teşhis yaklaşımını belirlemek için önemlidir ve klinik uygulamalarda etkili sonuçlar elde etmek için gereklidir.

4.4. Gelecekteki Araştırma ve Geliştirme İhtiyaçları

MIFADA metodu kullanım kolaylığı, hızlı teşhis yeteneği ve düşük üretim maliyeti ile ön plana çıkmıştır. Ancak üretim aşaması, benzer bir metot olan ELISA ile karşılaştırıldığında daha hassas ve karmaşıktır. Bu üretim yöntemi farklılığı şüphesiz ki çok bölgesel kaplamanın özel gereksinimlerinden kaynaklanmaktadır.

MIFADA testinin üretiminde her bir mikroplyet gözünün farklı bölgelerine birbirinden farklı yakalayıcı antikorlar kaplanmaktadır. Bu çalışmada el ile yapılan kaplama sonucunda insan hatalarından kaynaklanan hiza bozukluğu problemleri, damla şekillerinin farklılığı, antikorun kaplama sahasından taşması veya her göz için kullanılan antikor miktarlarının bire bir standardizasyonda ayarlanamaması gibi problemler yaşanmıştır. Ayrıca mikropipet ile göz üzerine yaklaşma açısı çok dik olup operatörün çalışma konforunu olumsuz yönde etkilemiş, yorgunluk ve dikkat dağınıklığı sebepli sorunlara yol açmıştır.

Bütün bu sorunların üstesinden gelmenin yolu ise şüphesiz ki üretimin otomatize edilmesi ve robotik üretim araçlarının kullanılmasıdır. Üç boyutlu matrikste hareket edip istenilen hacimde sıvıyı mikroplyet yüzeyine püskürtecek veya damlatacak bir prob taşıyan robotik araçların kullanılması ile bu sorunların üstesinden gelinebileceği gibi, tek bir göz içinde aynı anda yürütülecek test sayısı da kaplama bölgelerinin sayısının artırılması ile 64 yada 128'e kadar artırılabilir. Lateral Flow tekniğinin hazırlanmasında kullanılan antikor baskı cihazları veya 1µm piksel boyutuna sahip bir inkjet yazıcı nozülü kullanılabilecek robotik sistemlere örnek teşkil edebilir.

Üretim sırasında karşılaşılan bir diğer sorun ise çalışma ortamının temizliği idi. Elle yapılacak olan kaplamada, operatörün mikroplyete yukarıdan bakmasının gerekliliği sebebiyle biyogüvenlik kabinleri kullanılamadı. Bu sebeple görece temiz kabul edilen laboratuvar ortamında çalışılması gerekti. Antikor kaplamalarının ELISA'nın aksine likit faz altında değil, kuru olan solid faz yüzeyinde minimal hacimlerde sıvı ile yapılması ve mikroplyetin polistiren kaplamasından kaynaklanan elektrostatik alanın sebep olduğu bir toz tutma sorunu yaşandı. Pleyt zemininde tutulan tozlar floresans görüntüleme sırasında görüntü kirliliğine ve ektopik floresansa sebep olarak sonuçların yorumlanmasını zorlaştırdı, bazı durumlarda ise imkansız kıldı. Bu çalışmada kirlilik sorunu tam steril hale getirilmiş ve HEPA/ULPA filtre kombinasyonları kullanan havalandırma sistemine sahip bir laboratuvar, cerrahi hassasiyette temizlik prensibi ile çalışılarak önlemleri. Ancak bu

yöntem büyük hacimli test kiti üretimlerinde oldukça zorlayıcı ve zaman kaybettirici olacaktır. Otomatize edilmiş robotik kaplama araçlarının kullanımı ile çalışma ortamı bir biyogüvenlik kabini içerisine taşınabilir ve bu sayede temizlik sorunu ortadan kaldırılabilir. İnsan hatalarını da minimuma indirecek bu sistem ile hazırlanan test kitleri daha az görüntü paraziti oluşturacağından daha tutarlı sonuçlar verebilir.

Görüntü işleme sırasında karşılaşılan bir diğer büyük problem ise mikroskobun ışık kaynağının sebep olduğu yansımanın görüntü üzerine düşmesi idi. Bu çalışmada bu duruma iki farklı şekilde yaklaşıldı. Test kitinde kullanılacak antikor ve konjugatın optimum titreleri ile inkübasyon sürelerinin optimizasyonu çalışmalarında ektopik floresans, optik interferans ve yansımanın renk kodlarını değiştirmesi durumlarından kaçınmak adına GPU destekli bir ışın izlemeli denoising işlemi yapılarak görüntü temizlendi ve daha yüksek kalitede fotoğraflar elde edildi. Ancak gerçek dünya testleri olarak tanımlanan, standart laboratuvar koşullarında testin kullanımının taklit edildiği deneme testlerinde yalnızca görsel değerlendirme yapılacağı için bu teknik kullanılmadı. Optimize edilmiş test kiti ile yapılan denemelerde bu tür optik kirlilik sorunları, sonuçların değerlendirilmesini engellememektedir. Ancak ileriki çalışmalar ile kameradan alınan görüntünün bilgisayar tarafından otomatik olarak değerlendirilmesi ve test sonuçlarının insan gözlemi olmadan okunması için yazılım/donanım sistemleri geliştirildiğinde bu optik kirlilik yapay zekanın hatalı kararlar vermesine sebep olabilir. Bunun önüne geçmek için ise bu çalışmada mikropleytlerin arka yüzleri mat siyah boya ile kaplanmış ancak yansıma oluşumu engellenememiştir. Gelecek çalışmalarda ticari olarak satılan standart ve parlak yüzeyli mikropleytler yerine tercihen ışık geçirmez ve mat yüzeyli olup antikor kaplamasına izin verecek yapıda özel mikropleytlerin geliştirilmesi ile herhangi bir yazılımsal müdahale olmadan yüksek kaliteli görüntüleme yapılması mümkün olabilir.

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında, toplamda 200 adet pozitiflik durumu bilinen gaita örneği ile pozitif ve negatif kontrol örnekleri kullanıldı. Örneklerin bir kısmı hem CPV hem de CCoV yönünden pozitifken, bir kısmı her iki virus için negatif veya bir virus için pozitif. Real Time PCR kullanılarak tüm numuneler eva green ile teşhis edildi ve pozitiflik durumlarına göre gruplandırıldı. Özellikle, CPV teşhisi için kullanılan primerin VP2 gen bölgesini hedef aldığı ve uygun bir 93 bp'lik ürün uzunluğuna sahip olduğu belirlendi. Primerlerin GC% ve bağlanma değerlerinin kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu gözlemlendi. Forward primer üzerindeki ATTA sekansının TAAT sekansı ile komplementer olduğu ancak minimum self-dimerizasyon limitinin altında olduğu tespit edildi.

Benzer şekilde, CCoV teşhisi için seçilen primerlerin Tm değerlerinin kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu, ancak normal değerlerden biraz daha yüksek (58) olduğu belirlendi. Analizler sonucunda, CCoV forward ve reverse primerlerinin potansiyel hairpin formasyonları oluşturduğu, ancak self-dimerizasyon limitinin biraz üzerinde olduğu ancak bu durumun kullanılmalarında bir sakınca oluşturmadığı belirlendi.

Primerlerin uygunluğuna yönelik yapılan tüm analizlerden sonra, Real Time PCR analizleri gerçekleştirildi ve örnekler pozitiflik durumlarına göre başarıyla sınıflandırıldı. Sigmoidal sinyallerin alınması ve Tm değerlerinin anlamlı sonuçlar vermesiyle birlikte, yapılan doğrulama testleri olumsuz bir durumla karşılaşmadan başarıyla tamamlandı. Bu sonuçlar, seçilen primerlerin ve kullanılan metodolojinin, CPV ve CCoV teşhisi konusunda güvenilir ve etkili olduğunu gösterdi. Bu bulgular, çalışmanın temel amacına ulaşıldığını ve belirlenen hedeflerin başarıyla gerçekleştirildiğini doğruladı.

Anti-CPV antikorları olan 8H7 ve 5H7 antikorlarının CPV VP2 proteini ile gerçekleştirdiği moleküler etkileşimler incelendi. Docking işlemleri sonucunda elde edilen veriler, antikorların CPV VP2 proteinine olan bağlanma enerjileri ve bağlanma kalitesi üzerine detaylı bir ışık tuttu. Özellikle, VP2-8H7-H ve VP2-8H7-L komplekslerinin enerji değerlerinin düşük olması ve güçlü bir bağlanma potansiyeline sahip olmaları dikkati çekti. Aynı zamanda, VP2-5G7-L ve VP2-5G7-H komplekslerinin enerji değerlerinin 8H7 komplekslerine göre daha düşük olması, bu antikorların VP2 proteini ile güçlü bir etkileşim sergileme olasılığını arttırdı.

Daha fazla anlayış elde etmek amacıyla yapılan modellemelerle bağlantı bölgelerinin analizleri, antijen-antikor komplekslerinin bağ yapıları ve bağlanma bölgelerini detaylı bir şekilde ortaya koydu. Özellikle, 8H7 antikoru ile CPV2 arasındaki bağların incelenmesi, antikorum VP2'ye çok yönlü bir etkileşim sergilediğini gösterdi. Bu bağlantı verileri, 8H7 antikorumun CPV için etkili bir yakalayıcı antikor olarak kullanılabileceğini destekledi.

8H7 Light Chain'in VP2 ile olan moleküler etkileşimleri de detaylı bir şekilde incelendi. Özellikle, belirli amino asitler arasındaki bağlantıların analizi, antikorum VP2'ye karşı yüksek bir affinite gösterdiğini ve bu etkileşimin stabil ve güçlü olduğunu ortaya koydu.

Ayrıca, 5G7 Light Chain ve 5G7 Heavy Chain'in VP2 proteini ile gerçekleştirdiği moleküler etkileşimler detaylı bir şekilde ele alındı. Bu analizler, 5G7 antikorumun VP2 ile çok yönlü bir etkileşim gösterebildiğini ve bu etkileşimin adaptif ve esnek bir yapıya sahip olduğunu gösterdi.

Haddock analizleri, VP2-5G7 kompleksinin VP2'yi yüksek doğrulukla tanımlayabileceğini ve bağlanma kararlılığını daha iyi koruyabileceğini ortaya koydu.

Sonuç olarak, bu derinlemesine yapısal analiz, Anti-CPV antikorlarının VP2 proteini ile etkileşimlerini ayrıntılı bir şekilde inceleyerek, bu antikorların CPV'ye karşı potansiyel yakalayıcı antikorlar olarak kullanılabilirliğini gösterdi.

Optimize edilmiş test protokolü, CPV ve CCoV için özel olarak geliştirilmiş MIFADA aşamalarını tanımladı. İncelenen viruslar için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları, inkübasyon süresi, yakalayıcı antikor titresi ve konjugat titresi gibi kritik faktörlerin belirlenmesini sağladı. Her iki virus için ayrı değerlendirmeler yapıldı ve elde edilen veriler matematiksel hesaplamalarla değerlendirildi.

Optimizasyon çalışmalarında, sabit bir zaman fonksiyonu (60 dakika) kullanılarak dama tahtası metodu ile seri antikor ve konjugat sulandırılmaları test edildi. Bu süreç sonucunda elde edilen veriler, python ortamında hue değerleri baz alınarak oluşturulan üç boyutlu grafiklere dönüştürüldü ve sonuçlar değerlendirildi. Optimum antikor ve konjugat titresi hesaplamaları, elde edilen grafiklerin matematiksel analizi ile gerçekleştirildi. Bu hesaplamalara göre, CPV için optimum antikor titresi 1/1 ve optimum konjugat titresi 1/40

olarak belirlenirken, CCoV için optimum antikor titresi 1/1 ve optimum konjugat titresi 1/20 olarak hesaplandı. Bu titrelerde hazırlanan pleyt ve konjugat karışımı ile elde edilen sonuçlar, ışın izlemeli denoising işlemi uygulanmış fotoğraflar kullanılarak görsel olarak değerlendirildi ve üç farklı kişinin rastgele değerlendirmesinde %100 tutarlı sonuçlar gösterdi.

Elde edilen verilerin toplu halde değerlendirilmesi sonucunda, testin üretimi ve kullanımı için optimum parametreler belirlendi. Bu parametrelerin belirlenmesinde, son kullanıcının sahip olabileceği ekipmanlar ve deneyim seviyeleri göz önüne alınarak pratik bir kullanım sağlandı.

Testin uygulanabilmesi için gereken asgari laboratuvar şartları, doğrudan güneş ışığına maruz kalmayan, otomatik pipetlerin ve uygun steril tiplerin bulundurulduğu bir ortamı içermektedir. Test kitinin üretimi sırasında ise tam karanlık, güneş ışığı izolasyonu yapılmış bir ortam, steril çalışma şartları ve özel aydınlatma gereksinimleri belirlendi.

Optimizasyon çalışmalarının sonuçlarına dayanarak hazırlanan test kitinin içeriği ve muhteviyatı detaylı bir şekilde sunuldu. Testin uygulama aşamaları ise örnek hazırlama, inkübasyon, yıkama, konjugat uygulama ve son olarak floresans mikroskopunda görüntüleme aşamaları belirlendi.

Toplam test süresi, örnek hazırlama ve pleytin kuruması işlemleri hariç 105 dakika olarak belirlendi. Ancak bu süreyi 80 dakikaya indirmek için örnek hazırlama ve pleytin kuruması işlemleri ana protokolden çıkarılabileceği belirtildi.

Çalışmadaki bazı önemli noktalar:

- Test Numuneleri ve Koleksiyonu:
 - Dışkı numuneleri, -20C° sıcaklıkta dondurulmuş halde saklandı.
 - Rastgele seçilen 100 örnek, kör şekilde çalışma için ikincil bir numaralandırma ile kaydedildi.
 - Her örnek, 2 farklı eppendorf tüpü içinde sulandırıldı.
- Test Hazırlığı:
 - 10 adet test kit hazırlandı.

- Testler, optimizasyon çalışmalarında belirlenen protokol doğrultusunda gerçekleştirildi.
- Görüntüleme Sorunları ve Çözümü:
 - Mikroskop alanının yanlış kadrajlanması nedeniyle hatalı yorumlamalar farkedildi.
 - Floresans mikroskopunun yüksek büyütme oranına sahip olması ve kamera bağlantı tüpünün katsayıları nedeniyle kadraj kaybı yaşandı.
 - Daha doğru sonuçlar almak amacıyla, düşük büyütme oranına sahip bir floresans mikroskobu kullanılması ve görüntüleme tekrarına gidilmesi kararı alındı.
- Test Sonuçları ve Değerlendirme:
 - MIFADA test sonuçları, ham görüntüler üzerinden değerlendirildi ve liste halinde kaydedildi.
 - RT-PCR ile belirlenen gerçek pozitiflik durumları ile karşılaştırıldı.
- Testin Uygulanabilirliği ve Sonuçlar:
 - Gerçek dünya testlerinde, ışın izlemeli denoising işlemi yapılmadan sonuçların değerlendirilmesi hedeflendi.
 - Görsel incelemede ve kamera ile yapılan muayenede benzer sonuçlar elde edildi.
 - MIFADA testinin her 100 örneğin 94'ünü doğru teşhis ettiği ve sensitivitesinin %94 olduğu belirlendi.
 - Spesifitesi ise %100 olarak hesaplandı. Bu değerlendirme, MIFADA test kitinin pratik kullanımını ve geniş bir laboratuvar yelpazesine hitap etme yeteneğini vurgulamaktadır. Daha önceki denemelerde, RT-PCR ile karşılaştırıldığında yüksek doğruluk oranları elde edilmiştir.

6.KAYNAKLAR

- Adobe Corp., 2005. Adobe® RGB (1998) Color Image Encoding, <http://www.adobe.com> 12-16
- Akter, F., Roychoudhury, P., Dutta, T.K., Subudhi, P.K., Sarma, K., Kayina, A. 2020. Molecular Detection of 2c Variant of Carnivore Protoparvovirus 1 from Mizoram, India. *J Entomol Zool Stud*, 8, 1036-1039.
- Allison, A.B., Kohler, D.J., Fox, K.A., Brown, J.D., Gerhold, R.W., Shearn-Bochsler, V.I., Dubovi, E.J., Parrish, C.R., Holmes, C., Carolina, S. 2013. Frequent Cross-Species Transmission of Parvoviruses among Diverse Carnivore Hosts. *J Virol*, 87, 2342–2347.
- Anna N. Berlina, Anatoly V. Zherdev & Boris B. Dzantiev (2019) ELISA and Lateral Flow Immunoassay for the Detection of Food Colorants: State of the Art, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 49:3, 209-223
- Aoki, V. 2007. Imunofluorescência, immunoblotting e imunoprecipitação. *Dermatologia*, 3, 127-38.
- Aoki, V., Huang, M. H., Périgo, A. M., Fukumori, L. M., Maruta, C. W., Santi, C. G., ... & Rivitti, E. 2004. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) and pemphigus vulgaris: immunoglobulin G heterogeneity detected by indirect immunofluorescence. *Revista do Hospital das Clínicas*, 59, 251-256.
- Appel, M.J. 1987. Canine Coronavirus. In: Appel M.J. (Ed.), *Virus Infections of Carnivores*. Elsevier Science Publishers, The Netherlands, pp. 115–122.
- Baltoumas, F. A., Theodoropoulou, M. C., & Hamodrakas, S. J. 2013. Interactions of the α -subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: a critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials. *Journal of structural biology*, 182(3), 209-218.
- Bastiaens PIH, Verveer PJ, Squire A, Wouters F 2001. Fluorescence lifetime imaging microscopy of signal transduction protein reactions in cells. In: Valeur B, Brochon JC (eds) *Springer series on fluorescence 1* (New trends in fluorescence spectroscopy). Springer, Berlin Heidelberg New York p 297–302.
- Battilani, M., Modugno, F., Mira, F., Purpari, G., Di Bella, S., Guercio, A., Balboni, A. 2019. Molecular Epidemiology of Canine Parvovirus Type 2 in Italy from 1994 to 2017: Recurrence of the CPV-2b Variant. *BMC Vet Res*, 15, 393.
- Battilani, M., Scagliarini, A., Tisato, E., Turilli, C., Jacoboni, I., Casadio, R., Prosperi, S. 2001. Analysis of Canine Parvovirus Sequences from Wolves and Dogs Isolated in Italy. *J Gen Virol*, 82, 1555–1560.
- Benach, J. L., Bosler, E. M., Hanrahan, J. P., Coleman, J. L., Habicht, G. S., Bast, T. F., ... & Kaslow, R. A. 1983. Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *New England Journal of Medicine*, 308(13), 740-742.
- Berlman IB. 1971. *Handbook of fluorescence spectra of aromatic molecules*, 2nd ed. Academic Press, New York.
- Beutner, E. H. 2003. The development of immunofluorescence and the immunopathology of the skin. *International journal of dermatology*, 42(2), 99-109.
- Binn, L. N., Lazar, E. C., Keenan, K. P., Huxsoll, D. L., Marchwicki, R. H., & Strano, A. J. 1974. Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. In *Proceedings, Annual Meeting of the United States Animal Health Association* (No. 78, pp. 359-366).
- Birks JB. 1970. *Photophysics of aromatic molecules*. John Wiley & Sons, New York. 13. Lakowicz JR, Balter A. 1982. Analysis of excited state processes by phase-modulation fluorescence spectroscopy. *Biophys Chem* 16:117–132.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., Mumford, R. 2014. Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Res*, 186, 20–31.
- Buonavoglia, C., Martella, V., Pratella, A., Tempesta, M., Cavalli, A., Buonavoglia, D., Bozzo, G., Elia, G., Decaro, N., Carmichael, L. 2001. Evidence for Evolution of Canine Parvovirus Type 2 in Italy. *J Gen Virol*, 82, 3021–3025.
- Burgard, M., Mayaux, M. J., Blanche, S., Ferroni, A., Guihard-Moscato, M. L., Allemon, M. C., HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group*. 1992. The use of viral culture and p24 antigen testing to diagnose human immunodeficiency virus infection in neonates. *New England Journal of*

- Medicine, 327(17), 1192-1197.
- Calatayud, O., Esperón, F., Roman, S.C., Biek, J.K., Eblate, E., Neves, E., Lembo, T., Lankester, F. 2019. Carnivore Parvovirus Ecology in the Serengeti Ecosystem: Vaccine Strains Circulating and New Host Species Identified. *J Virol*, 93, e02220-18.
- Chanabasayya, V., Jyothi, J., Jacintha, M., & Sukumar, D. 2017. A retrospective study of the clinical, histopathological, and direct immunofluorescence spectrum of immunobullous disorders. *Egyptian Journal of Dermatology and Venerology*, 37(2), 62-68.
- Chang PY, Jackson MB. 2003. Interpretation and optimization of absorbance and fluorescence signals from voltage-sensitive dyes. *J Membr Biol* 196:105–116.
- Chen, Q., Ikemori, F., & Mochida, M. 2016. Light absorption and excitation–emission fluorescence of urban organic aerosol components and their relationship to chemical structure. *Environmental Science & Technology*, 50(20), 10859-10868.
- Cheng, T. M. K., Blundell, T. L., & Fernandez-Recio, J. (2007). pyDock: electrostatics and desolvation for effective scoring of rigid-body protein–protein docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 68(2), 503-515.
- Coffin, S. E., & Hodinka, R. L. 1995. Utility of direct immunofluorescence and virus culture for detection of varicella-zoster virus in skin lesions. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(10), 2792-2795. DOI: 10.1128/jcm.33.10.2792-2795.1995 | PMID: 8567930
- Cohen, B. E. 2010. Beyond fluorescence. *Nature*, 467(7314), 407-408.
- Coons, A. H., Creech, H. J., Jones, R. N., & Berliner, E. 1942. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *The Journal of Immunology*, 45(3), 159-170.
- Crawford, P. C., & Levy, J. K. 2007. New challenges for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 37(2), 335-350.
- DaCosta RS, Andersson H, Wilson BC. 2003. Molecular fluorescence excitation-emission matrices relevant to tissue spectroscopy. *Photochem Photobiol* 78(4):384–392.
- Davidson, M. W. 2012. *Pioneers in Optics: Marie Alfred Comu and John Frederick William Herschel*. *Microscopy Today*, 20(3), 50-52.
- Day, M.J., Horzinek, M.C., Schultz, R.D., Squires, R.A. 2016. Guidelines for the Vaccination of Dogs and Cats. *J Small Anim Pract*, 57, E1–E45.
- De Vries, S. J., Van Dijk, A. D., Krzeminski, M., van Dijk, M., Thureau, A., Hsu, V., ... & Bonvin, A. M. (2007). HADDOCK versus HADDOCK: new features and performance of HADDOCK2.0 on the CAPRI targets. *Proteins: structure, function, and bioinformatics*, 69(4), 726-733.
- De Vries, S. J., Van Dijk, M., & Bonvin, A. M. (2010). The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nature protocols*, 5(5), 883-897.
- Decaro, N., & Buonavoglia, C. 2012. Canine parvovirus: A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Veterinary Microbiology*, 155, 1-12.
- Decaro, N., Pratelli, A., Campolo, M., et al. 2004. Quantitation of canine coronavirus RNA in the faeces of dogs by TaqMan RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 119(2), 145-150.
- Deerinck, T. J., Martone, M. E., Lev-Ram, V., Green, D. P., Tsien, R. Y., Spector, D. L., Ellisman, M. H. 1994. Fluorescence photooxidation with eosin: a method for high resolution immunolocalization and in situ hybridization detection for light and electron microscopy. *The Journal of cell biology*, 126(4), 901-910.
- Deng, C., Niu, Y., Peng, Q., Qin, A., Shuai, Z., & Tang, B. Z. 2011. Theoretical study of radiative and non-radiative decay processes in pyrazine derivatives. *The Journal of chemical physics*, 135(1).
- Deshayes, S., & Divita, G. 2013. Fluorescence technologies for monitoring interactions between biological molecules in vitro. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 113, 109-143.
- Dilnessa, T., & Zeleke, H. 2017. Cell culture, cytopathic effect and immunofluorescence diagnosis of viral infection. *J Microbiol Mod Tech*, 2, 102-110.
- Dominguez, C., Boelens, R., & Bonvin, A. M. 2003. HADDOCK: a protein– protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society*, 125(7), 1731-

- Ehrig T, O’Kane DJ, Prendergast FG. 1995. Green fluorescent protein mutants with altered fluorescence excitation spectra. *FEBS Lett* 367:163–166.
- Ehrig ve ark 1995, Birks 1970, Berلمان 1971, DaCosta ve ark 2003, Chang 2003, Kao ve ark 2001, Valeur ve Berberan-Santos 2012.
- Engvall, E., & Perlmann, P. 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *Journal of Immunology*, 109(1), 129–35.
- Enjuanes, L., Brian, D., Cavanagh, D., Holmes, K., Lai, M. M. C., Laude, H., ... & Talbot, P. 2000. *Coronaviridae. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses*. Academic Press, San Diego, Calif, 835-849.
- Eregowda, C.G., De, U.K., Singh, M., Prasad, H., Sarma, K., Roychoudhury, P., Rajesh, J.B., Patra, M.K., Behera, S.K. 2020. Assessment of certain biomarkers for predicting survival in response to treatment in dogs naturally infected with canine parvovirus. *Microbial Pathogenesis*, 149, 104485.
- Falsey, A. R., Formica, M. A., & Walsh, E. E. 2002. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection: comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), 817-820.
- Feng, G., Zhang, G. Q., & Ding, D. 2020. Design of superior phototheranostic agents guided by Jablonski diagrams. *Chemical Society Reviews*, 49(22), 8179-8234.
- Ford, C. T., Jacob Machado, D., & Janies, D. A. 2022. Predictions of the SARS-CoV-2 omicron variant (B. 1.1. 529) spike protein receptor-binding domain structure and neutralizing antibody interactions. *Frontiers in Virology*, 2, 2.
- García-Arroyo, L., Prim, N., Martí, N. et al. 2016. Benefits and drawbacks of molecular techniques for diagnosis of viral respiratory infections. Experience with two multiplex PCR assays. *Journal of Medical Virology*, 88 (1), 45–50.
- Gari, G., Biteau-Coroller, F., LeGoff, C., Caufour, P., & Roger, F. 2008. Evaluation of indirect fluorescent antibody test (IFAT) for the diagnosis and screening of lumpy skin disease using Bayesian method. *Veterinary Microbiology*, 129(3-4), 269-280.
- Gavin, P. J., & Thomson Jr, R. B. 2004. Review of rapid diagnostic tests for influenza. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 4(3), 151-172.
- Geng, Y., Wang, J., Liu, L., et al. 2017. Development of real-time recombinase polymerase amplification assay for rapid and sensitive detection of canine parvovirus 2. *BMC Veterinary Research*, 13, 311.
- Gierschner, J., Shi, J., Milián-Medina, B., Roca-Sanjuán, D., Varghese, S., & Park, S. (2021). Luminescence in crystalline organic materials: from molecules to molecular solids. *Advanced Optical Materials*, 9(13), 2002251.
- Godse, S., Sagar, T., & Amacher, J. F. 2023. An idea to explore: Engaging high school students in structure-function studies of bacterial sortase enzymes and inhibitors-A comprehensive computational experimental pipeline. *Biochemistry and Molecular Biology Education*.
- Gongal, G., Rahman, H., Thakuri, K. C., & Vijayalakshmy, K. 2022. An Overview of Transboundary Animal Diseases of Viral Origin in South Asia: What Needs to Be Done?. *Veterinary Sciences*, 9(11), 586.
- Guzman, M. G., Jaenisch, T., Gaczowski, R., et al. 2010. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 4(8), e811.
- Harith, A. E., Kolk, A. H. J., Kager, P. A., Leeuwenburg, J., Faber, F. J., Muigai, R., Laarman, J. J. 1987. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(4), 603-606.
- Heeney, J. L. 2006. Zoonotic viral diseases and the frontier of early diagnosis, control and prevention. *Journal of Internal Medicine*, 260(5), 399-408.
- Hennig, J., de Vries, S. J., Hennig, K. D., Randles, L., Walters, K. J., Sunnerhagen, M., & Bonvin, A. M. 2012. MTMDAT-HADDOCK: high-throughput, protein complex structure modeling based on limited

- proteolysis and mass spectrometry. *BMC structural biology*, 12, 1-11.
- Hernández-Blanco, B., & Catala-López, F. 2015. Are Licensed Canine Parvovirus (CPV2 and CPV2b) Vaccines Able to Elicit Protection against CPV2c Subtype in Puppies?: A Systematic Review of Controlled Clinical Trials. *Vet. Microbiol.*, 180, 1–9.
- Herschel, Sir I. E. w., 1845, On a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid internally colourless, *Phil. Trans. R. Soc. London* 135:143-145.
- Hinuma, Y., Konn, M., Yamaguchi, J., Wudarski, D. J., Blakeslee Jr, J. R., & Grace Jr, J. T. 1967. Immunofluorescence and herpes-type virus particles in the P3HR-1 Burkitt lymphoma cell line. *Journal of virology*, 1(5), 1045-1051.
- Hodinka, R. L., Kaiser, L., Hodinka, R. L., & Kaiser, L. 2013. Point-counterpoint: is the era of viral culture over in the clinical microbiology laboratory?. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1), 2-8.
- Hughes, J. H., Mann, D. R., & Hamparian, V. V. 1988. "Detection of respiratory syncytial virus in clinical specimens by viral culture, direct and indirect immunofluorescence, and enzyme immunoassay." *Journal of Clinical Microbiology*, 26(3), 588-591. DOI: 10.1128/jcm.26.3.588-591.1988 | PMID: 3281981
- Jablonski, A. 1933. Efficiency of anti-Stokes fluorescence in dyes. *Nature*, 131(3319), 839-840.
- Jefferson, T., Spencer, E. A., Brassey, J., & Heneghan, C. 2021. Viral cultures for coronavirus disease 2019 infectivity assessment: a systematic review. *Clinical Infectious Diseases*, 73(11), e3884-e3899.
- Johnson ID, Kang HC, Haugland RP. 1991. Fluorescent membrane probes incorporating dipyrrometheneboron difluoride fluorophores. *Anal Biochem* 198:228–237.
- Jordon RE, Beutner EH, Witebsky E, Blumental G, Hale WL, Lever WF. Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. *JAMA*. 1967;29;200:751-6.
- Kao WY, Davis CE, Kim YI, Beach JM. 2001. Fluorescence emission spectral shift measurements of membrane potential in single cells. *Biophys J* 81:1163–1170.
- Karki, M., Rajak, K. K., Singh, P., Fayaz, A., Kumar, A., Bhatt, M., Singh, R. P. 2023. Optimization of lateral flow assay for Canine morbillivirus detection and the application of the strip as sample substitute. *Journal of Immunological Methods*, 514, 113438.
- Keenan, K. P., Jervis, H. R., Marchwicki, R. H., & Binn, L. N. 1976. Intestinal infection of neonatal dogs with canine coronavirus 1-71: studies by virologic, histologic, histochemical, and immunofluorescent techniques. *American journal of veterinary research*, 37(3), 247-256.
- Khatri, R.; Poonam; Mohan, H.; Minakshi; Pundir, C.S. 2017. Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Canine Parvovirus Disease in Dogs: A Mini Review. *J. Vet. Sci. Med. Diagn.*, 16, 3.
- Kim, R. H., & Brinster, N. K. 2020. Practical direct immunofluorescence. *The American Journal of Dermatopathology*, 42(2), 75-85.
- Koukos, P. I., Faro, I., van Noort, C. W., & Bonvin, A. M. 2018. A membrane protein complex docking benchmark. *Journal of molecular biology*, 430(24), 5246-5256.
- Koukos, P. I., Roel-Touris, J., Ambrosetti, F., Geng, C., Schaarschmidt, J., Trellet, M. E., ... & Bonvin, A. M. 2020. An overview of data-driven HADDOCK strategies in CAPRI rounds 38-45. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 88(8), 1029-1036.
- Koutna, M., Vesely, T., Psikal, I., & Hulova, J. 2003. Identification of spring viraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55(3), 229-235.
- Kulthanan, K., Jiamton, S., Varothai, S., Pinkaew, S., & Sutthipinittharm, P. 2007. Direct immunofluorescence study in patients with lichen planus. *International journal of dermatology*, 46(12), 1237-1241.
- Kumar, S.N.M. 2010. Canine Parvovirus: Current Perspective. *Indian J. Virol.*, 21, 31–44.
- Kwan, E., Carrai, M., Lanave, G., Hill, J., Parry, K., Kelman, M., Meers, J., Decaro, N., Beatty, J.A., Martella, V., Barrs, V.R. 2021. Analysis of canine parvoviruses circulating in Australia reveals predominance of variant 2b and identifies feline parvovirus like mutations in the capsid proteins. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68, 656-666.
- Lakowicz, J. R. Ed.. 2006. Principles of fluorescence spectroscopy. Boston, MA: springer US.

- Lakowicz, J. R., & Lakowicz, J. R. 1999. Introduction to fluorescence. Principles of fluorescence spectroscopy, 1-23.
- Larramendy, M.L., El-Rifai, W. and Knuutila, S. 1998, Comparison of fluorescein isothiocyanate- and Texas red-conjugated nucleotides for direct labeling in comparative genomic hybridization. *Cytometry*, 31: 174-179.
- Lam, W. Y. 2007. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses. *Journal of clinical microbiology*, 45(11), 3631-3640.
- Lau, S. K., & Chan, J. F. 2015. Coronaviruses: emerging and re-emerging pathogens in humans and animals. *Virology Journal*, 12(1), 1-3.
- Li, C.; Tang, J.; Chen, Z.; Niu, G.; Liu, G. 2019. A Divergent Canine Parvovirus Type 2c (CPV-2c) Isolate Circulating in China. *Infect. Genet. Evol.*, 73, 242–247.
- Li, H., Yan, Y., Zhao, X., & Huang, S.Y. 2022. Inclusion of desolvation energy into protein–protein docking through atomic contact potentials. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 62(3), 740-750.
- Lichtman, J., Conchello, J.A. Fluorescence microscopy. *Nat Methods* 2, 910–919 2005.
- Limpouchová, Z., & Procházka, K. 2016. Theoretical principles of fluorescence spectroscopy. *Fluorescence studies of polymer containing systems*, 91-149.
- Lincoln, J. 2021. Phosphorescence as an exponential decay. *The Physics Teacher*, 59(3), 220-221.
- Litster, A. L., Pressler, B., Volpe, A., & Dubovi, E. 2012. Accuracy of a point-of-care ELISA test kit for predicting the presence of protective canine parvovirus and canine distemper virus antibody concentrations in dogs. *The Veterinary Journal*, 193(2), 363-366.
- Liu, X., Xu, Z., & Cole, J. M. 2013. Molecular design of UV–vis absorption and emission properties in organic fluorophores: toward larger bathochromic shifts, enhanced molar extinction coefficients, and greater stokes shifts. *The Journal of Physical Chemistry C*, 117(32), 16584-16595.
- Lucht, A., Formenty, P., Feldmann, H., Götz, M., Leroy, E., Bataboukila, P., Grunow, R. 2007. Development of an immunofiltration-based antigen-detection assay for rapid diagnosis of Ebola virus infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 196(Supplement_2), S184-S192.
- Luytjes, W. 1995. Coronavirus gene expression: genome organization and protein synthesis. *The Coronaviridae*, 33-54.
- Madeley, C. R., & Peiris, J. S. M. 2002. Methods in virus diagnosis: immunofluorescence revisited. *Journal of Clinical Virology*, 25(2), 121-134. DOI: 10.1016/S1386-6532(02)00039-2
- Mahony, J., Chong, S., Merante, F., Yaghoubian, S., Sinha, T., Lisle, C., & Janeczko, R. 2007. Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2965-2970.
- Martella, V.; Cavalli, A.; Pratelli, A.; Bozzo, G.; Camero, M.; Buonavoglia, D.; Narcisi, D.; Tempesta, M.; Buonavoglia, C. 2004. A Canine Parvovirus Mutant Is Spreading in Italy. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 1333–1336.
- Martínez Serrano, M., Navalpotro Rodríguez, D., Tormo Palop, N., Olmos Arenas, R., Moreno Córdoba, M. D., Ocete Mochón, M. D., Gimeno Cardona, C., (2020). Comparison of commercial lateral flow immunoassays and ELISA for SARS-CoV-2 antibody detection. *Journal of Clinical Virology*, 129, 104529.
- Mekuria, G., Ramesh, S., Alberts, E., Bertozzi, T., Wirthensohn, M., Collins, G., Sedgley, M. 2003. Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of Prunus necrotic ring spot virus and prune dwarf virus in almond (*Prunus dulcis*). *J. Virol. Methods*, 114, 65–69.
- Mercier-Delarue, S., Vray, M., Plantier, J. C., et al. 2014. Higher specificity of NASBA isothermal technology versus real-time PCR for HIV-1 RNA quantification on dried blood spots. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(1), 52–6.
- Microplate Spectrophotometers Manual, <http://ltekc.com/>
- Minakshi, P., Ranjan, K., Brar, B., Ambawat, S., Shafiq, M., Alisha, A., ... & Prasad, G. 2014. New approaches for diagnosis of viral diseases in animals. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 2(4S), 55-63.

- Minz, R. W., Chhabra, S., Singh, S., Radotra, B. D., & Kumar, B. (2010). Direct immunofluorescence of skin biopsy: perspective of an immunopathologist. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*, 76, 150.
- Mira, F.; Canuti, M.; Purpari, G.; Cannella, V.; Di Bella, S.; Occhiogrosso, L.; Schirò, G.; Chiaramonte, G.; Barreca, S.; Pisano, P.; et al. 2019. Molecular Characterization and Evolutionary Analyses of Carnivore Protoparvovirus 1 NS1 Gene. *Viruses*, 11, 308.
- Mira, F.; Dowgier, G.; Purpari, G.; Vicari, D.; Di Bella, S.; Macaluso, G.; Gucciardi, F.; Randazzo, V.; Decaro, N.; Guercio, A. 2018. Molecular Typing of a Novel Canine Parvovirus Type 2a Mutant Circulating in Italy. *Infect. Genet. Evol.*, 61, 67–73.
- Murthy, K. V. R., & Virk, H. S. 2014. Luminescence phenomena: an introduction. *Defect and diffusion forum*, 347, 1-34.
- Mysorekar, V. V., Sumathy, T. K., & Prasad, A. S. 2015. Role of direct immunofluorescence in dermatological disorders. *Indian dermatology online journal*, 6(3), 172.
- Neeraj, T., Chethan, G.E., Mahendran, K., De, U.K., Vijayakumar, J., Vishal, C., Rajesh, J.B., Banerjee, P.S. 2020. Concomitant infection of Babesia canis, Ehrlichia canis and parvovirus in dogs and its therapeutic management. *Veterinary Practitioner*, 21, 247-249.
- Ntafis, V., Mari, V., Decaro, N., Papanastassopoulou, M., Pardali, D., Rallis, T.S., Kanellos, T., Buonavoglia, C. and Xylouri, E. 2013. Canine coronavirus, Greece. Molecular analysis and genetic diversity characterization. *Infect. Genet. Evol.*, 16, 129-136.
- Oxford, E. M., Pariaut, R., Tursi, M., Fox, P. R., & Santilli, R. A. 2021. Immunofluorescent Localization of Plakoglobin Is Altered in Endomyocardial Biopsy Samples from Dogs with Clinically Relevant Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy (ARVC). *Veterinary Sciences*, 8(11), 248.
- Pan, Z., Ning, L., Cheng, B. M., & Tanner, P. A. 2006. Absorption, excitation and emission spectra of SrCl₂:Eu²⁺. *Chemical physics letters*, 428(1-3), 78-82.
- Papafargkou, E., Hewitt, J., Park, G. W., et al. 2013. Challenges of culturing human norovirus in three-dimensional organoid intestinal cell culture models. *PLoS ONE*, 8(6), e63485.
- Park, Y. I., Kim, J. H., Lee, K. T., Jeon, K. S., Na, H. B., Yu, J. H., ... & Hyeon, T. 2009. Nonblinking and nonbleaching upconverting nanoparticles as an optical imaging nanoprobe and T1 magnetic resonance imaging contrast agent. *Advanced Materials*, 21(44), 4467-4471.
- Parrish, C.R. 1990. Emergence, Natural History, and Variation of Canine, Mink, and Feline Parvoviruses. *Adv. Virus Res.*, 38, 403–450.
- Parrish, C.R.; Aquadro, C.F.; Strassheim, M.L.; Evermann, J.F.; Sgro, J.Y.; Mohammed, H.O. 1991. Rapid Antigenic-Type Replacement and DNA Sequence Evolution of Canine Parvovirus. *J. Virol.*, 65, 6544–6552.
- Parrish, C.R.; Have, P.; Foreyt, W.J.; Evermann, J.F.; Senda, M.; Carmichael, L.E. 1988. The Global Spread and Replacement of Canine Parvovirus Strains. *J. Gen. Virol.*, 69 Pt 5, 1111–1116.
- Parrish, C.R.; O'Connell, P.H.; Evermann, J.F.; Carmichael, L.E. 1985. Natural Variation of Canine Parvovirus. *Science*, 230, 1046–1048.
- Pedras, M. J., Viana, L. G., Oliveira, E. J., & Rabello, A. 2008. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(2), 172–178.
- Pensaert, M. B., Debouck, P., & Reynolds, D. J. 1981. An immunoelectron microscopic and immunofluorescent study on the antigenic relationship between the coronavirus-like agent, CV 777, and several coronaviruses. *Archives of virology*, 68, 45-52.
- Perrin, F. (1926) *Compt. Rend.* 182, 219 ; *J. Physique* 7 , 390 – 401 Perrin, J. (1922) *Trans. Faraday Soc.* , 17, 546 – 572.
- Pfeffer, M., Linssen, B., Parker, M. D., & Kinney, R. M. 2002. Specific detection of Chikungunya virus using a RT-PCR/nested PCR combination. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 49(1), 49-54.
- Pohla-Gubo, G., & Hintner, H. (2011). Direct and indirect immunofluorescence for the diagnosis of bullous autoimmune diseases. *Dermatologic clinics*, 29(3), 365-372.

- Pollock, R.V.H., & Coyne, M.J. 1993. Canine Parvovirus. *Vet. Clin.*, 23, 555–568.
- Pratelli, A. 2006. Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis. *Veterinary Research*, 37(2), 191-200.
- Pratelli, A., Decaro, N., Tinelli, A., Martella, V., Elia, G., Tempesta, M., Buonavoglia, C. 2004. Two genotypes of canine coronavirus simultaneously detected in the fecal samples of dogs with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1797-1799.
- Pratelli, A., Elia, G., Martella, V., Tineili, A., Decaro, N., Marsilio, F., ... & Buonavoglia, D. 2002. M gene evolution of canine coronavirus in naturally infected dogs. *Veterinary record*, 151(25), 758-761.
- Pratelli, A., Tinelli, A., Decaro, N., Camero, M., Elia, G., Gentile, A., Buonavoglia, C. 2002. PCR assay for the detection and the identification of atypical canine coronavirus in dogs. *Journal of virological methods*, 106(2), 209-213.
- Przibram, K. 1956 *Irradiation Colours and Luminescence*, Pergamon : London . Qi, J., Ou, H., Liu, Q., & Ding, D. (2021). Gathering brings strength: How organic aggregates boost disease phototheranostics. *Aggregate*, 2(1), 95-113.
- Rao, G. N., Jupudi, S., Pant, P., Palathoti, N., Rajagopal, K., Govindasamy, R., & Justin, A. (2023). Ceftriaxone induces glial EAAT-2 promotor region via NF-kB conformational changes: An interaction analysis using HADDOCK. *Journal of Cellular Biochemistry*, 124(3), 359-372.
- Reed, A.P.; Jones, E.V.; Miller, T.J. 1988. Nucleotide Sequence and Genome Organization of Canine Parvovirus. *J. Virol.*, 62, 266–276.
- Resmi Gazete, 22.01.2011. 27823 sayılı “İhbarı Mecburi Hayvan Hastalıkları Ve Bildirimine İlişkin Yönetmelik”. p. 1.
- Richards, A. F., Lopman, B., Gunn, A., Curry, A., Ellis, D., Cotterill, H., Brown, D. W. 2003. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *Journal of Clinical Virology*, 26(1), 109-115.
- Rigon, A., Soda, P., Zennaro, D., Iannello, G., & Afeltra, A. 2007. Indirect immunofluorescence in autoimmune diseases: assessment of digital images for diagnostic purpose. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 72(6), 472-477.
- Ristic, M., Huxsoll, D. L., Weisiger, R. M., Hildebrandt, P. K., & Nyindo, M. B. A. 1972. Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. *Infection and Immunity*, 6(3), 226-231.
- Roel-Touris, J., Don, C. G., V. Honorato, R., Rodrigues, J. P., & Bonvin, A. M. (2019). Less is more: coarse-grained integrative modeling of large biomolecular assemblies with HADDOCK. *Journal of chemical theory and computation*, 15(11), 6358-6367.
- Sano, S. M., Quarracino, M. C., Aguas, S. C., González, E. J., Harada, L., Krupitzki, H., & Mordoh, A. 2008. Sensitivity of direct immunofluorescence in oral diseases: Study of 125 cases.
- Saponaro, A., Maione, V., Bonvin, A. M., & Cantini, F. 2020. Understanding docking complexes of macromolecules using HADDOCK: the synergy between experimental data and computations. *Bio-protocol*, 10(20), e3793-e3793.
- Schmitz, C., & Bonvin, A. M. 2011. Protein–protein HADDOCKing using exclusively pseudocontact shifts. *Journal of biomolecular NMR*, 50, 263-266.
- Senda, M., Parrish, C. R., Harasawa, R., Gamoh, K., Muramatsu, M., Hirayama, N., & Itoh, O. 1995. Detection by PCR of wild-type canine parvovirus which contaminates dog vaccines. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(1), 110-113.
- Shackelton, L.A.; Parrish, C.R.; Truyen, U.; Holmes, E.C. 2005. High Rate of Viral Evolution Associated with the Emergence of Carnivore Parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 379–384.
- Šípoš, R., & Šima, J. 2020. Jablonski diagram revisited. *Revista cubana de física*, 37(2), 125-130.
- So, P. T., & Dong, C. Y. 2001. Fluorescence spectrophotometry. e LS.
- Solanki, A. K., Panwar, D., Kaushik, H., & Garg, L. C. 2020. Molecular docking analysis of P2X7 receptor with the beta toxin from *Clostridium perfringens*. *Bioinformation*, 16(8), 594.
- Spiliotopoulos, D., Kastiris, P. L., Melquiond, A. S., Bonvin, A. M., Musco, G., Rocchia, W., & Spitaleri, A.

2016. dMM-PBSA: a new HADDOCK scoring function for protein-peptide docking. *Frontiers in molecular biosciences*, 3, 46.
- Stokes, G. G., 1852, On the change of refrangibility of light, *Phil. PROBLEMS Trans. R. Soc. London* 142:463-562.
- Sun, Y. L., Yen, C. H., & Tu, C. F. 2014. Visual detection of canine parvovirus based on loop-mediated isothermal amplification combined with enzyme-linked immunosorbent assay and with lateral flow dipstick. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(4), 509-516.
- Tavakoli, A., Rezaei, F., Fatemi Nasab, G. S., Adjaminezhad-Fard, F., Noroozbabaei, Z., & Mokhtari-Azad, T. 2017. The Comparison of Sensitivity and Specificity of ELISA-based Microneutralization Test with Hemagglutination Inhibition Test to Evaluate Neutralizing Antibody against Influenza Virus (H1N1). *Iranian Journal of Public Health*, 46(12), 1690-1696.
- Trozzolo, A. M., & Gibbons, W. A. 1967. The Absorption, Emission, and Excitation Spectra of Diarylmethylenes. *Journal of the American Chemical Society*, 89(2), 239-243.
- Truyen, U. 1999. Emergence and Recent Evolution of Canine Parvovirus. *Vet. Microbiol.*, 69, 47–50.
- Tsao, J., Chapman, M.S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Luo, M., Smith, T.J., Rossmann, M.G., Compans, R.W., Colin, R., et al. 1991. The Structure of Canine Parvovirus and Its Functional Implications. *Science*, 251, 1456–1464.
- Tucciarone, C.M.; Franzo, G.; Mazzetto, E.; Legnardi, M.; Caldin, M.; Furlanello, T.; Cecchinato, M.; Drigo, M. 2018. Molecular Insight into Italian Canine Parvovirus Heterogeneity and Comparison with the Worldwide Scenario. *Infect. Genet. Evol.*, 66, 171–179.
- Turro, N. J. 1991. *Modern molecular photochemistry*. University science books.
- Valeur, B. and Berberan-Santos, M.N. (2011), A brief history of fluorescence and phosphorescence before the emergence of quantum theory, *J. Chem. Educ.*, 88, 731–738.
- Valeur, B., Berberan-Santos, M. N. 2012. *Molecular Fluorescence*. First published: April 25, 2012. Print ISBN: 9783527328376 | Online ISBN: 9783527650002. DOI: 10.1002/9783527650002
- Van Dijk, A. D. J., De Vries, S. J., Dominguez, C., Chen, H., Zhou, H. X., & Bonvin, A. M. J. J. 2005. Data-driven docking: HADDOCK's adventures in CAPRI. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 60(2), 232-238.
- Van Dijk, M., van Dijk, A. D., Hsu, V., Boelens, R., & Bonvin, A. M. 2006. Information-driven protein–DNA docking using HADDOCK: it is a matter of flexibility. *Nucleic acids research*, 34(11), 3317-3325.
- Van Dijk, M., Visscher, K. M., Kastiris, P. L., & Bonvin, A. M. 2013. Solvated protein–DNA docking using HADDOCK. *Journal of biomolecular NMR*, 56, 51-63.
- Van Zundert, G. C. P., Rodrigues, J. P. G. L. M., Trellet, M., Schmitz, C., Kastiris, P. L., Karaca, E., Bonvin, A. M. J. J. 2016. The HADDOCK2. 2 web server: user-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. *Journal of molecular biology*, 428(4), 720-725.
- Van Zundert, G. C., & Bonvin, A. M. 2014. Modeling protein–protein complexes using the HADDOCK webserver “modeling protein complexes with HADDOCK”. *Protein structure prediction*, 163-179.
- Vandergeeten, C., Fromentin, R., Merlini, E., Lawani, M. B., DaFonseca, S., Bakeman, W., Chomont, N. 2014. Cross-clade ultrasensitive PCR-based assays to measure HIV persistence in large-cohort studies. *Journal of virology*, 88(21), 12385-12396.
- Vangone, A., Rodrigues, J. P. G. L. M., Xue, L. C., van Zundert, G. C. P., Geng, C., Kurkuoglu, Z., Bonvin, A. M. J. J. 2017. Sense and simplicity in HADDOCK scoring: Lessons from CASP-CAPRI round 1. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 85(3), 417-423.
- Wilke, B. M., Castellano, F. N. 2013. Photochemical Upconversion: A Physical or Inorganic Chemistry Experiment for Undergraduates Using a Conventional Fluorimeter. *Journal of Chemical Education*, 90(6), 786-789.
- Wu, D., Liu, F., Liu, H., et al. 2014. Detection of serum HCV RNA in patients with chronic Hepatitis C by transcription mediated amplification and real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Zhong nan da xue xue Bao. Yi xue ban*, 39(7), 664–672.
- Wu, S., Han, G., Milliron, D. J., Aloni, S., Altoe, V., Talapin, D. V., Schuck, P. J. 2009. Non-blinking and

- photostable upconverted luminescence from single lanthanide-doped nanocrystals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(27), 10917-10921.
- Xiong, R., Mara, D., Liu, J., Van Deun, R. Borbas, K. E. 2018. Excitation-and emission-wavelength-based multiplex spectroscopy using red-absorbing near-infrared-emitting lanthanide complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 140(35), 10975-10979.
- Yadav, K., Bhatt, M., Rai, V., Einstein, C., & Singh, R. P. 2022. Optimization of competitive lateral flow assay for detection of canine distemper virus antibody.
- Yamanouchi, K., Kobune, F., Fukuda, A., Hayami, M., & Shishido, A. 1970. Comparative immunofluorescent studies on measles, canine distemper, and rinderpest viruses: Immunofluorescence of measles, distemper, and rinderpest viruses. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 29, 90-100.
- Yoon, S.; Jeong, W.; Kim, H.; An, D. 2009. Molecular Insights into the Phylogeny of Canine Parvovirus 2 (CPV-2) with Emphasis on Korean Isolates: A Bayesian Approach. *Arch. Virol.*, 2, 1353–1360.
- Zhuang, L., Ji, Y., Tian, P., Wang, K., Kou, C., Gu, N., & Zhang, Y. 2019. Polymerase chain reaction combined with fluorescent lateral flow immunoassay based on magnetic purification for rapid detection of canine parvovirus 2. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1-13.



Canine Parvovirus ve Canine Coronavirus Etkenlerin Eş Zamanlı Teşhisine Yönelik Kit Geliştirilmesi

Yazar Çağrı AVCİ

Gönderim Tarihi: 11-Ara-2023 11:55AM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 2255418132

Dosya adı: a_r_avc_tez.docx (9.05M)

Kelime sayısı: 24398

Karakter sayısı: 164474

Canine Parvovirus ve Canine Coronavirus Etkenlerin Eş Zamanlı Teşhisine Yönelik Kit Geliştirilmesi

ORJİNALLIK RAPORU

%**4**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**3**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

%**1**

2

Submitted to Selçuk Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

%**1**

3

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

4

acikerisim.selcuk.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<%**1**

5

9lib.net

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

Submitted to University of Central Lancashire

Öğrenci Ödevi

<%**1**

7

Submitted to Rutgers University, New Brunswick

Öğrenci Ödevi

<%**1**

8

Colby T. Ford, Shirish Yasa, Denis Jacob Machado, Richard Allen White, Daniel A. Janies. "Predicting changes in neutralizing

<%**1**

EK-C: Kullanma Klavuzu

Test Prensipleri: MIFADA testi çok bölgeli yakalayıcı antikor kaplamaları ile birden fazla etkenin eş zamanlı teşhisine imkan sağlayan bir testtir. Kit içerisindeki mikrolept gözlerinin tamamında sol tarafta Anti-CPV sağ tarafta ise Anti-CCoV antikorları ile kaplama yapılmış ve bloklanmıştır. Test sonuçlarının alınması, örnekte bulunan virusun kendi yakalayıcı antikoru tarafından solid faza bağlanması ve kendisine spesifik FITC floresans konjugatla işaretlenmesi ile floresans mikroskobu altında demonstre edilmesi prensibine dayanır.

Test kitinin içeriği:

1. 96 gözlü mikrolept (kullanıma hazır)
2. Pozitif Kontrol (kullanıma hazır)
3. Negatif Kontrol (kullanıma hazır)
4. Konjugat A (Anti-CPV)
5. Konjugat B (Anti-CCoV)
6. Konjugat Sulandırma Tamponu (kullanıma hazır)
7. Örnek Sulandırma Tamponu (kullanıma hazır)
8. Yıkama Tamponu (100X)
9. FA Yıkama Tamponu (4X)

Test kitinde bulunmayan ihtiyacınız olacak malzeme ve ekipmanlar:

1. Floresans Mikroskobu (FLO470)
2. Steril Pipet Uçları
3. 5ml Eppendorf Tüpü
4. İnkübatör

5. Otomatik Pipet

Test kitinin saklanması: mikroplyet paketinin ve solüsyonların açılmadığı taktirde üretim tarihini takip eden 2 sene boyunca +4C° sıcaklıkta saklanması uygundur. Test kiti solüsyonlarını doğrudan ışığa maruz bırakmayınız veya şiddetli ışık altında çalışmayınız. Tercihen kırmızı ışık altında çalışmanız tavsiye edilir.

Test kitinin hazırlanması: Çalışmadan önce mikroplyetin ve tüm çözeltilerin oda sıcaklığına gelmesini bekleyiniz. Çözeltileri kontrol ediniz. Tüm çözeltilerin renksiz ve berrak görünmesi beklenir. Herhangi bir renk değışikliği veya bulanık görüntü ile karşılaşırsanız testi kullanmayınız.

Yıkama tamponunun hazırlanması: Örnek inkübasyonu sonrasında kullanılacak olan yıkama tamponu 100X konsantrasyonda verilmiş olup kullanımdan önce distile su ile 1X konsantrasyona sulandırılması gerekmektedir. Her 99ml distile su için 1ml yıkama tamponu ekleyerek karıştırınız. Kesinlikle musluk suyu kullanmayınız. Tamponun hafifçe köpürmesi beklenen bir durumdur.

FA Yıkama tamponunun hazırlanması: Konjugat inkübasyonundan sonra kullanılacak olan FA yıkama tamponu 4X konsantrasyonda verilmiş olup kullanımdan önce distile su ile 1X konsantrasyona sulandırılması gerekmektedir. Her 3ml distile su için 1ml yıkama tamponu ekleyerek karıştırınız. Kesinlikle musluk suyu kullanmayınız. Tamponun köpürmesi veya bulanık bir görüntü oluşması beklenmedik bir durumdur.

Konjugatın hazırlanması: Konjugat A ve Konjugat B çözeltilerinin Konjugat Sulandırma Tamponu ile sulandırılması sonucunda elde edilecek olan konjugat karışımı kullanmadan en fazla 15 dakika önce hazırlanmalıdır. Test edilecek her bir göz başına 10µl Konjugat A ve 10µl Konjugat B'yi 30 µl Konjugat Sulandırma Tamponu ile karıştırınız. Göz başına elde edilecek toplam konjugat hacmi 50µl'dir. Konjugatın doğrudan ışık görmesine izin vermeyiniz veya sulandırılmış konjugatı daha sonra kullanmak üzere saklamayınız.

Örneklerin hazırlanması: Test edilecek örneklerin oda sıcaklığına gelmesini bekleyiniz. Örnek sulandırma tamponunu kullanarak 1/10 oranında hazırladığınız örnek sulandırmalarında katı partikül bulunmamasına dikkat ediniz. Gerekirse sulandırmaları santrifüj ederek katı patrikülleri ayırıştırınız. Sulandırılan örneklerin yüksek sıcaklığa maruz kalmamasına dikkat ediniz.

Test protokolü:

1. Mikropleytin tüm gözlerinin temiz ve kuru olduğuna emin olun
2. Pozitif kontrol gözüne 50µl pozitif kontrol, negatif kontrol gözüne 50 µl negatif kontrol, örnek gözlerine de 50 µl sulandırılmış örnek damlatın
3. Pleytin üzerini buharlaşma olmaması için bant ile kapatın ve 37C°'de 60 dakika inkübe edin
4. Pleyti ters çevirip tüm sıvıyı boşaltın. Ardından 300 µl sulandırılmış yıkama tamponu ile her bir gözü 3 sefer yıkayın. Otomatik yıkama cihazı kullanılabilir.
5. Pleyt gözlerinde herhangi bir sıvı kalmadığına emin oldun. Her bir göze 50 µl konjugat karışımı ekleyin. Bu aşamadan itibaren pleytin doğrudan ışığa maruz kalmamasına dikkat edin
6. Pleytin üzerini buharlaşma olmaması için bant ile kapatın ve 37C°'de 60 dakika inkübe edin
7. Pleyti ters çevirip tüm sıvıyı boşaltın. Ardından 300 µl sulandırılmış FA yıkama tamponu ile her bir gözü 3 sefer yıkayın. Otomatik yıkama cihazının yıkama nozülleri tampon içinde bulunan NaCL sebebiyle zarar görebilir. Kullanmadan önce üretici firmaya danışın
8. Pleyt gözlerinde sıvı kalmamasını sağlayın ve pleyti 5-15 dakika boyunca havada kurutun
9. Floresans mikroskopunda FLO470 filtresi ile sonuçları değerlendirin

Sonuçların değerlendirilmesi: FLO470 filtresi ile sonuçları değerlendirirken siyah zeminde yeşil renkli, dairesel ve tek parça halinde görülen floresans odaklarının varlığı parametresi takip edilecektir. Floresans odakları gözün sol tarafında ise örnek CPV, sağ tarafında ise CCoV yönünden pozitifdir. Gözün her iki tarafında da floresans odaklarının bulunması örneğin hem CPV hem CCoV yönünden pozitif olduğunu, herhangi bir floresans odağının bulunmaması ise örneğin hem CPV hem de CCoV yönünden negatif olduğunu gösterir. Değerlendirme göz ile yapılacaksa yüksek ışık şiddeti kullanılması tavsiye edilir.

ÖNEMLİ NOT!!!

Göz veya kamera ile yapılan değerlendirmelerde gördüğünüz görüntünün ayna tersi olup olmadığını mutlaka kontrol ediniz. Kamera ile yapılan değerlendirmelerde ayna tersi düzeltme fonksiyonunun kullanılması, göz ile yapılan değerlendirmelerde ise pleytin mikroskoba ters şekilde yerleştirilmesi tavsiye edilir.