

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BATI NİL VİRÜSÜNÜN TESPİTİNE YÖNELİK OLARAK GERÇEK ZAMANLI TERS
TRANSKRİPSİYON İLMİĞE DAYALI İZOTERMAL ÇOĞALTMA YÖNTEMİ
TASARIMI VE TANISAL KAPASİTESİNİN SORGULANMASI

Saeed Salah Alsmani Ahmed

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Aykut Özkul

Haziran

2022

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Saeed Salah Alsmani Ahmed

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Aykut Özkul danışmanlığında Saeed Salah Alsmeni Ahmed tarafından hazırlanan bu çalışma 24/06/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR

İmza:

Üye: Prof. Dr. Erkan YILMAZ

İmza:

Üye: Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Batı Nil Virüsünün Tespitine Yönelik Olarak Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon İlmiğe
Dayalı İzotermal Çoğaltma Yöntemi Tasarımı ve Tanısal Kapasitesinin Sorgulanması

Saeed Salah Alsmani Ahmed

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Aykut Özkul

Batı Nil Virüsü (BNV) ensefalit, menenjit veya meningoensefalit gibi yaşamı tehdit eden hastalıklara neden olmaktadır. BNV enfeksiyonunun hayvan sağlığında gözden kaçabilen hastalık seyri, halk sağlığı açısından önemli bir sorun olarak değerlendirilmektedir. Dolayısıyla, enfeksiyon spektrumunda yer alan ve ayrıştırılabilen klinik belirtiler temelli kanatlı ve tek tırnaklı hayvanlarda hızlı ve güvenilir test sistemlerine günümüzde hala ihtiyaç vardır. Bütün bunlar göz önüne alınarak, bu çalışmada, BNV virüsünün tek tüpte ve tek aşamalı olarak, gerçek zamanlı hızlandırılmış bir LAMP testi ile hızlı tespitini amaçlanmıştır.

Bu yöntemle gen amplifikasyonu, viral RNA'nın, revers transkriptaz (RTaz) ve Bst DNA polimeraz varlığında bir primer seti ile 30 dakika boyunca 65 °C'lik sabit bir sıcaklıkta aynı anda inkübe edilmesiyle elde edilmiştir. Amplifikasyonun tespiti, agaroz jel elektroforezinin yanı sıra floresan görüntüleme ile de gerçekleştirilmiştir. BNV RNA, nanodrop cihazı kullanılarak ölçülmüş ve tespit limitini (LOD) belirlemek için seri olarak seyreltilmiştir (10 pikogram/μL ila 700 nanogram/μL). RT-LAMP, 10 pg'ye kadar BNV RNA tespit ederken, gerçek zamanlı RT-PCR 87,5 pg'ye kadar tespit etmiştir.

Bu sonuçlar, gerçek zamanlı RT-LAMP'ın gerçek zamanlı RT-PCR'den daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Gerçek zamanlı RT-LAMP testi, gerçek zamanlı RT-PCR'den daha verimlidir ve 30 dakika gibi oldukça kısa bir zaman içinde sonuç vermektedir. Gerçek zamanlı RT-PCR durumunda, aynı BNV RNA konsantrasyonunda 30 dakika sonra (45 döngüye kadar) sonuçlar alındı.

2022, 85 sayfa

Anahtar kelimeler: RT-LAMP; Gerçek zamanlı RT-PZR; Batı Nil Virüsü; E geni; NS3 geni; 5' UTR geni.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Designing Real-Time Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification Method for the Detection of West Nile Virus and Questioning its Diagnostic Capacity

Saeed Salah Alsmani Ahmed

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Aykut Özkul

West Nile Virus (WNV) causes life-threatening diseases such as encephalitis, meningitis or meningoencephalitis. The disease course of WNV infection, which can be overlooked in animal health, is considered as an important public health problem. Therefore, there is still a need today for rapid and reliable testing systems in poultry and equidae animals based on clinical signs that are within the spectrum of infection and can be differentiated. Considering all these, in this study, rapid detection of WNV virus in a single step and tube was aimed with a real-time accelerated LAMP test.

With this method, gene amplification was achieved by simultaneous incubation of viral RNA with a primer set in the presence of reverse transcriptase (RTase) and Bst DNA polymerase at a constant temperature of 65 °C for 30 minutes. Detection of amplification was performed by fluorescence imaging as well as agarose gel electrophoresis. WNV RNA was quantified using the nanodrop device and serially diluted (700 nanograms/ μ L to 10 picograms/ μ L) to determine the limit of detection (LOD). RT-LAMP detected up to 10 pg of WNV RNA, while real-time RT-PCR detected up to 87.5 pg.

These results show that real-time RT-LAMP is more sensitive than real-time RT-PCR. Real-time RT-LAMP assay is more efficient than real-time RT-PCR and gives results in a relatively short time of 30 minutes. In the case of real-time RT-PCR, results are given after 30 minutes (up to 45 cycles) at the same concentration of WNV RNA.

2022, 85 pages

Keywords: RT-LAMP; Real-time RT-PCR; West Nile virus; E gene; NS3 gene; 5' UTR gene.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca beni sabırla destekleyen, bilgi ve birikimiyle beni yönlendiren, bana ilham veren, emeğini ve bilgisini benden esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım Aykut ÖZKUL’a sonsuz teşekkürlerimi takdim ederim.

Dualarıyla, sevgisiyle, koşulsuz desteğiyle her an yanımda olan canım annem Fadia Hamadto’a, rahmetle andığım, aslında her zaman yanımda hissettiğim canım babam Salah Alsmami’ye, kardeşlerime, varlıklarından dolayı onur duyduğum tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamın aşamasında hoşgörü ortamı içerisinde çalıştığım, bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım sevgili laboratuvar arkadaşlarıma içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Daima öğrencinin yanında olan eski öğrenci işleri personeli Asuman Erzincan'a manevi desteği ve tüm emekleri için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. BATI NİL VİRÜSÜ	3
2.1.1. TARİHÇE	3
2.1.2. FİLOGENİ	5
2.1.3. BATI NİL VİRÜSÜNÜN SINIFLANDIRILMASI	6
2.1.4. BNV'NİN YAPISI VE GENOMU	7
2.1.4.1. Yapısal Proteinler (SP)	8
2.1.4.2. Yapısal Olmayan Proteinler (NSP)	8
2.1.5. YAŞAM DÖNGÜSÜ VE BULAŞMA YOLU	9

2.1.6.	PATOGENEZ VE BAĞIŞIKLIK YANITLARI.....	11
2.1.7.	TÜRKİYE'DE BNV'NİN EPİDEMİYOLOJİSİ VE DURUMU	14
2.2.	NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TEKNİKLERİ	16
2.2.1.	İLMİĞE DAYALI İZOTERMAL ÇOĞALTMA (LAMP)	16
2.2.1.1.	LAMP Prensipleri	17
2.2.1.1.1.	Döngüsel Olmayan Adım.....	17
2.2.1.1.2.	Döngüsel Adım.....	18
2.2.1.1.3.	LAMP Hızlanması	18
2.2.1.2.	LAMP Primerlerinin Tasarımı	19
2.2.1.2.1.	LAMP Primer Tasarım Yazılımı	19
2.2.1.3.	Ters Transkripsiyon (RT) -LAMP	19
2.2.1.4.	Amplifikasyon Görselleştirme Yöntemleri	20
2.2.1.4.1.	Son Noktaya Dayalı Yöntemler.....	20
2.2.1.4.1.1.	Agaroz Jel Elektroforezi	21
2.2.1.4.1.2.	İyon İndikatörleri.....	21
2.2.1.4.1.3.	Floresan Boyalar	23
2.2.1.4.2.	Gerçek Zamana Dayalı Yöntemler	24
2.2.1.5.	LAMP'ın Avantajları ve Dezavantajları	27
2.2.1.5.1.	Avantajları	27
2.2.1.5.2.	Dezavantajları.....	28

3. GEREKÇE VE AMAÇ.....	29
4. MATERYAL VE YÖNTEM	30
4.1. MATERYAL.....	30
4.1.1. ÖRNEK TEMİN EDİLEN İŞLETMELER	30
4.1.2. HÜCRE	30
4.1.3. VİRÜS.....	30
4.2. YÖNTEM.....	30
4.2.1. VİRÜSÜN ÜRETİLMESİ	30
4.2.2. VİRAL RNA İZOLASYONU.....	31
4.2.3. PRİMERLERİN TASARIMI	32
4.2.4. TERS-TRANSKRİPSİYON POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR)	36
4.2.5. TERS TRANSKRİPSİYON İLMİĞE DAYALI İZOTERMAL ÇOĞALTMA (RT-LAMP) 37	
4.2.5.1. RT-LAMP Ürününün Analizi	39
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	40
5.1. RT-LAMP'IN STANDARDİZASYONU VE OPTİMİZASYONU	40
5.2. NS3 GENİNİN VE UTR/C GENİNİN TESPİTİ	40
5.3. RT-LAMP TESTİNİN DUYARLILIĞI	43
5.4. GERÇEK ZAMANLI RT-PCR'NİN DUYARLILIĞI.....	44

6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	46
6.1. TARTIŞMA.....	46
6.2. SONUÇ.....	47
KAYNAKLAR.....	48
ÖZGEÇMİŞ	65
TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....	66



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. BNV'nin global dağılımı (16)	5
Şekil 2.2. BNV lineagelarına ilişkin filogenetik analiz (27)	6
Şekil 2.3. Japon Ensefalit Virüsü (JEV) antijenik grubu (28).....	7
Şekil 2.4. Batı Nil virüsü genomunun organizasyon şeması (29)	8
Şekil 2.5. Batı Nil virüsünün birincil vektörlerinin coğrafi dağılımı: (A) Culex pipiens (koyu gri) ve Culex quinquefasciatus (kırmızı), (B) Culex tarsalis (mavi) (40)	10
Şekil 2.6. Batı Nil Virüsü Biyolojik Döngüsü (8)	11
Şekil 2.7. BNV enfeksiyonlarının deriye girdikten sonraki ilk patogenezi (45)	12
Şekil 2.8. LAMP'ın primer seti konumunu ve kalıptaki karşılık gelen sekansını temsil eden tipik harita. BL: ilmi primer B-ilmi; FL: ilmi primer F-ilmi; F3: ileri dış primer; FIP: ileri iç primer; B3: geri dış primer; BIP: geri iç primer. Her primerin, hedef dizideki renkle eşleşen bir rengi vardır	18
Şekil 2.9. Seri olarak seyreltilmiş LAMP ürünleri için agaroz jel elektroforez analizidir. LAMP tekniği ile amplifiye edilmiş ürünler için farklı boyutlar oluşturulmuştur (merdiven deseni)..	21
Şekil 2.10. Floresan metal indikatörü olarak kalsein'i kullanılarak saptanması.....	22
Şekil 2.11. Farklı indikatörler ile gerçekleştirilen LAMP amplifikasyonların çıplak göz sonuçları incelenmesi. (A) Pozitif sonuç ayrımı için reaksiyon karışımına etidyum bromür eklenmesi. Pozitif reaksiyon durumunda pembe bir renk gösterilir (sağda), negatif bir reaksiyon olması durumunda, bir şarap rengi gösterilir (solda). (B) Reaksiyon karışımına Picogreen eklenmesi. Pozitif reaksiyon durumunda, boyanın orijinal rengi kalıcı olarak sarıya dönüşür (sağda), negatif reaksiyon durumunda orijinal turuncu renk korunur (solda). (C) Reaksiyon karışımına iyon indikatörünün eklenmesi: (solda) Negatif kontrol durumunda, karışım kalıp DNA içermeyen, net gösterilir; pozitif bir sonuç olması durumunda (sağda) bulanıklıkta artış gözlemlenir. (D)	

Reaksiyon karışımına kalsein eklenmesi. (Solda) negatif kontrol; (sağda) kalsein ile artık magnezyum iyonu etkileşimi nedeniyle pozitif örnekle floresans yaymıştır. (E) Reaksiyon karışımına (hidroksi naftol mavi) HNB eklenmesi: karışımın renk değişimi, negatif reaksiyonda mordan (solda) pozitif reaksiyonda maviye (sağda) dönüşür 24

Şekil 2.12. Gerçek zamanlı İlmiğe-dayalı İzotermal Amplifikasyon ve gerçek zamanlı PCR arasındaki sonuçların değerlendirilmesi. Panel (A), "şapka" gibi görünen gerçek zamanlı LAMP amplifikasyon eğrisini gösterir ve panel (B), sigmoidal gibi görünen gerçek zamanlı PCR amplifikasyon eğrisini göstermektedir 26

Şekil 5.1. NS3 gen ürünlerinin UV ışığı altında görsel inceleme ile değerlendirilmesi. Pozitif reaksiyon UV ışığı altında parlak yeşildi, kalıp içermeyen kontrol (NTC) ise zayıf yeşil kaldı 41

Şekil 5.2. UTR/C gen ürünlerinin UV ışığı altında görsel inceleme ile değerlendirilmesi. Pozitif reaksiyon UV ışığı altında parlak yeşildi, kalıp içermeyen kontrol (NTC) ise zayıf yeşil kaldı 41

Şekil 5.3. NS3 gen ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. Şerit 1-5, BNV RNA'nın pozitif reaksiyonları; şerit NTC, kalıp içermeyen kontrol (RNA yok); şerit M, moleküler işaretleyici 42

Şekil 5.4. UTR/C gen ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. Şerit 1-3, BNV RNA'nın pozitif reaksiyonları; şerit NTC, kalıp içermeyen kontrol (RNA yok); şerit M, moleküler işaretleyici 42

Şekil 5.5. Çeşitli WNV RNA konsantrasyonlarından Env gen ürünleri için agaroz jel elektroforezi. (A) 700 ng genomik RNA (şerit 1) ile başlayan 1 ng'ye (şerit 10) kadar çift seri seyreltmeler test edildi. Şerit NTC, kalıp içermeyen kontrol (RNA yok); şerit M moleküler işaretleyici. (B) 1 ng genomik RNA (şerit 1) ile başlayan 10 pg'ye (şerit 6) kadar çift seri seyreltmeler test edildi. Şerit NTC, kalıp içermeyen kontrol (RNA yok); şerit M moleküler işaretleyici 43

Şekil 5.6. Real Time RT-PCR test sonucu görüntüsü. Gerçek zamanlı RT-PCR, 1 ng'ye kadar BNV RNA tespit etti..... 44

Şekil 5.7. Real Time RT-PCR test sonucu görüntüsü. Gerçek zamanlı RT-PCR, 87,5 pg'ye kadar BNV RNA tespit etti..... 45



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. 5'-UTR ve C geninin bir kısmının RT-LAMP amplifikasyonu için kullanılan oligonükleotid primerlerinin detayları	33
Çizelge 4.2. BNV'nin NS3 geninin RT-LAMP amplifikasyonu için kullanılan oligonükleotid primerlerinin detayları.....	34
Çizelge 4.3. BVN'nin E geninin RT-LAMP amplifikasyonu için kullanılan oligonükleotid primerlerinin detayları.....	35
Çizelge 4.4. Real Time RT-PCR karışım bileşenleri ve miktarları	36
Çizelge 4.5. Gerçek Zamanlı RT-PCR ısı döngüsü ve döngü sayısı	37
Çizelge 4.6. 10X LAMP Primer Karışımı.....	38
Çizelge 4.7. Toplam 25 µl LAMP reaksiyon hacmi için kullanılan reaktifler	38

SİMGELER DİZİNİ

BNV	Batı Nil Virüsü
LAMP	İlmiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon
RT - LAMP	Revers Transkriptaz İlmiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PCR	Real-time Polymerase Chain Reaction
NASBA	Nükleik Asit Sekans Temelli Amplifikasyon
3SR	Self-sustaining Sequence Replikasyonu
RCA	Random-primed Rolling Circle Amplifikasyonu
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dsDNA	Çift Sarmallı DNA
RNA	Ribo Nükleik Asit
RTaz	Revers Transkriptaz
LOD	Tespit Limiti
pg	Pikogram
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
E gen	Zarf gen
5' UTR	5' Çevrilmeyen bölgesi
prM	Ön membran
C	Kapsid proteini
NS1	Yapısal olmayan 1
NS2A	Yapısal olmayan 2A

NS2B	Yapısal olmayan 2B
NS3	Yapısal olmayan 3
NS4A	Yapısal olmayan 4A
NS4B	Yapısal olmayan 4B
NS5	Yapısal olmayan 5
JEV	Japon Ensefalit Virüsü
SLEV	St. Louis Ensefalit Virüsü
MVEV	Murray Valley Ensefalit Virüsü
YAOV	Yaounde Virüsü
ALFV	Alfuy Virüsü
CPCV	Cacipacore Virüsü
USUV	Usutu Virüsü
KOUV	Koutango Virüsü
AMV	Kanatlı Miyeloblastoz Virüsü
MERS - CoV	Orta Doğu Solunum Sendromu koronavirüsü
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
ACLSV	Elma Klorotik Yaprak Lekesi Virüsü
BATV	Batai Virüsü
RdRp	RNA'ya bağımlı RNA polimeraz
DC	Dendritik hücreler
TBEV	Kene Kaynaklı Ensefalit Virüsü
IFN	İnterferon
IFN- α	İnterferon alfa
IFN- β	İnterferon beta

IFN- γ	İnterferon gama
IFN- λ	İnterferon lambda
CNS	Merkezi Sinir Sistemi
MIF	Makrofaj İnhibitör Faktör
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
NK	Doğal öldürücü hücreler
Th1	T yardımcı 1
Th2	T yardımcı 2
MHC	Ana Doku-uyumluluk Kompleksi
IL-28a/b	İnterlökin-28a/b
IL-29	İnterlökin-29
CXCL10	C-X-C Motifli Kemokin Ligandı 10
CCL5	Kemokin Ligandı 5
CCR5	C-C Kemokin Reseptörü Tip 5
HI	Hemaglütinasyon İnhibisyonu
IgM	İmmünoglobülin M
IgG	İmmünoglobülin G
IIFT	Endirekt İmmüno Floresan Testi
PRNA	Plak Azaltma Nötralizasyon Deneyi
PRNT	Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi
IFA	İndirekt Floresan Antikor Testi
F3	İleri Dış Primer

B3	Geri Dış Primer
FIP	İleri İç Primer
BIP	Geri İç Primer
LF	İleri İlmik
LB	Geri İlmik
LAVA	LAMP Assay Versatile Analysis
EtBr	Etidyum Bromür
UV	Ultraviyole
HNM	Hidroksi Naftol Mavisi
ROX	6-Karboksil-X-Rodamin
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ATCC	American Type Culture Collection
BSL-3	Biyogüvenlik Seviye 3
DMEM	Dulbecco's Minimum Essential Medium
CPE	Sitopatik Etki
Bp	Baz Çifti
dk	Dakika
sn	Saniye
NTC	Kalıp içermeyen kontrol
dH2O	Distile su
TAE tamponu	Tris-Asetat-EDTA tamponu
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit

1. GİRİŞ

Viral enfeksiyonların neden olduğu hastalıkların çoğu oluş ve seyri açısından karmaşık olması ve farklı viral ajanların benzer semptomlara neden olabilmesi nedeniyle tanıda zorluk yaşanabilmektedir. Batı Nil Virüsü (BNV) ensefalit, menenjit veya meningoensefalit gibi yaşamı tehdit eden hastalıklara neden olabilir. BNV enfeksiyonunun karakteristik olmayan semptomları nedeniyle gözden kaçabilen bir hayvan hastalığı olması, halk sağlığı için önemli bir tehdit olarak değerlendirilmektedir. Dolayısıyla enfeksiyon spektrumunda yer alan ve hastalığa özgü belirtiler veren kanatlı ile tek tırnaklı hayvanlarda hızlı ve güvenilir test sistemlerine ihtiyaç vardır. İlave olarak bu testlerin saha şartlarında uygulanabilirliği, büyük bir avantaj olarak değerlendirilmektedir.

Amplifikasyon yöntemleri, hedef sekansları benzer boyutlarda amplifiye edebilmektedirler. Tüm bu yöntemler düşük miktardaki hedef DNA'larını (10 kopyadan az) 1 saat gibi kısa sürede tespit edebilmesine rağmen, bazı dezavantajlara sahiptir (1, 2). Belirtilen bu teknikler, zayıf bir hedef sekans özgüllüğüne sahiptir, bu nedenle, amplifiye edilmiş ürünleri tespit etmek için ayrıntılı bir metot veya amplifikasyon için hassas bir cihazları gerektirirler. Elde edilebilir amplifikasyon büyüklüğüne rağmen, termal döngüleyici kullanma gerekliliği, rutin bir tanı tekniği olarak kullanımını engellemektedir. Öte yandan, NASBA ve 3SR, termal döngüye ihtiyaç duymayan tekniklerdir ve amplifikasyon için düşük sıcaklığa bağlı olduklarından özgüllük açısından benzerdirler. SDA, izotermal koşullar altında çalışmasına ve 4 farklı primer kullanmasına rağmen, substratlar olarak maliyetli modifiye edilmiş nükleotitleri kullanma ihtiyacı ve örnekte hedef olmayan DNA'nın sindirimi gibi dezavantajlara sahiptir, bu artan arka planlara neden olmaktadır (3). Nested PCR ve SDA'da olduğu gibi, birden fazla primerin kullanılması amplifikasyon özgüllüğünü artırsa da, ilgisiz dizilerin amplifikasyonu, nükleik asit amplifikasyonunda hala bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır.

Diğer amplifikasyon tekniklerinin sahip olduğu dezavantajlar, yakın zamanda ilmiğe-dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP) olarak adlandırılan yeni bir yöntemin geliştirilmesine neden olmuştur. Bu teknik, bir saatten daha kısa sürede birkaç DNA kopyasını 10^9 'a kadar çoğaltma yeteneğine sahiptir. Ek olarak, amplifikasyon izotermal koşullar altında yapılır, dolayısıyla

karmaşık ekipmanlara ihtiyaç yoktur. LAMP teknolojisi sayesinde farklı primer setleri ile virüs tespit hassasiyetinin arttırılması ve saha şartlarında güvenilir bir tanısal araç olarak kullanılması sağlanacaktır. Biyoteknolojinin en önemli uygulama alanlarından birisi olan tanısal sistemlerin geliştirilmesi ve adaptasyonu perspektifinde “Pen-side veya Point-of-care” (hasta başı) uygulamaya önemli bir katkı sağlanması planlanmaktadır (4). Ayrıca, düşük gelir düzeyine sahip, gelişmekte olan bazı ülkeler de dahil olmak üzere birçok alanlar için ekonomik bir uygulama aracı optimizasyonu gerçekleştirilmiş olacaktır.

Bu nedenle, bu çalışmada, BNV virüsünün tek tüpte ve tek aşamalı olarak, gerçek zamanlı hızlandırılmış bir LAMP testi ile hızlı tespitini amaçlanmıştır. Gen amplifikasyonu, viral RNA'nın, revers transkriptaz (RTaz) ve Bst DNA polimerazı varlığında bir primer setleri ile 30 dakika boyunca 65 °C'lik sabit bir sıcaklıkta aynı anda inkübe edilmesiyle elde edilir. Amplifikasyonun tespiti, agaroz jel analizinin yanı sıra floresan ölçümü ile gerçekleştirilir (5).

2. KURAMSAL TEMELLER

Batı Nil Virüsünün (BNV) ensefalit, menenjit veya meningoensefalit gibi yaşamı tehdit eden hastalıklara neden olmaktadır. BNV enfeksiyonunun hayvan sağlığında gözden kaçabilen hastalık tablosuna neden olması, halk sağlığı açısından önemli bir sorun olarak öngörülmektedir. Dolayısıyla, enfeksiyon spektrumunda yer alan ve ayrıştırılabilen klinik belirtiler temelli kanatlı ve tek tırnaklı hayvanlarda hızlı ve güvenilir test sistemlerine ihtiyaç vardır.

Nükleik asit amplifikasyonu birçok farklı alanda önemli bir araçtır. Temel araştırmalara ek olarak, bulaşıcı hastalıkların teşhisi gibi uygulama odaklı alanlarda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Nükleik asit amplifikasyon araçlarından en yaygın bilineni, nükleik asidi amplifiye etmek için geliştirilmiş ilk teknik olarak kabul edilen Polimeraz zincir reaksiyonudur (PZR). Bununla birlikte, PZR'in termal döngü ihtiyacı, pahalı ekipman ve kontaminasyon olasılığı gibi dezavantajları vardır (4). Bu sınırlamalar, self-sustaining sequence replikasyonu (3SR), random-primed rolling circle amplifikasyonu (RCA), nükleik asit sekans temelli amplifikasyon (NASBA), ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP) gibi alternatif yöntemleri doğurmuştur. Bu teknikler izotermal amplifikasyon esaslı teknikler olup termal döngüleyicinin kullanılmasına ihtiyaç duymamaktadır.

2.1. BATI NİL VİRÜSÜ

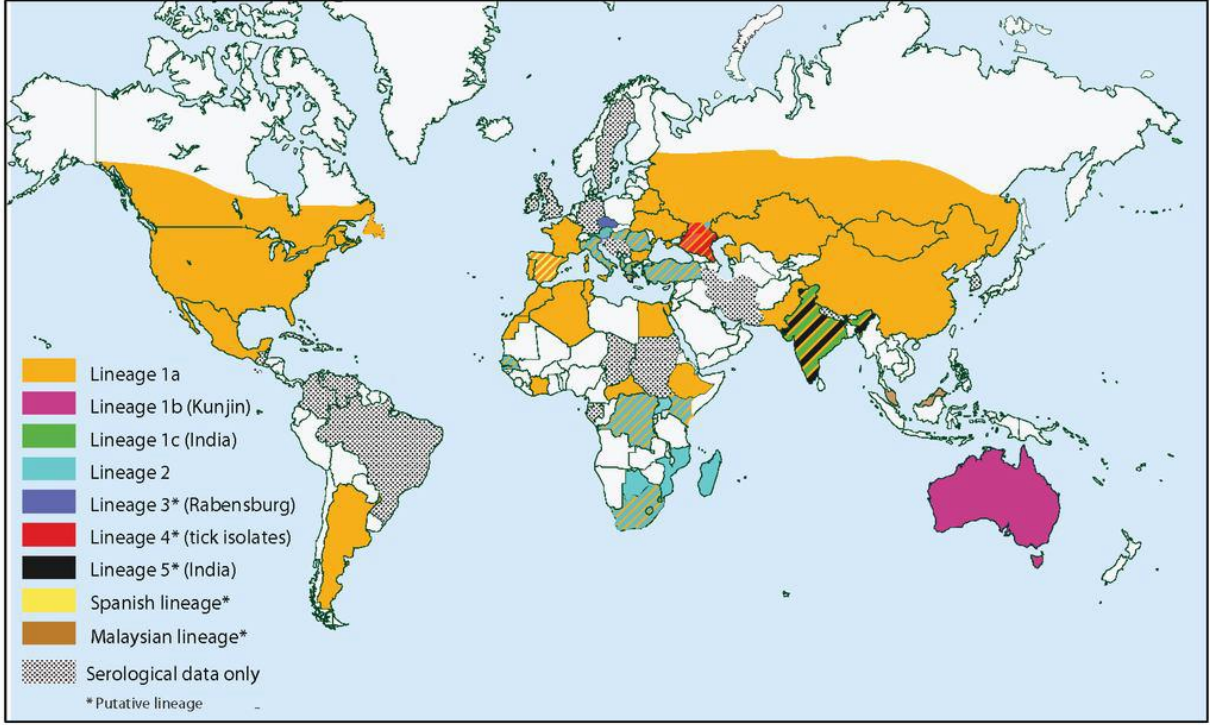
Batı Nil Virüsü (BNV), Batı Nil Ateşi'ne neden olan zarflı, tek sarmallı bir RNA virüsüdür. BNV virüsü Flaviviridae ailesinin bir üyesi olup, Sarı Humma Virüsü, Deng Virüsü ve Zika Virüsü ile birlikte Flavivirus cinsine aittir.

2.1.1. TARİHÇE

BNV, ilk olarak 1937'de Kuzey Uganda'da ateşli, yetişkin bir kadında bulunmuştur (6). Daha sonra hastalık, Afrika'nın büyük kısmına, Orta Doğu'ya, Avustralya'ya, Batı Asya'ya, Avrupa'nın bazı bölgelerine ve Amerika'ya yayılmaya devam etmiştir (7, 8). Virüsün daha sonra St. Louis Ensefalit Virüsü ve Japon B Ensefalit Virüsü ile immünolojik bir ilişkisi olduğu kabul edilmiştir. 1950'li ve 1960'lı yıllarda Akdeniz'de çeşitli salgınlar meydana gelmiştir (9).

Bunlardan ilki, 1951'de İsrail'de bildirilmiştir. Virüs, Hayfa yakınlarındaki küçük bir kasabada bir çocuğun kanından izole edilmiştir (10). 1951 ve 1954 yılları arasında Mısır'da geniş çaplı salgınlar meydana gelmiştir. Hastalık için kapsamlı serosurveyler yapılmasına yol açmıştır. Bu serosurveyler, BNV'nin esas olarak erken çocukluk çağı enfeksiyonu olduğunu ortaya koymaktadır (11). Daha sonraki salgınlar 1962'de Fransa'da, 1974'te Güney Afrika'da, Rusya'da, İspanya'da ve Hindistan'da ortaya çıkmıştır (12). 1970 ve 1980'lerde salgınlar çok nadir olsa da 1996'nın başlarında Romanya'da büyük bir BNV salgını meydana gelmiştir. Bu salgını, Ortadoğu, Avrupa, Fas (1996), Tunus (1997) ve İtalya (1998)'da bir seri salgın izlemiştir (13). Tüm bu salgınlar meningoensefalit şeklinde rapor edilmiştir. 1999 yılında, hastalık, ilk kez Kuzey Amerika'da yayılmıştır ve önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Virüsün Kuzey Amerika kıtasına nasıl ulaştığına dair tam bir açıklama olmasa da hastalığın ülkeye sivrisinekler, viremik hastalar veya göçler sırasında egzotik kuşlar tarafından New York'a taşındığına inanılmıştır. Zamanla, vakalar 2002'de tüm Kuzey Amerika'yı kapsayacak şekilde benzeri görülmemiş bir yayılım serilemiştir (7).

Türkiye'de de 2010 yılında 47 Batı Nil ateşi vakası ile Refik Saydam Ulusal Halk Sağlığı Kurumu tarafından 2011 yılında üç vaka bildirilmiştir (14). Diğer taraftan son on yılda, virüsün Avrupa'daki yayılışı da detaylı olarak rapor edilmiştir (15).



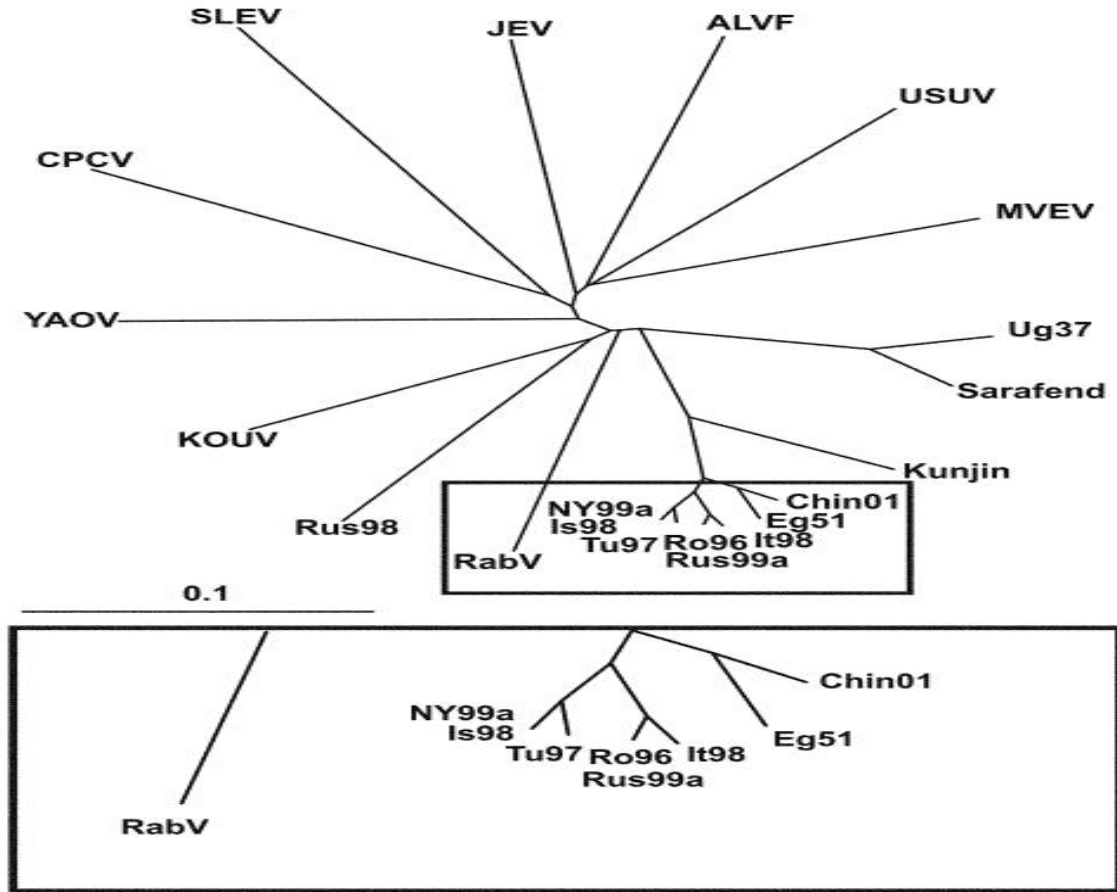
Şekil 2.1. BNV'nin global dağılımı (16)

2.1.2. FİLOGENİ

Filogenetik çalışmalarda son gelişmeler, dokuz BNV hattını göstermektedir. Lineage 1 ve Lineage 2 en yaygın olarak kabul edilir, ancak Lineage 1 diğerlerinden daha yaygındır ve en az iki farklı dala bölünmüştür. Clade 1a esas olarak Avrupa, Afrika ve Amerika'da bulunurken, Kunjin Virüsü olarak da adlandırılan Clade 1b sadece Okyanusya'da bulunmuştur (17). Lineage 2 ise, Afrika ve Madagaskar'da bulunan izolatları ve Avrupa'daki son salgınları (Macaristan, Yunanistan ve İtalya) içermektedir (18). İkinci Lineage'in birinci Lineage'den daha az patojenik olduğu düşünülmüş, ancak daha sonra iki Lineage'in değişen derecelerde patojenik yeteneğe sahip olduğu ortaya konulmuştur (19).

Rabensburg Virüsü olarak da bilinen Lineage 3, Çek Cumhuriyeti'ndeki *Culex pipiens* sivrisineklerinden sıklıkla izole edilen daha az yaygın Lineage'lerden birisidir (20). Lineage 4'ü Rus suşu temsil etmektedir (21). Lineage 5, Hindistan'dan gelen suşları içermekte olsa da bazı araştırmalar onu Lineage 1'in farklı bir alt grubu olarak da sınıflandırmaktadır (clade 1c) (22). Lineage 6 İspanya'da izole edilmiştir ve küçük bir gen fragmanına dayalı dizi çeşitliliği

Humma Virüsü, Deng Virüsü ve Zika Virüsü gibi) içerir. BNV, Japon Ensefalit Virüsü (JEV) antijenik gruplarından biri olarak kabul edilmekte ve ayrıca gruba, St. Louis Ensefalit Virüsü (SLEV), Cacipacore Virüsü (CPCV), Koutango Virüsü (KOUV), Yaounde Virüsü (YAOV), Usutu Virüsü (USUV), Murray Valley Ensefalit Virüsü (MVEV), ve Alfuy Virüsü (ALFV) de dahil edilmektedir (Şekil 2.2.) (28).

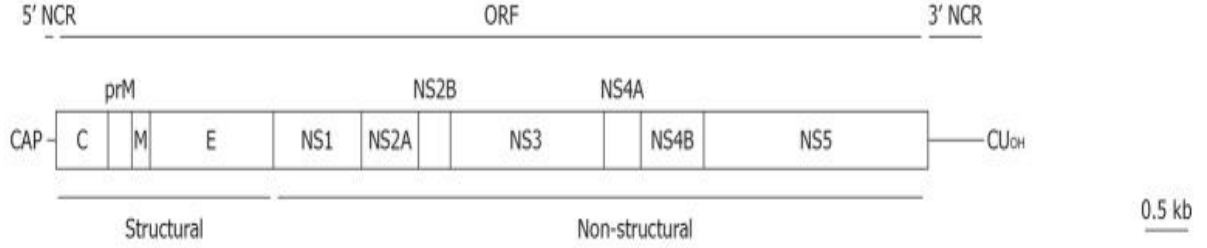


Şekil 2.3. Japon Ensefalit Virüsü (JEV) antijenik grubu (28)

2.1.4. BNV'NİN YAPISI VE GENOMU

Batı Nil virüsü (BNV), zarflı, pozitif sarmallı bir RNA virüsüdür. Virion yaklaşık 45 - 50 nm çapındadır ve 11.000 nükleotitten oluşan RNA genomu içerir. Virionun genomik RNA'sı, bir ikosahedral kapsid ve iki katmanlı zarf ile kuşatılmıştır. Genom, hücresel ve viral proteazlar tarafından on proteine bölünür ve yaklaşık 3000 amino aside çevrilir. On proteinden yapısal proteinler olarak isimlendirilen üçü (zarf proteinleri (E), kapsid proteini (C) ve ön membran

(prM)), virion oluşumu için gereklidir. Diğer yedi protein ise (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B ve NS5), yapısal olmayan proteinler olarak adlandırılır ve genom replikasyonu için gereklidir (29).



Şekil 2.4. Batı Nil virüsü genomunun organizasyon şeması (29)

2.1.4.1. Yapısal Proteinler (SP)

Yapısal proteinler, kapsid proteini (C), öncül zar (prM/M) ve zarf proteininden (E) oluşur. Bu proteinler viryon oluşumu için gereklidir ve viryon oluşumu, virüs girişi ve füzyonunun yanı sıra viral genomun kapsidasyonunu içerir. Tüm yapısal proteinler genomun 5' ucunda yer alır. Kapsid proteini (C), RNA genomunu bağlamanın yanı sıra RNA'yı olgunlaşmamış viryonlara paketler (30). Öncül membran (prM) proteini, furin tarafından M proteini olmak üzere bir kez daha bölünür. Öncül membranın (prM), virüsün füzyonu sırasında E proteinini erken füzyona uğramaktan koruduğu düşünülmektedir. M proteininin varlığı, virüsün hücreye girişi için gerekli olan proteinleri aktive eder (31). E proteini ise hedef hücre üzerindeki reseptörlere bağlanır ve dolayısıyla virüsün girişini kolaylaştırır. Ayrıca virüsün serotip özgüllüğünü de tespit eder (32).

2.1.4.2. Yapısal Olmayan Proteinler (NSP)

Yapısal olmayan proteinler (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B ve NS5) esas olarak viral replikasyonun düzenlenmesinden ve ayrıca transkripsiyon ve translasyon mekanizmalarının düzenlenmesinden sorumludur ve genomun 3' ucunda yer alırlar.

NS1, hastanın serumunda yüksek miktarlarda üretilen bir glikoproteindir. Protein, viral replikasyon için bir kofaktör olarak önemli bir rol oynar (33). NS2A proteininin birçok işlevi vardır. Viral birimlerin toplanması ve olgunlaşmasında, viral replikasyonda ve konakçı hücre

ölümünün indüklenmesinde rol oynar. Ayrıca interferon reaksiyonunu da engellediği bilinmektedir (34). NS2B ise NS2A gibi hidrofobik bir proteindir. Bu protein, NS3 proteolitik aktivitesi için bir kofaktör protein olarak işlev görür (34).

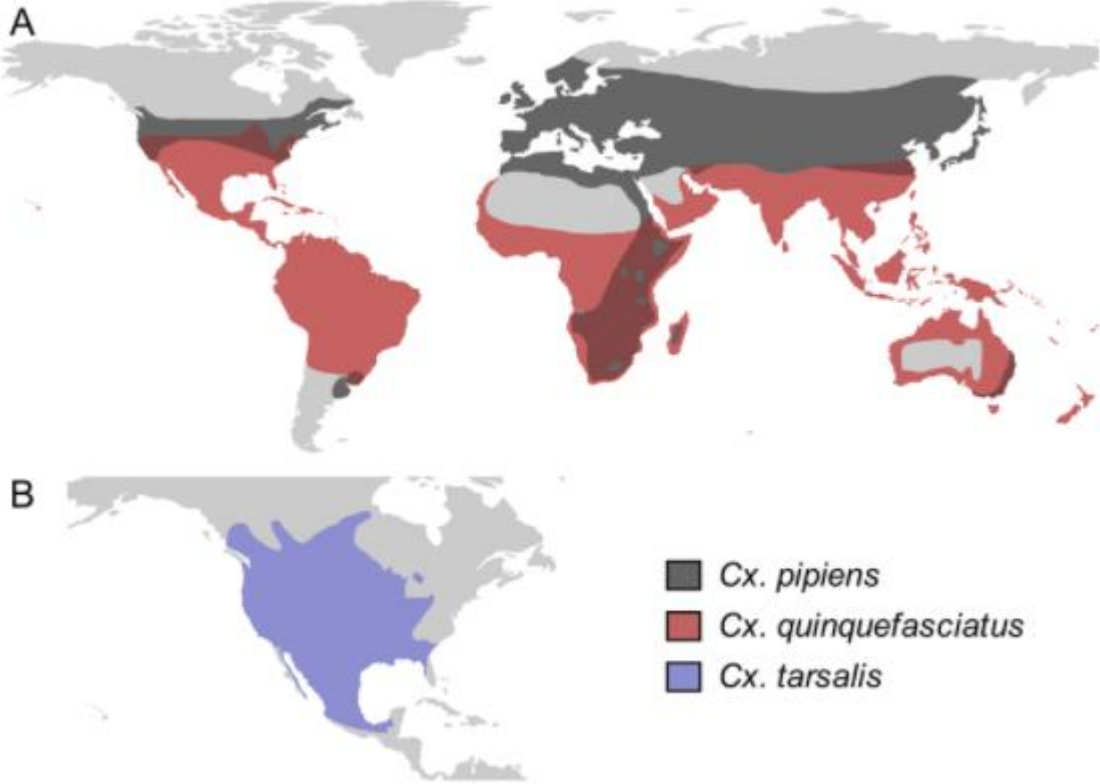
NS3 proteini, diğer yapısal olmayan proteini üretmek için poliproteini parçalamak için gerekli olan viral proteaz aktivitesinin yanı sıra helikaz ve NTPaz enzim aktivitelerini de kodlar (35). NS4A endoplazmik retikulumun bir modifikasyonu ve hızlı genişlemesi için gereklidir, ayrıca NS3 helikaz aktivitesini de düzenler (36). NS4B ise, interferon sinyalini bloke eder (37). Son olarak, diğer yapısal olmayan proteinler arasında en büyük yapı olarak kabul edilen NS5 proteindir. NS5 proteini, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) ve adenosil metionin metiltransferaz olan iki enzimi kodlar (38).

2.1.5. YAŞAM DÖNGÜSÜ VE BULAŞMA YOLU

BNV'nin bulaşması, çoğunlukla *Culex* türleri olmak üzere, enfekte sivrisineklerin ısırması ile meydana gelir. Virüsün bulaşma yoğunluğu, bulunduğu ortama, sivrisinek yoğunluğuna ve beslenme alışkanlıklarına göre değişir. Kuşların birincil konak olduğu kabul edilir, ancak aynı zamanda insanları, atları, kedileri, köpekleri ve diğer memelileri de enfekte edebildikleri bilinmektedir. Bununla birlikte, memeliler (Son) (Dead-end) konaklar olarak kabul edilir (Şekil 2.6.). Sivrisinekler, enfekte olmuş kuş kanıyla beslendiklerinde virüs ile enfekte olurlar. Virüs, 10 gün ile 2 hafta arasında değişen bir kuluçka süresi boyunca sivrisineklerin içinde kalır. Sivrisinekler de virüsü, diğer hayvanlara ve insanlara bulaştırabilir. Bununla birlikte, hayvanlar ve insanlar arasında herhangi bir bulaşma vakası bildirilmemiştir. Virüs, enfekte hayvanın kan veya dokuları, anne sütü, organ nakli ve kan nakli ile temas yoluyla da bulaşabilir.

Culex sivrisinekleri birincil bulaşma vektörü olarak kabul edilir. Ancak BNV, farklı ülkelerde farklı *Culex* türlerinden izole edilmiştir. Batı Amerika Birleşik Devletleri'nde *C. tarsalis* birincil bulaşma vektörü olarak kabul edilirken, Doğu Amerika Birleşik Devletleri'nde *C. pipiens* en yaygın olanıdır (39). Kuzey Amerika'da ana vektörler *C. pipiens* ve *C. restuans* iken, Güney Amerika'da *C. quinquefasciatus* olarak bildirilmiştir. *C. annulirostris*, Avustralya'daki ana vektördür. Asya'da *C. quinquefasciatus*, *C. tritaeniorhynchus* ve *C. vishnui* var olmuştur.

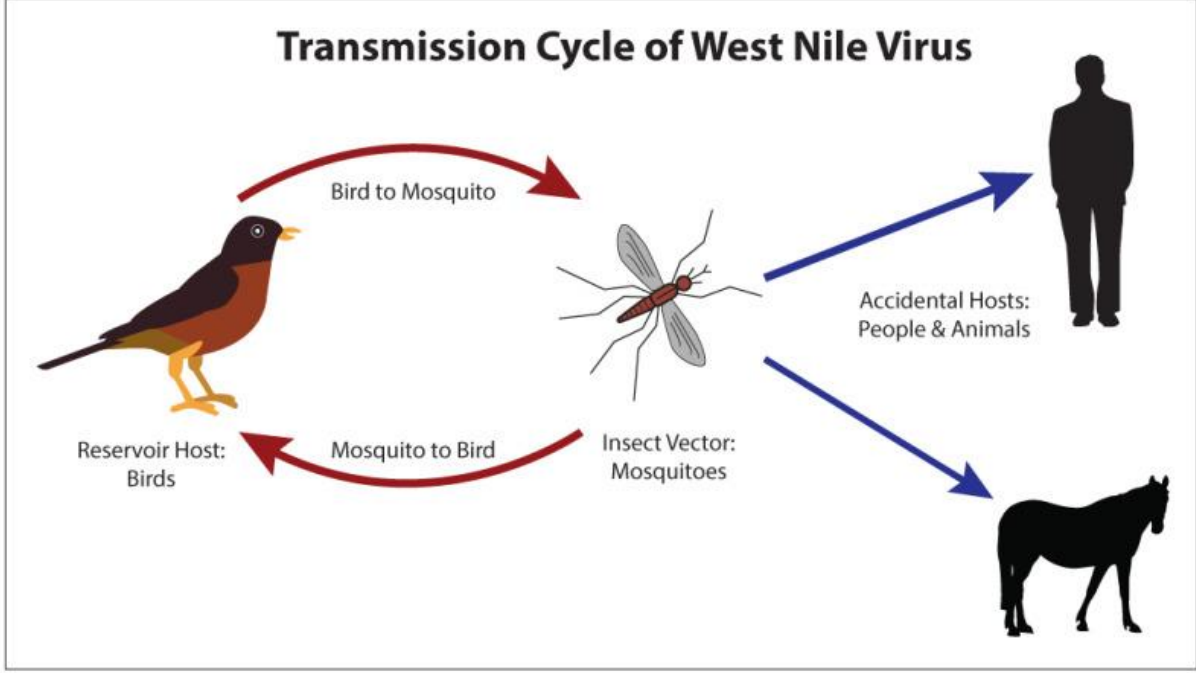
Avrupa'da *C. pipiens*, *C. modestus* ve *Coquillettidia richiardii* türleri BNV döngüsünde rol oynamaktadır. Afrika ve Orta Doğu'da *C. univittatus* ortak vektördür. Batı Nil virüsü için rapor edilmiş birincil olmayan vektörler de vardır. Bunlar *Anopheles*, *Psorophora*, *Deinocerites*, *Uranoteania*, *Culiseta*, *Aedes*, *Mansonia*, *Mimomyia*, *Orthopodomyia*, *Aedemomyia* ve *Coquillettidia*'dır.



Şekil 2.5. Batı Nil virüsünün birincil vektörlerinin coğrafi dağılımı: (A) *Culex pipiens* (koyu gri) ve *Culex quinquefasciatus* (kırmızı), (B) *Culex tarsalis* (mavi) (40)

Virüs, sivrisineklerin içinde düşük sıcaklıklarda çoğalmadığı için göçmen kuşlar virüsün daha sıcak bölgelere yayılmasında önemli bir rol oynar. Bunun nedeni, kuşların yüksek düzeyde viremi üretmesidir ve dolayısıyla BNV için önemli bir rezervuardır. Bu, memelileri kanlarındaki düşük viremi seviyelerine sahip olduklarından, BNV için (Son) (dead-end) bir konakçı haline getirecektir. Bilim adamları daha önce WNV'nin kuşlara bulaşmadığına inanıyorlardı, ancak

yapılan araştırmalarla BNV virüsünün bazı suşlarının kuşların ölümüne neden olabileceği veya hastalık belirtileri gösterebileceği gösterilmiştir (41). Kuşlar, hastalık belirtileri göstermeden enfekte olabilir ve böylece virüsün taşıyıcısı olarak hareket edebilirler.



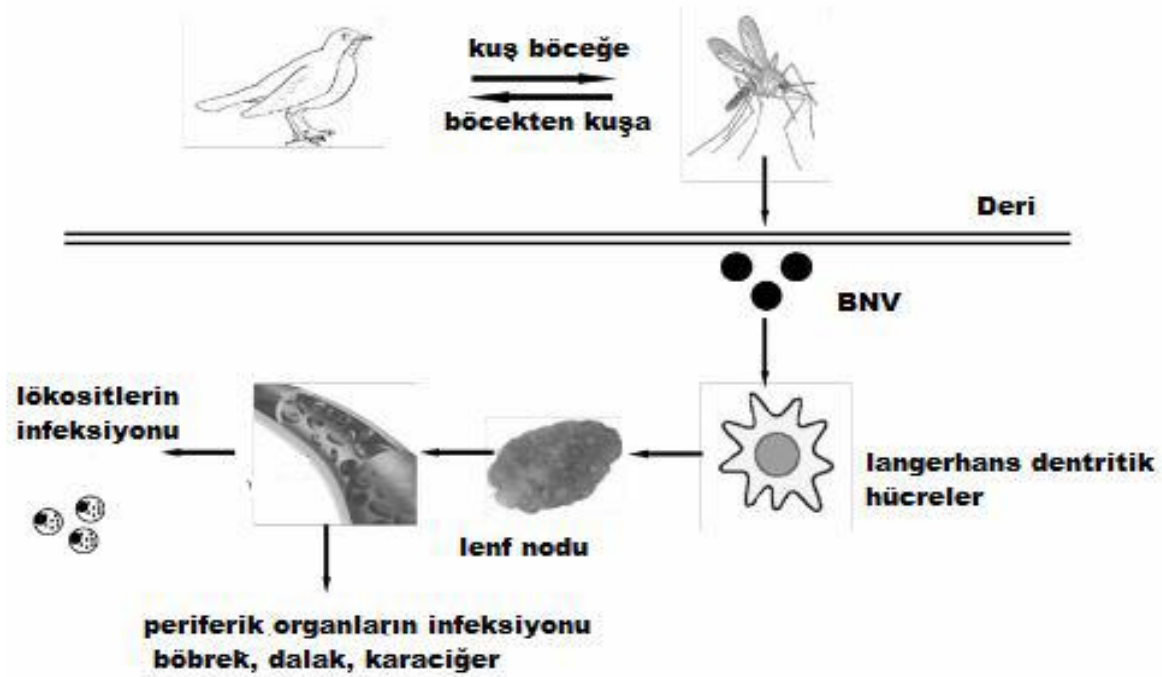
şekil 2.6. Batı Nil Virüsü Biyolojik Döngüsü (8)

2.1.6. PATOGENEZ VE BAğIşIKLIK YANITLARI

Sivrisinekler, enfekte olmuş kuşların kanıyla beslendiklerinde virüs ile enfekte olurlar. Virüs, 10 gün ile 2 hafta arasında değişen bir inkübasyon süresi boyunca sivrisineklerin içinde kalır. Bu dönemde virüs mezenter epitel hücrelerinin içinde çoğalmaya başlar. Tükürük bezlerinde virüs üretmesi devam eder (42). Sivrisinekler, sırayla, başka bir kan emme işlemi sırasında virüsü deri altından diğer hayvanlara ve insanlara inokule eder.

BNV ile insanların enfeksiyonu büyük olasılıkla asemptomatik olduğundan, bu virüsün patogenezi anlamak çok zordur. Bu nedenle, BNV'nin patogenezi anlamak için kemirgen modelleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır (43). Virüsün kutanöz enjeksiyonunu takiben virüs ilk olarak deri Langerhans dendritik hücrelerinde replike olur (44). Daha sonra virüs, lenf

düğümlelerinde, foliküler dendritik hücrelerde, B hücrelerinde ve makrofajlarda replikasyona devam eder. BNV, bölgesel lenf düğümlerini enfekte ederken, dendritik hücreler (DC), bulaşıcı yayılmayı kısıtlamak için interferon (IFN) tip 1 ve tip 2'yi salgılar. Virüs nihayet torasik lenf kanalı ve lenf kanalları yoluyla kan dolaşımına girer ve birincil viremi oluşturur. Viremi, sırayla, virüsün karaciğer, böbrek, dalak, epitel hücreleri ve makrofajlar gibi retiküloendotelial sistem organlarına bulaşmasına neden olur (Şekil 2.7.) (45). İmmün yanıt ve özellikle antiviral interferon (IFN) tip I yanıtı virüsü periferik dokulardan temizlediğinden, virüsün kandan izole edilme olasılığı azalmaya başlar.



Şekil 2.7. BNV enfeksiyonlarının deriye girdikten sonraki ilk patogenezi (45)

Ayrıca virüs yüksek konsantrasyonda beyine ulaşabilir, virüs kan-beyin bariyerini geçer ve merkezi sinir sistemine (CNS) girer. Ancak bazı çalışmalar, makrofaj inhibitör faktör (MIF) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi bazı çözünür yangısal faktörlerin de virüsün beyne bulaşmasına yardımcı olduğunu göstermiştir (46). Virüs ayrıca olfaktör nöron enfeksiyonu ile bulaşabilir ve olfaktör loba yayılabilir veya aksonal retrograd yolla enfekte periferik nöronlardan beyin omurilik sıvısına (BOS) geçiş yapabilir (47). Virüs sinir sistemine ulaştığında

beyin korteksi, hipokampus, bazal gangliyonlar, beyincik, beyin sapı ve omuriliği enfekte eder, ayrıca dokularda iltihaplanmaya, hücrelerde işlev bozukluğuna ve parçalanmaya neden olur.

Doğuştan gelen bağışıklık sistemi hücreleri, BNV enfeksiyonunun kontrolü için çok önemli olup, özellikle üç tipi (Tip I (IFN- α ve IFN- β), tip II (IFN- γ) ve tip III (IFN- λ)) olan interferonlar bu bağışıklıkta kritik rol oynamaktadır. İnterferon (INF) Tip I, en yaygın doğuştan gelen bağışıklık kontrolü olarak kabul edilir. İnterferon (INF) Tip I, lökositler ve parankimal hücreler tarafından üretilen IFN- α/β içerir ve antiviral gen fonksiyonlarının düzenlenmesini indükler. Ek olarak, tip I IFN'ler, dendritik hücre, B ve T hücrelerinin olgunlaşmasını indükleyerek doğuştan gelen bağışıklık ile adaptif bağışıklık arasında bağlantı kurmada rol oynar (48).

İnterferon tip II (IFN- γ), T hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücreler tarafından salgılanır. IFN- γ , miyeloid hücreleri aktive ettiğinden ve ardından Th1-Th2 polarizasyonunu, CD 4+ T-hücre aktivasyonunu indüklediğinden ve ana doku-uyumluluk kompleksi (MHC) Sınıf I moleküllerinin hücre yüzeyi ekspresyonunu arttırdığından, adaptif immün yanıtın modüle edilmesinde rol oynar. Ek olarak, IFN- γ , bir antiviral durumu indüklemeye rol oynar. IFN- γ veya IFN- γ reseptörü eksikliği olan fareler üzerinde çalışmalar yapılmış ve virüsün farelerde öldürücülüğü artırdığı tespit edilmiştir. Bu çalışma, interferonun ana fonksiyonunun BNV enfeksiyonunu kontrol etmek olduğunu göstermiştir (49).

Daha önce IL-28a/b ve IL-29 olarak bilinen interferon tip III (IFN- λ), enfeksiyonun kontrolünde de rol oynar. Enfeksiyonu kontrol ettiği mekanizma hala tam olarak açık değildir, ancak duyarlı hücrelerde BNV benzeri parçacıklar tarafından enfeksiyonu önlediği tahmin edilmektedir. Ancak, bu sitokinin eklenmesinden önce enfekte olan hücrelerde viral replikasyonu inhibe etmede başarısız olur (50).

Hem hücresel hem de humoral bağışıklık BNV virüs enfeksiyonunun kontrolünde önemli bir rol oynar. Çalışmalar, CD8+ veya CD4+ T hücrelerinin varlığının geçici olarak viral yükü azaltma ile ilişkili olduğunu kanıtlamıştır (51). Böylece, onların yokluğu, BOS'daki enfekte nöronlardan BNV'nin temizlenememesiyle sonuçlanır. RANTES, CXCL10, Kemokin (CC motifi) ve ligand 5 (CCL5) gibi kemokinler, virüsün enfekte olmuş dokulardan temizlenmesini

kolaylaştırır (52). CXCL10'daki bir genetik eksiklik, CNS'ye giden T-hücresi trafiğinin azalmasına neden olur. Böylece, virüs yükleri artar. Son zamanlarda, BNV enfeksiyonlarının patogeneğinde bazı konakçı faktörlerin rol oynadığı bulunmuştur. Bunlardan biri, BNV enfeksiyonu sırasında beyine T-hücre trafiğine izin veren CCR5 kemokindir (53).

2.1.7. TÜRKİYE'DE BNV'NİN EPİDEMİYOLOJİSİ VE DURUMU

Türkiye, BNV salgınlarının meydana geldiği ve insan-hayvan BNV vakalarının sıklıkla tespit edildiği ülkelerle yakından ilişkili bir coğrafyada yer almaktadır. Dolayısıyla, Türkiye, BNV için endemik sayılabilecek bir konumdadır (Şekil 2.1.). Türkiye'de farklı çalışmalarda seroprevalans gösterilmiş olsa da virüsün Türkiye'deki yayılımına ilişkin bilgiler halen kısıtlıdır. BNV'nin insan ve hayvan vakalarının artan sayısı ve sivrisinek surveyans çalışmalarından elde edilen sınırlı bilgiler, enfeksiyonun Türkiye'de önemli bir halk sağlığı sorunu haline geldiğini göstermektedir (54).

Ağustos 2010'da Türkiye'de Sağlık Bakanlığı, Türkiye'de BNV'nin varlığına ilişkin ilk resmi açıklamayı duyurmuştur (55, 56). 1964 yılında, Türkiye'de insan Arbovirüs enfeksiyonları ile ilgili ilk çalışma Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü'nden Heperkan ve Arı (57) tarafından yapılmıştır. Farklı illerden toplanan (İzmir, Erzurum, Adana ve Diyarbakır) 559 serum örneği ile yapılan çalışma, Arbovirüslere karşı antikor araştırması için hemagglütinasyon inhibisyon yöntemini içermekte ve Arbovirüslerin neden olduğu bir hastalığın varlığını bildirmektedir. Çalışma ayrıca ilerleyen yaşla birlikte seropozitifliğin arttığını göstermiştir. Daha sonra 1966 yılında Serter, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'ne getirilen hastaların üçte birinin viral olduğunu ve bu enfeksiyonların büyük çoğunluğunun Arbovirüslerden kaynaklandığını kanıtlamıştır (58).

Başka bir araştırma, Viyana Üniversitesi'nden Radda tarafından yapılmıştır (59). Orta ve Doğu Anadolu illerinden evcil hayvanlar ve serbest yaşayan farelerden alınan 214 serum örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışma, Ankara ili ve çevresinde aktif bir BNV varlığını göstermiştir. Hatay ilinde de virüsün aktif olduğuna dair kanıtlar vardır. Hatay ilinde koyunların %1,29'unda (2/155) TBEV nötralize edici antikorların saptanması ile yapılmıştır (55). 1970'lerin

ikinci yarısında Güneydoğu Anadolu bölgesinde hemaglutinasyon inhibisyonu (HI) yöntemi kullanılarak bir çalışma yapılmıştır. BNV seropozitifliği çalışması için 937 kişiden serum örnekleri alınmış ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde farklı ilçelerde %38 ile %47,8 arasında değişen çok yüksek oranlarda seropozitiflik saptanmıştır. Çalışma ayrıca, ilerleyen yaşla birlikte seropozitifliğin arttığını göstermiştir. Öyle olsa bile, bu çalışmada ve karşılaştırılabilir çalışmalarda elde edilenlerin Flavivirüsler arasında gözlenen antijenik çapraz reaksiyonlardan kaynaklanması son derece muhtemeldir ve hemaglutinasyon inhibisyonu (HI) yöntemi gibi gruba özgü testlerde ortaya çıkarılmıştır (60).

2006 yılında Özkul ve ark. 10 farklı ilden (Hatay, Adana, Antalya, Muğla, İzmir, Şanlıurfa, Bursa ve Ankara) insan ve çeşitli hayvanlar üzerinde seroepidemiolojik bir çalışma yürütmüştür. Bu çalışmada, 764 serum örneğinde BNV'ye karşı nötralize edici antikor varlığı araştırılmış ve seropozitiflik köpeklerde %37,7, atlarda %13,5, sığırlarda %4, katırlarda %2,5, koyunlarda %1, ve insanlarda %20,4 olarak bildirilmiştir (61). 2012 yılında Özkul ve arkadaşları tarafından Orta ve Kuzey Anadolu'da yapılan bir başka çalışmada, BNV araştırması için insanlarda ve atlarda akut CNS enfeksiyonlarından 2516 kan örneği toplanmış ve bu örneklerde viral RNA tespit edilmemesine rağmen, BNV'nin IgM açısından reaktif olduğu bulunmuştur. %0,99'luk (25/2516) bir IgG pozitifliği de tespit edilmiş ve örneklerin %0,56'sı (14/2516) bir plak azaltma nötralizasyon testi ile doğrulanmıştır (62).

Güneydoğu Anadolu'da BNV seroprevalansını araştırmak için yapılan başka bir çalışmada, 181 serum örneği, indirekt immüno floresan testi (IIFT) ile BNV IgG için değerlendirilmiştir. BNV IgG için pozitif serum, ayrıca plak azaltma nötralizasyon deneyi (PRNA) ile analiz edilmiştir. Sonuç, IIFT yöntemi ile %16 (29/181), plak redüksiyon nötralizasyon (PRNT) yöntemi ile %9,5 (17/179) olarak bildirilmiştir (63). Başka bir çalışma, etiyolojisi bilinmeyen steril menenjit/ensefalit vakalarından BNV'ye karşı IgG (hastaların %9,2'sinde) ve IgM (hastaların %3,4'ünde) antikorlarının varlığını bildirmiştir. 87 serum ve BOS örneği ELISA ve IFA tekniği ile değerlendirilmiş, ardından pozitif bulunan örnekler real-time PCR tekniği ile doğrulanmıştır. Serum numuneleri, BNV'ye karşı antikor ile pozitif olmasına rağmen, BOS örnekleri, gerçek zamanlı PCR ile viral RNA için negatif bir sonuç vermiştir. Hatta bazı örnekler, Dang Humması ve Sandfly Ateşi Virüslerine karşı antikor pozitifliği göstermiştir. Bu da virüsün epidemiyolojisi

ve Türkiye'deki ekolojik özellikleri hakkında iyi bir bilgiye ihtiyaç olduğunu göstermektedir (64).

Sonuç olarak, yukarıdaki verilere göre virüsün Türkiye'deki varlığı küçümsenemeyecek kadar önemlidir. Virüse maruziyet insanlarda ve hayvanlarda gösterilmiştir. Bu durum, virüsün aktif hastalık yokluğunda uzun süre hayatta kalmasına bağlanmaktadır (55).

2.2. NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TEKNİKLERİ

Nükleik asit amplifikasyonu, birçok bilim insanı tarafından değerli bir teknik olarak kabul edilmektedir. Bu teknikler, doğru tanı koyma kapasitesinin yüksek olması nedeniyle genetik bozuklukların ve bulaşıcı hastalıkların teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu teknikler, yaygın olarak kullanılan PCR-dayalı tespit (65, 66), nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon (NASBA) (67), self-sustaining sequence replikasyonu (3SR) (68) ve sarmal yer değiştirme amplifikasyonu (SDA) (69, 70) içermektedir. Bu tekniklerin her biri, nükleik asidi diğerlerinden farklı bir şekilde amplifiye etme yöntemine sahiptir. Örneğin, 3SR ve NASBA, hedef sekansı çoğaltmak için ısı denatürasyonu yerine bir transkripsiyon ve ters transkripsiyon reaksiyonunun seti kullanır. Benzer şekilde, SDA, DNA'yı çoğaltmak için ısı denatürasyonu yerine bir dizi restriksiyon enzimi sindirimi ve sarmal yer değiştirme DNA sentezi kullanır. Bunun aksine, PCR, DNA'yı çoğaltmak için çift sarmallı DNA'nın denatürasyonuna bağlıdır.

Son zamanlarda, ilmiğe dayalı izotermal çoğaltma (LAMP) en popüler amplifikasyon tekniklerinden biri olarak geliştirilmiştir. Bu yöntem esas olarak, hassaslığı, hızı, özgüllüğü ve basitliği nedeniyle tercih edilmektedir. Hedef DNA'nın altı farklı bölgesine özel dört primer gereklidir ve reaksiyon, izotermal koşullarda başlar, ardından primerler, bir ilmek yapısı oluşturarak reaksiyonu hızlandırır.

2.2.1. İLMİĞE DAYALI İZOTERMAL ÇOĞALTMA (LAMP)

Yeni geliştirilmiş bir gen amplifikasyon yöntemi olan ilmiğe dayalı izotermal çoğaltma (LAMP), hız, basitlik ve yüksek özgüllüğü birleştirir. Bu yöntemeye dayalı olarak geliştirilen testlerde nükleik asitlerin ekstraksiyonundan amplifikasyonun tespitine kadar olan tüm

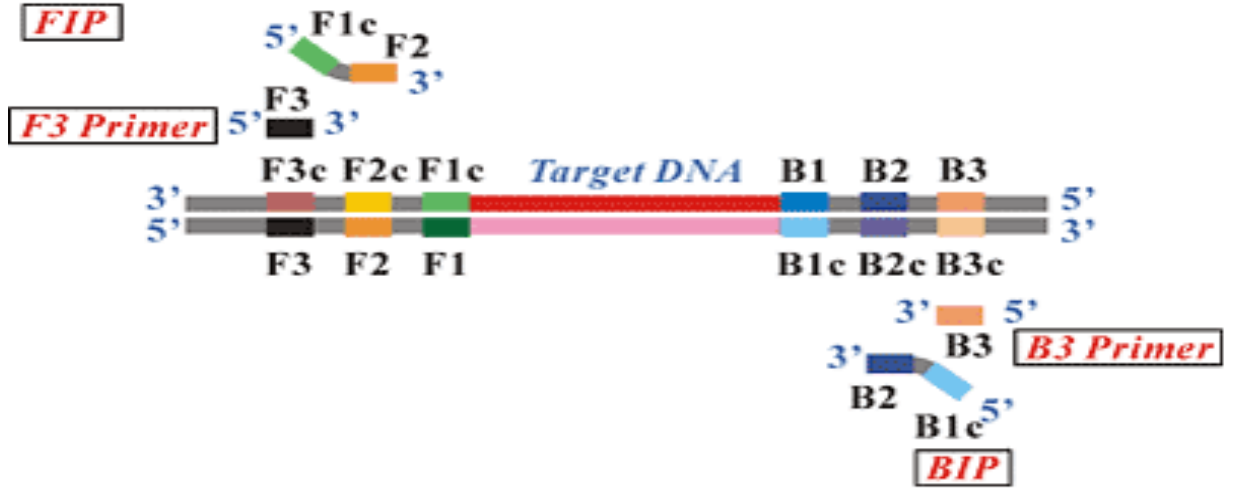
aşamalarda özellikle basitlik korunmuştur. LAMP reaksiyonu, yetersiz kaynak ortamlarında genetik testi (gelişmekte olan ülkeler gibi) ve gıda ürünleri ve çevresel örneklerin hızlı testi ve bakım-noktası testi dahil olmak üzere çok çeşitli olası uygulama alanlarında kullanılmaktadır (71).

2.2.1.1. LAMP Prensibi

LAMP prensibi, izotermal koşullar altında otomatik döngüye ve *Geobacillus stearothermophilus*'tan elde edilen Bst polimerazın aracılık ettiği yüksek DNA zinciri yer değiştirme aktivitesine dayanmaktadır. Süreç iki adımdan oluşur: Döngüsel adım ve Döngüsel olmayan adımdır (72). Reaksiyon, Bst polimeraz aktivitesi için gereken sıcaklık olan 60-65° C'lik bir sıcaklıkta gerçekleştirilir (73). Notomi ve arkadaşlarının çalışmasında (5), LAMP reaksiyonu, hedef kalıp içinde altı farklı sekansı tanıyabilen dört primerden oluşan bir set içermektedir. Bu dört primer, iki dış primerdir (ileri dış primer (F3) ve geri dış primer (B3)) ve iki iç primerdir (ileri iç primer (FIP) ve geri iç primer (BIP)) içermektedir. Dış primerler, hedef DNA'nın yalnızca bir harici sekansını tanıırken, iç primerler, hedef DNA'nın bir sens ve bir anti-sens dizisini tanıyan iki farklı diziden oluşmuştur (5).

2.2.1.1.1. Döngüsel Olmayan Adım

Döngüsel olmayan adım 65 °C'de gerçekleştirilir, bu sıcaklıkta primerler spesifik diziye hibritlenebilir (5, 74). İleri iç primer, orijinal hedef sekans ile hibritleşir ve yeni ileri ipliğin sentezi, ileri iç primer tarafından çevrelenen 3' uçtan başlar. Daha sonra, ileri dış primer, aynı orijinal hedef sekansla tekrar hibritlenir ve bu yeni ileri ipliğin sentezi, enzim, iç primerin kullanılmasıyla oluşturulan ilk ipliğin 5' ucunu bulana kadar devam eder (Şekil 2.8.). Sonradan, LAMP'da kullanılan enzimin özelliklerinden dolayı, ileri iç primerin kullanılmasıyla oluşturulan ilk ileri ipliğin yer değiştirmesi meydana gelir. Daha sonra, ayrılmış iplik bir ucunda ilmekli bir yapı oluşturacaktır. Bu, iç primerin ters sekansının hedef sekansa tamamlayıcı olması nedeniyle oluşur. Bu tek sarmallı DNA, geri primerler (BIP ve B3 primerler) için bir kalıp olarak görev görür. Bu daha sonra, ileri ipin iplik kaymasını üretecektir. Dolayısıyla, halter (dumbbells) benzeri bir DNA yapısı oluşturacaktır (5, 72).



Şekil 2.8. LAMP'ın primer seti konumunu ve kalıptaki karşılık gelen sekansını temsil eden tipik harita. BL: ilmik primer B-ilmik; FL: ilmik primer F-ilmik; F3: ileri dış primer; FIP: ileri iç primer; B3: geri dış primer; BIP: geri iç primer. Her primerin, hedef dizideki renkle eşleşen bir rengi vardır

2.2.1.1.2. Döngüsel Adım

Bu aşamada, ileri iç primer, bir ilk adım sırasında oluşan ipliğin ilmeğine hibridize olur ve stem bölgesinde hedef sekansın ters çevrilmiş bir kopyasını ve karşı tarafta bir ilmek ile yeni bir iplik üretmek için ipin yer değiştirmesini kolaylaştırır. Dolayısıyla, self-priming sarmal yer değiştirme DNA sentezi sürecinden kaynaklanan iki ürün vardır. Bu ürünlerden biri tamamlayıcı iplik, diğeri ise çift uzun stemli başka bir ipliktir. Her iki yapı daha sonra sonraki amplifikasyon döngüleri için kalıp olarak kullanılır. Bu, döngünün her yarısında hedef dizinin üç kat amplifiye edilmesine imkan sağlamaktadır (5, 72). Bst DNA polimerazın yüksek yer değiştirme aktivitesi sayesinde, yüksek moleküler ağırlıklı büyük miktarda DNA hızla üretilir (75, 76). Dolayısıyla, hedef DNA bir saat içinde 10^9 kopyaya kadar çoğaltılabilir. Son olarak, birden çok ilmeğe sahip, farklı uzunlukta ve karnabahar benzeri yapılarda stem-ilmek DNAları oluşturulur (77).

2.2.1.1.3. LAMP Hızlanması

LAMP reaksiyonu hızlandırmak amacıyla, ilmik primerleri (ileri ilmik (LF), geri ilmik (LB)) adı verilen iki ek primer eklenebilir (78). İlmek primerler, stem-ilmekleri ile hibritlenir, ancak iç primerler tarafından halihazırda hibridize edilmiş ilmeklerle değil (78).

2.2.1.2. LAMP Primerlerinin Tasarımı

Tüm nükleik asit amplifikasyonuna dayalı tekniklerde primer tasarımı, sonuçların başarısını ve kalitesini etkileyen en kritik faktörlerden biridir (79). LAMP primerlerinin tasarımı, hedef dizideki altı ile sekiz bölgenin seçimine dayanmaktadır.

LAMP primerlerini tasarlarken, ikincil yapıların oluşumundan kaçınmak önemlidir (primer dimer oluşumu), özellikle iç primer için, çünkü bunların uzunluğu 40 nükleotide kadar ulaşabilir. FIP iki diziden oluşur; 3' ucunda F2c bölgesine tamamlayıcı olan F2 dizisi ve 5' ucunda F1c bölgesi ile aynı dizi vardır. BIP'in ise; 3' ucunda B2c bölgesine tamamlayıcı olan B2 dizisi vardır ve 5' ucunda B1c bölgesi ile aynı diziye sahiptir. LP primerinin tasarımı, F1 ile F2 arasındaki bölgeye karşılık gelen tamamlayıcı bir sarmal (LF primer için) ve B1 ile B2 arasındaki bölgeye karşılık gelen başka bir tamamlayıcı sarmalın (LB primeri için) kullanılmasına bağlıdır (Şekil 2.8.).

2.2.1.2.1. LAMP Primer Tasarım Yazılımı

Primer tasarımının karmaşıklığı nedeniyle birçok farklı hem ücretsiz hem de lisanslı olarak yazılım mevcuttur. Eiken Chemical Co. tarafından sağlanan, özellikle LAMP tekniği için ücretsiz bir primer tasarım yazılımı olduğundan literatürde en yaygın olarak kullanılan Primer Explorer V4 (PE4)'dür (80). Fakat, LAVA (LAMP Assay Versatile Analysis) (81) ve LAMP Designer (Optigene, Horsham, İngiltere) gibi diğer yazılımlar, mevcut özellikleri iyileştirerek, farklı özellikleri de kazandırmak için geliştirilmiştir. Tasarlanan primerleri çapraz homolojilerden içermezler ve çoklu sekans hizalamasına dayalı primer tasarımına izin verirler.

2.2.1.3. Ters Transkripsiyon (RT) -LAMP

LAMP tekniği, bir ters transkripsiyon adımı eklenerek RNA için de uygulanabilmektedir. Ters transkripsiyon adımı, genellikle Kanatlı Miyeloblastoz Virüsü (AMV) ters transkriptaz enzimi kullanılır ve bu, tek adımlı bir protokole yapılabilir. Ters transkriptaz enzimleri için gereken sıcaklık, izotermal amplifikasyon için gereken sıcaklıkla aynıdır (60–65 °C) (82).

Orta Doğu Solunum Sendromu koronavirüsü (MERS - CoV) (83), influenza virüsleri (84), Solunum sinsityal virüsü (85), Hepatitis C virüsü (86), Ebola virüsü (87), Zika virüs (88) ve Dang virüsü (89, 90) için RT-LAMP kullanılmıştır. RT-LAMP testi taşınabilir bir şekilde gerçekleştirilebildiği için epidemiyolojik bir süveyans sistemi olarak uygulanabilir hale gelmektedir.

Şu anda, HIV'in RT-LAMP ile tespiti, tekniğin en başarılı kullanımı olarak kabul edilmektedir. RT - LAMP, enfekte edilmiş bireylerde uykuda olan HIV aşamasını teşhis etmek için uygulanmıştır (91). Tüm kandan pozitif HIV-1 tespitinin akıllı telefon görüntüsünü sağlamak için RT-LAMP ile dijital bir cihaz ile birleştirilerek yeni bir gelişme sağlanmıştır (92). Bu gelişme, RT-LAMP testini laboratuvara dayalı gözlemler ve hastane dayalı enfeksiyon kontrolü için çok yararlı hale getirmiştir.

RT-LAMP, bitkileri etkileyen patojenler için de kullanılmıştır. Son zamanlarda, Elma Klorotik Yaprak Lekesi Virüsünün (ACLSV) kaplama proteini genini tespit etmek için kullanılmıştır. RT - LAMP, geviş getiren hayvanlarda (sığırlarda) doğuştan kusurlara neden olabilen sivrisinek kaynaklı bir virüs olan Batai Virüsü (BATV) gibi hayvan patojenleri için de kullanılmaktadır.

2.2.1.4. Amplifikasyon Görselleştirme Yöntemleri

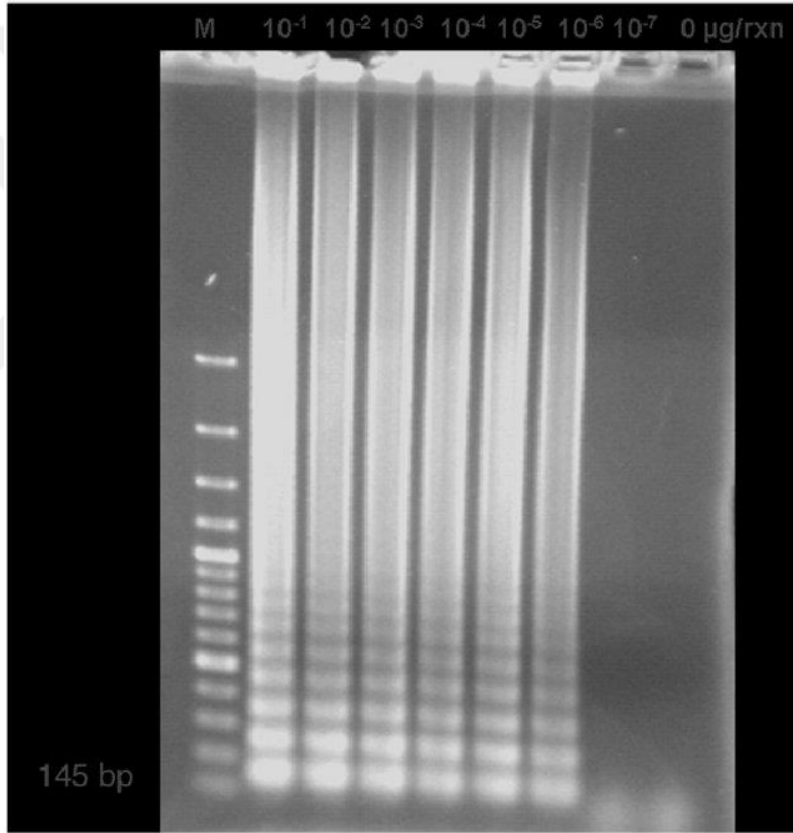
Amplifikasyonun görselleştirilmesi iki yöntem aracılığıyla yapılabilir; bunlardan biri amplifikasyon sırasında sonuçların okunmasına (gerçek zamanlı yöntemler) dayanır, diğeri ise amplifikasyon sürecinin sonundaki sonuçların okunmasına (son nokta tabanlı yöntemler) dayanır.

2.2.1.4.1. Son Noktaya Dayalı Yöntemler

Neredeyse tüm görselleştirme yöntemleri son nokta yöntemlerine dayanmaktadır. Bunun nedeni, yöntemin yüksek hassasiyete sahip olması ve reaksiyon sonuçlarının basit bir görsel yolla (çıplak gözle) okunabilmesidir. Şu anda, agaroz jel elektroforezi, reaksiyon karışımının renk değişiminin gözlemlenmesi, iyon indikatörleri (93) veya floresan molekülleri (etidyum bromür (EtBr) (78) ya da SYBR Green I (94) gibi) gibi farklı LAMP son nokta yöntemleri mevcuttur.

2.2.1.4.1.1. Agaroz Jel Elektroforezi

LAMP amplifikasyonunun görselleştirilmesi, UV ışığı altında %2-%3 agaroz jel kullanılarak agaroz jel elektroforezi ile yapılabilir. EtBr (95), propidium iyodide (96), Picogreen (97) veya SYBR Green I (98) gibi jel boyama için birkaç floresan boya kullanılabilir. Amplifikasyon, değişen stem uzunluğuna sahip stem-ilmek DNA'larının ve birden çok ilmekli karnabahar benzeri yapıların oluşumu ile sona erdiğinden, sonuç jel üzerinde merdiven benzeri bir model olarak görünmektedir (Şekil 2.9.).



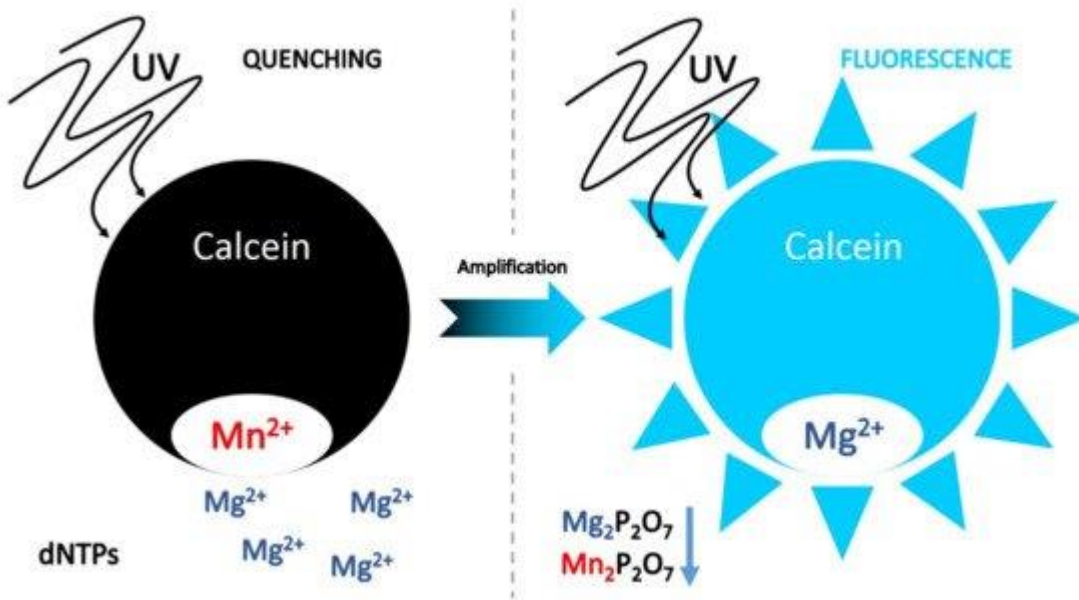
Şekil 2.9. Seri olarak seyreltilmiş LAMP ürünleri için agaroz jel elektroforez analizidir. LAMP tekniği ile amplifiye edilmiş ürünler için farklı boyutlar oluşturulmuştur (merdiven deseni)

2.2.1.4.1.2. İyon İndikatörleri

DNA polimerizasyon işlemi sırasında, yan ürün olarak büyük miktarda magnezyum pirofosfat üretilir. Üretilen magnezyum pirofosfat, reaksiyon karışımındaki magnezyum iyonu ve dNTP'lerden salınan pirofosfat iyonunun kombinasyonundan oluşur (93). Tomita ve arkadaşları

(74) kalsein, manganez iyonu ile birleştirildiğinde floresan metal indikatörü olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. Böylelikle, LAMP tekniğinin tespit sistemi olarak kullanılabilecektir (Şekil 2.10.). Calcein, magnezyum ve kalsiyum gibi iki değerli metalik iyonlarla kompleksler oluşturarak güçlü floresan veren bir metal indikatördür. LAMP amplifikasyonu sırasında, hedef DNA varlığında, yeni oluşturulan pirofosfat iyonu, kalseinini manganez iyonundan mahrum bırakır. Daha sonra kalsein, artık magnezyum iyonu ile birleşerek daha fazla floresans üretir (Şekil 2.10.).

LAMP reaksiyonu, Hidroksi Naftol Mavisi (HNM) adı verilen başka bir metal iyon indikatörü kullanılarak de tespit edilebilir. HNM tespit sistemi ile pozitif bir reaksiyonun büyük ölçüde ayrılmasına izin verilebilir, bu ayırım bir renk değişikliği ile (mordan maviye, Şekil 2.11.E) (99) gözlenebilmektedir. Diğer iyon indikatörlerinde olduğu gibi, reaksiyonun sonucunu görmek için reaksiyon tüpüne ek bir müdahalede bulunmaya gerek yoktur. Dolayısıyla, çapraz kontaminasyon riskini de azaltır. HNM tespit sistemi, bir PCR tüpü veya 96 kuyucuklu bir mikropalakada rahatlıkla uygulanabilir. Sonuçlar hem çıplak gözle hem de bir mikropalaka okuyucu ile absorbands ölçümü (650 nm) ile kolayca değerlendirilebilir.

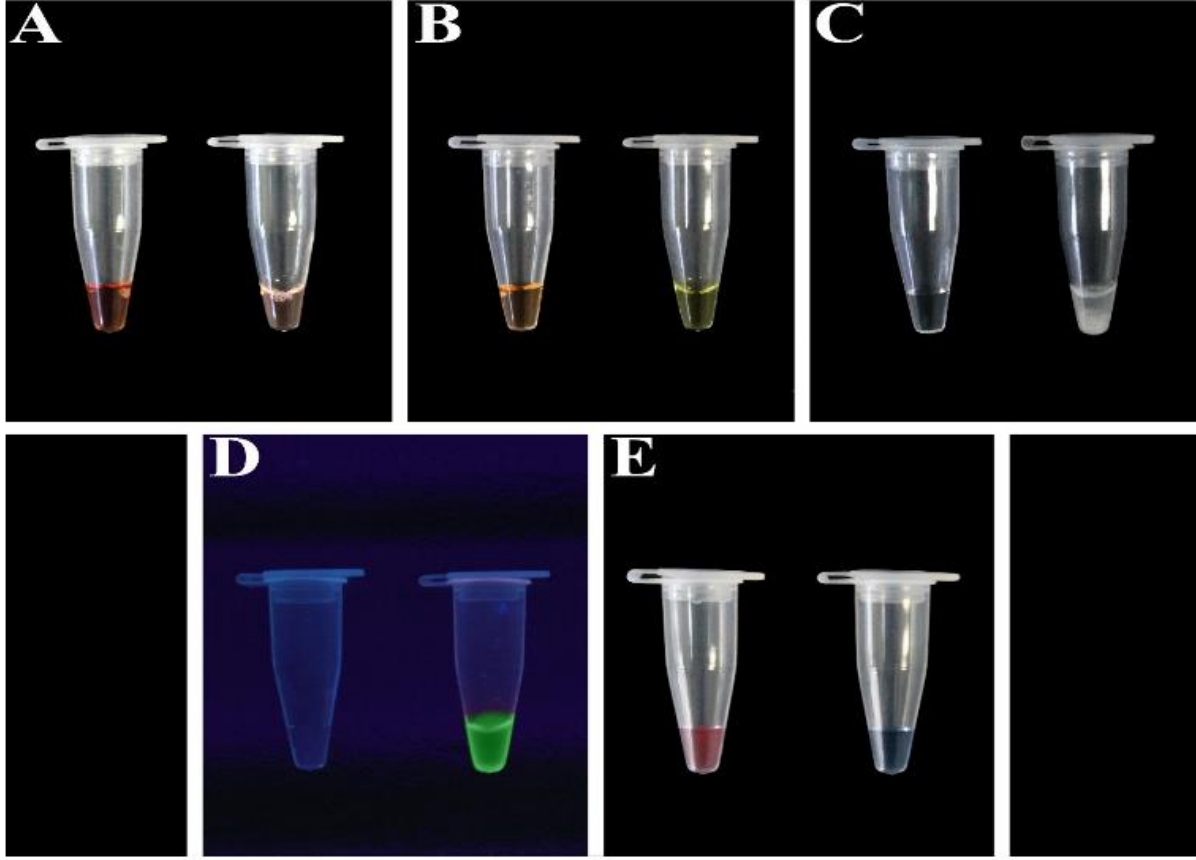


Şekil 2.10. Floresan metal indikatörü olarak kalsein'i kullanılarak saptanması

2.2.1.4.1.3. Floresan Boyalar

Amplifikasyon incelenmesi, EtBr (100) SYBR Green I (101), Picogreen (97) ve propidium iyodür (96) gibi spesifik bir floresan boyanın eklenmesinin ardından bir renk değişikliğinin gözlemlenmesi yoluyla gerçekleştirilebilir. Amplifikasyon sonuçları, reaksiyon tüplerinin dışından gözlenebilir ve böylelikle kontaminasyon riski de azaltılmaktadır. Ek olarak, floresan boyalar doğrudan reaksiyon karışımına eklenebilir ve reaksiyon karışımındaki enzimler gibi diğer elementlerin aktivitesi, DNA'ya bağlı floresan molekülü tarafından etkilenmemektedir.





Şekil 2.11. Farklı indikatörler ile gerçekleştirilen LAMP amplifikasyonların çıplak göz sonuçları incelenmesi. (A) Pozitif sonuç ayrımı için reaksiyon karışımına etidyum bromür eklenmesi. Negatif bir reaksiyon olması durumunda, bir şarap rengi gözlenir (solda), pozitif reaksiyon durumunda pembe renk gözlenir (sağda). (B) Reaksiyon karışımına Picogreen eklenmesi. Pozitif reaksiyon durumunda, boyanın orijinal rengi kalıcı olarak sarıya dönüşür (sağda), negatif reaksiyon durumunda orijinal turuncu renk korunur (solda). (C) Reaksiyon karışımına iyon indikatörünün eklenmesi: (solda) Negatif kontrol durumunda, karışım kalıp DNA içermeyen, net gösterilir; pozitif bir sonuç olması durumunda (sağda) bulanıklıkta artış gözlemlenir. (D) Reaksiyon karışımına kalsein eklenmesi. (Solda) negatif kontrol; (sağda) kalsein ile artık magnezyum iyonu etkileşimi nedeniyle pozitif örnekle floresans yaymıştır. (E) Reaksiyon karışımına (hidroksi naftol mavi) HNB eklenmesi: karışımın renk değişimi, negatif reaksiyonda mordan (solda) pozitif reaksiyonda maviye (sağda) dönüşür

2.2.1.4.2. Gerçek Zamana Dayalı Yöntemler

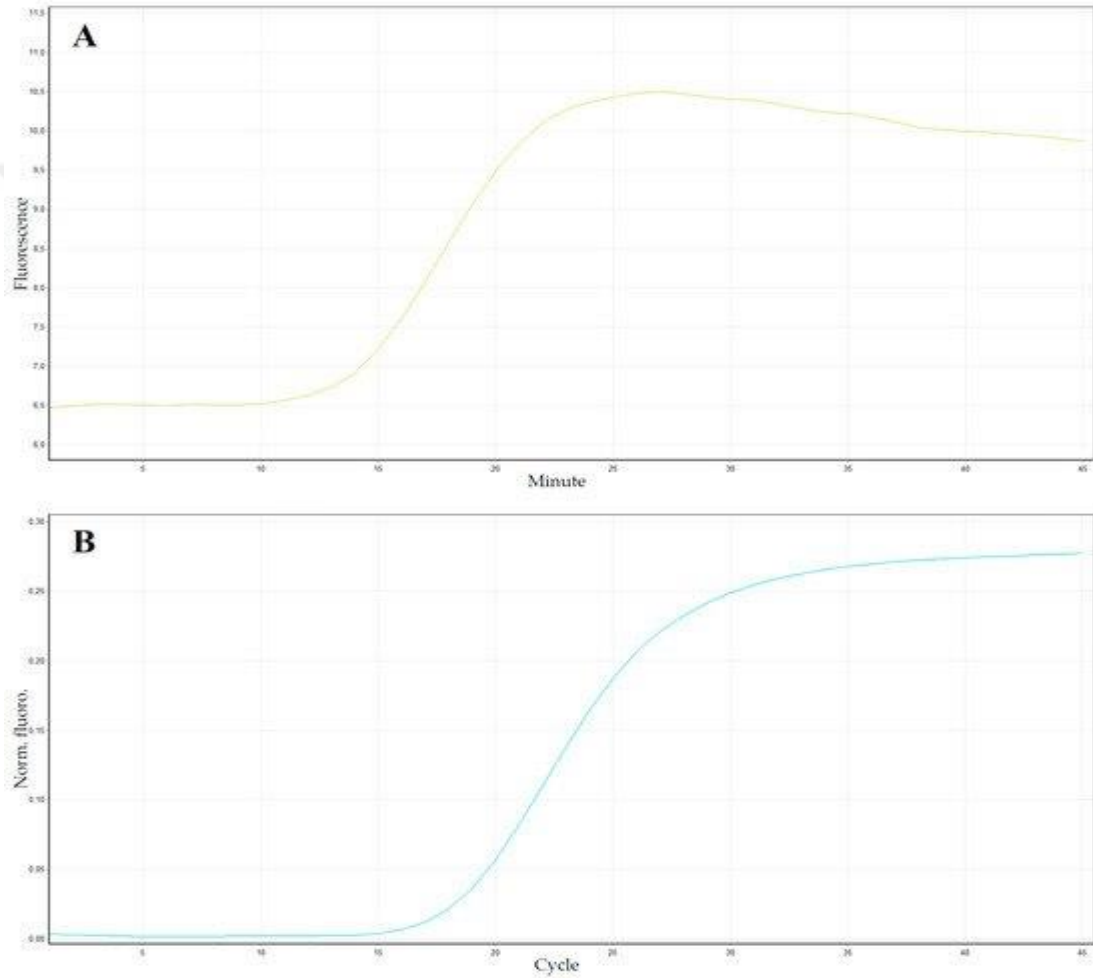
LAMP tekniğinin sık sık geliştirilmesinden dolayı, reaksiyon sonuçlarının okunması için yeni gerçek zamana dayalı yöntemler (gerçek zamanlı LAMP) geliştirilmiştir. Şu anda, en yaygın gerçek zamanlı LAMP yöntemleri iki ölçüme dayanmaktadır; ilki, daha önce tarif edildiği gibi,

ökelti oluşumu nedeniyle reaksiyon karışımının bulanıklık ölçümüne dayanmaktadır. İkincisi ise, reaksiyon karışımına eklenen floresan maddeler (etidyum bromür veya SYBR Green I gibi) tarafından yayılan floresans ölçümüne dayanmaktadır.

LAMP reaksiyonunda, DNA kalıbı tespit edilebilir ve ayrıca ölçülebilir. DNA'yı ölçme ve tespit etmenin etkinliğini geliştirme bağlamında, Mori ve arkadaşları (96) gerçek zamanlı bir türbidimetre cihazı geliştirmişlerdir. Bu cihaz, amplifikasyon sırasında reaksiyonun bulanıklığını gerçek zamanlı olarak ölçme kabiliyetine sahiptir. Böylece, optimum sıcaklığın (60–65 °C) korunmasına izin verir. Ayrıca, geliştirilen türbidimetre cihazı aynı anda birçok örneğin bulanıklığını da ölçebilir yetenektedir. Bu yöntemin iki önemli avantajı vardır: reaksiyonun sonunda amplifikasyon ürününü çıplak gözle kontrol etmeye gerek yoktur ve amplifikasyon ürününün bulanıklığını gerçek zamanlı bir türbidimetre ile okuma kolaylığı sağlamaktadır. Yöntem ayrıca türbiditeyi ölçerek DNA amplifikasyonunun izlenmesine imkan sağladığından, bulanıklık ve zaman arasındaki ilişki bir LAMP amplifikasyon eğrisi ile temsil edilebilir.

DNA amplifikasyonunun gerçek zamanlı izlenmesi, SYBR Green I gibi bir floresan boyanın doğrudan reaksiyon karışımına eklenmesiyle de yapılabilir. Maeda ve arkadaşları (102) tarafından bildirildiği üzere, SYBR Green I, bir floresans kaynağı olarak LAMP reaksiyonunun gerçek zamanlı izlenmesi için kullanılabilir. Bu yöntem, hız ve basitlik avantajı ile geleneksel gerçek zamanlı PCR (Şekil 2.12.B) ile neredeyse aynı sonuçları gösterir. SYBR Green I'in çift sarmallı DNA'ya bağlanmasıyla yayılan floresans, 40-60 dakika boyunca her 30-60 saniyede bir izlenir. Bu izleme, izotermal koşullar altında yapılır (60–65 °C). Gerçek zamanlı LAMP'yi benzersiz ve rutin deneylerde çalışmak için uygun kılan şey, yaklaşık 30 dakika içinde sonuç üretebilme yeteneğidir. Etidyum bromür, amplifikasyonun gerçek zamanlı izlenmesi için bir floresan molekülü olarak kullanılabilir. İlk kez, EtBr Nagamine ve çalışma arkadaşları (103) tarafından bir LAMP testinde kullanılmıştır, toplam 25 µL reaksiyon karışımına 0,25 µg/mL EtBr ilave edilerek, ROX (6-Karboksil-X-Rodamin) floresans kanalını ile floresans yoğunluğu ölçülmüştür (78). Floresan emisyonundaki herhangi bir artış, DNA'nın amplifiye edildiği anlamına gelir. Bazen EtBr, SYBR Green I'den daha iyi bir floresans sinyali vermektedir (104). Reaksiyona EtBr veya SYBR Green I kullanıldığında, gerçek zamanlı LAMP testinin

amplifikasyon eğrisi, sigmoidal gibi görünen gerçek zamanlı PCR amplifikasyon eğrisinden farklı olarak bir şapka gibi görünür (Şekil 2.12.A) (104). DNA amplifikasyonu sırasında, floresan artışını, magnezyum pirofosfat çökeltilerindeki artış izler ve floresanı maskeleyen bir bulanıklık artışına neden olur. Sürecin sonunda bu etki, floresan azalma tespiti ile daha alakalı olabilir.



Şekil 2.12. Gerçek zamanlı İlmiğe-dayalı İzotermal Amplifikasyon ve gerçek zamanlı PCR arasındaki sonuçların değerlendirilmesi. Panel (A), "şapka" gibi görünen gerçek zamanlı LAMP amplifikasyon eğrisini gösterir ve panel (B), sigmoidal gibi görünen gerçek zamanlı PCR amplifikasyon eğrisini göstermektedir

2.2.1.5. LAMP'ın Avantajları ve Dezavantajları

DSÖ'nün önerdiği gibi, ideal bir tanı testi için kriterler hassaslık, özgüllük, düşük maliyet, basitlik, hız, her türlü iklim değişikliğine adapte olabirlik ve gerekli cihazların bulunabilirliğini içermelidir (105). Hastalıkların tespiti giderek zorlaştığı için alternatif bir teşhis yönteminin keşfedilmesi gerekmektedir. LAMP, amplifikasyon teknikleri arasında etkili bir teşhis testi olarak öne çıkmaktadır. Prensibi ve reaksiyon mekanizması biraz karmaşık olsa da tercih edilen bir tanı aracıdır (71). Son zamanlarda, araştırmacılar, LAMP testinin çeşitli alanlarda analiz için kullanımlarını çok fazla araştırmaya başlamışlardır.

2.2.1.5.1. Avantajları

LAMP'ın en önemli avantajı hızlı olmasıdır, çünkü acil teşhise izin verir. LAMP, diğer diğer nükleik asit amplifikasyon tekniklerine kıyasla (örneğin PCR için 90 dakika) sadece 30 dakika gibi kısa bir sürede gerçekleştirilebilir. Ek olarak, DNA kalıbı için ilk ısı denatürasyonu gerekli olmadığından amplifikasyonu da hızla ilerler. İhtiyaç duyduğu tek şeyin izotermal bir koşul sağlayan basit bir su banyosu veya ısıtma bloğu olmasıyla LAMP'ın en önemli avantajı basitliğidir. Dolayısıyla, LAMP tekniği diğer amplifikasyon tekniklerinden farklı olarak karmaşık araçlar gerektirmez. LAMP tekniği, sonuçları analiz etme yönteminde de çok basittir. Sonuçların doğrudan değerlendirilmesi kolorimetrik değişikliklerin çıplak gözle gözlemlenmesiyle yapılabilmektedir.

LAMP testleri, elde edilen örneklerde hedef olmayan DNA varlığından da etkilenmemiş görünmektedir, bu, onun yüksek özgüllük özelliğini vurgular (106, 107). LAMP testinin, bazı PCR inhibitörlerine (kan gibi) karşı stabilitesi ve işlenmemiş örnek için ve kalıp ekstraksiyon aşaması olmadan gerçekleştirilebilmesi gibi başka özellikleri de vardır (108-110). LAMP tekniği, ters transkriptaz kullanılarak RNA için de uygulanabilir. Şu anda, Bst 3.0 polimeraz ve OmniAmp polimeraz gibi geliştirilmiş DNA polimerazlar, LAMP ve RT-LAMP uygulamasında kullanılmaktadır. Bu DNA polimerazları, geleneksel Bst DNA polimeraz ile karşılaştırıldığında artan ters transkriptaz aktivitesiyle güçlü performans göstermiştir (73).

2.2.1.5.2. Dezavantajları

LAMP tekniği, kullanımını diğer amplifikasyon tekniklerine tercih edilebilir kılan birçok özelliğe sahip olsa da kullanım kolaylığını engelleyen kusurları da bulunmaktadır. Amplifikasyon için doğru ve uygun bir hedef seçmek zordur. LAMP, hassaslığı ve özgüllüğu artırmak için hedef sekans içinde 6 veya 8 bölgeyi hedefleyen 4-6 primer kullanır. Bu nedenle, birçok kısıtlamaya maruz kaldıkları için LAMP primerlerini tasarlamak çok zordur. Belli koşullar altında, tercih edilen hedef bölgelerin bazıları seçilemeyebilir, primer tasarımına yardımcı olmak için ücretsiz bir çevrimişi yazılımlar mevcut olsa da yine de primerleri manuel olarak tasarlama ihtiyacı ortaya şıkabilir. Dahası, LAMP tekniğinde dört veya altı primer kullanılması, primer-primer hibridizasyon olasılığını da artırabilir (111).

Final ürün büyük bir DNA zinciri olduğundan, bu teknik, klonlama veya diğer moleküler biyolojik amaşları için uygulanamaz ve PCR ile karşılaştırıldığında daha az yönlüdür (112). Ek olarak, prosedürün karmaşıklığı ve deneysel tasarımlar nedeniyle LAMP'ın multipleks yaklaşımları PCR'den daha karmaşıktır (113).

LAMP reaksiyonunun türbidimetrik ve kolorimetrik belirlenmesi, bir bireyin renk algısına dayandığından öznel-dir (114). Ayrıca, bir jel üzerindeki bandın boyutuna göre bir hedefin belirlenmesi LAMP ile mümkün değildir, çünkü LAMP ürünü PCR'de olduğu gibi tek bir bant yerine jel üzerinde bir merdiven deseni veya lekelenme oluşturur (115).

Diğer moleküler yöntemlerde olduğu gibi, negatif kontrollerde yanlış pozitif sonuçlara yol aşan kontaminasyon oluşmaktadır (116, 117). Kontaminasyon oluşumunun nedeni, LAMP ürününün çok kararlı olmasıdır, bu da kolayca bozulmaması anlamına gelir (118, 119). Bu nedenle, yüksek verimliliği nedeniyle LAMP kontaminasyonunun taşınması önemlidir.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Çalışmanın başlıca amacı, BNV virüsünün tek tüpte ve tek aşamalı olarak, gerçek zamanlı hızlandırılmış bir LAMP testi ile hızlı tespittir. Bu tez çalışması, İlmiğe Dayalı İzotermal Çoğaltma (LAMP) yönteminin farklı primer setleri ile hassasiyetinin artırılmasına ve saha şartlarında güvenilir bir tanısal araç olarak kullanılmasına odaklanmıştır. Hazırlana bu çalışması ile biyoteknolojinin en önemli uygulama alanlarından birisi olan tanısal sistemlerin geliştirilmesi ve adaptasyonu perspektifinde “Pen-side veya Point-of-care” (hasta başı) uygulamaya önemli bir katkı sağlanması hedeflenmiştir.

Testin etkenin tespit edilmesi sürecindeki hassasiyeti valide edilmiş bir başka moleküler tanı yöntemi ile (realtime RT-PCR) karşılaştırılmak suretiyle yapılmıştır. Ayrıca süreç sonunda, düşük gelir düzeyine sahip, gelişmekte olan bazı ülkeler de dahil olmak üzere birçok alanlar için ekonomik bir uygulama aracı optimizasyonu gerçekleştirilmiş olacaktır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. ÖRNEK TEMİN EDİLEN İŞLETMELER

Bu çalışmada Ankara'daki kuşlardan kan örnekleri alındı. BNV izolatları, standart prosedürlere göre Vero E6 hücrelerinde çoğaltılmıştır.

4.1.2. HÜCRE

Bu araştırmada kullanılan Vero E6 (Afrika yeşil maymun böbrek hücreleri) (ATCC CCL81) devamlı hücre kültürü Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi.

4.1.3. VİRÜS

Bu araştırmada kullanılan Batı Nil Virüsü NY-99 suşu Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı stoklarından temin edildi. Virüs Vero E6 hücre kültüründe üretildi ve aynı hücre kültüründe titrasyonu yapıldı. Virüsler daha sonra test edilinceye kadar -80 °C derin dondurucularda saklandı.

4.2. YÖNTEM

4.2.1. VİRÜSÜN ÜRETİLMESİ

Araştırma kapsamında enfektif virüs uygulamalarının yer aldığı in vitro deneyler için Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesinde Biyogüvenlik Seviye 3 (BSL-3) laboratuvarları kullanıldı. Çalışmada kullanılan BNV NY-99 suşu, Vero E6 hücrelerine inokule edildi. Bu amaçla 75 cm² hücre kültürü flaskında üretilen Vero E6 hücreleri, 0,01 MOI (3×10^4 POU) dozda BNV ile adsorpsiyonlu teknik kullanılarak enfekte edildi. İnkübasyondan sonra (37°C'de 1 saat), virüs inokulumu dökülmeksizin hücreler Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM- Sigma, ABD) ile inkubasyona bırakıldı. Virüs muamelesinden sonra hücreler sitopatik etkinin (CPE) varlığı için günlük olarak kontrol edildi. Dördüncü günün sonunda, hücrelerin yüzde 80-90'ı

hücre yuvarlaklaşması ve lizis ile karakterize edilen CPE gösterdiğinde, hücre kültürü şişesi -80 °C'lik bir dondurucuya kaldırıldı. Ertesi gün çözme işlemi sonucunda hücreler şişe yüzeyinden kaldırıldı, hücre süspansiyonu tamamen homojenize edildi ve 4°C'de 3000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüjlemenin ardından virüs içeren süpernatant toplandı ve 1 ml'lik hacimlere bölündü. Stok virüs daha sonra kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

4.2.2. VİRAL RNA İZOLASYONU

Genomik viral RNA, üreticinin protokolüne uygun, QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak izole edildi. Yöntem basamaklar halinde aşağıdaki gibidir.

1. Bir Eppendorf tüpüne incelenecek serum örneğinden 200 µL alındı.
2. 20 µL proteinaz K eklendi ve on saniye vortekslenerek homojenizasyon sağlandı.
3. Karışıma 100 µL VXL tamponu ilave edildi ve 10 saniye vortekslenerek homojenizasyonu sağlandı. Daha sonra karışım 15 dakika oda sıcaklığında (20-24 °C) bekletildi.
4. İnkübasyondan sonra elde edilen karışıma 350 µl ABC buffer eklendi ve homojenize olması için vortekslendi.
5. Tüm ürün, Qiaamp kolonuna aktarıldı ve 1 dakika boyunca 8000 rpm'de santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası kolon temiz bir tüpe aktarıldı.
7. Ardından 600 µL AW1 eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Santrifüj sonrası kolon temiz bir tüpe aktarıldı.
9. Daha sonra 600 µL AW2 eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Santrifüjden sonra, kolon temiz bir tüpe aktarıldı ve daha sonra içinde boş kolon ile 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.

11. Kolon, santrifüj edildikten sonra temiz bir tüpe aktarıldı ve kolonun altındaki beyaz membranın tam ortasına gelecek şekilde 50 µL AVE tamponu eklendi ve oda sıcaklığında (20-24 °C) 1 dakika bekletildi.

12. 14,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

13. RNA, 50 µl elüsyon tamponunun son hacminde QIAspin kolonlarından ayrıştırıldı ve kullanılabilecek kadar -80 °C'de saklandı.

4.2.3. PRİMERLERİN TASARIMI

LAMP primer tasarım yazılımı PrimerExplorer (versiyon 5), veri bankasında mevcut B956 sekansına (GenBank erişim numarası AY532665) dayalı olarak BNV'ye özgü RT-LAMP primerlerini tasarlamak için kullanıldı. 5'-UTR'yi ve kapsid geninin bir kısmını hedefleyen altı BNV'ye özgü RT-LAMP primerinin yanı sıra NS3 genini hedefleyen altı primer seti daha tasarlandı (Çizelge 4.1., 4.2.). Ek olarak, Jae Woong Lee ve diğerleri (120) tarafından yürütülen bir çalışmadan E genini hedefleyen altı primer seti de elde edildi (Çizelge 4.3.). Altı primer seti, iki Loop primer (Loop F ve Loop B), iki iç primer (FIP ve BIP) ve iki dış (F3 ve B3) primerlerinden oluşur.

Gerçek zamanlı RT-PCR primerleri, Sonja Linke ve diğerleri tarafından yapılan önceki araştırmaya göre tasarlanmıştır (121). ProC-F (CCTGTGTGAGCTGACAACTTAGT), ProC-R (GCGTTTTAGCATATTGACAGCC) ve ProC-TM (6FAM-CCTGGTTTCTTAGACATCGGAGATCTXCGTGCP), 5'-UTR'nin korunmuş bölgesine ve kapsid geninin bir kısmına bağlanmak üzere tasarlanmıştır.

Çizelge 4.1. 5'-UTR ve C geninin bir kısmının RT-LAMP amplifikasyonu için kullanılan oligonükleotid primerlerinin detayları

Primer adı	Tip	Uzunluk (bp)	Genom Pozisyonu	Sekans (5'-3')
F3	Forward Dış	20-mer	82 - 101	GGCACGAAGATCTCGATGTC
B3	Reverse Dış	19-mer	290 - 308	CCTCTCCATCTGTCCAGCA
FIP	Forward İç (F1C + F2)	38-mer; F1C, 20-mer; F2, 18-mer	F1C, 154 – 173; F2, 113 – 130	GACAATCCGCGGGGCATACC- GAGGGCCCGGTAAAAACC
BIP	Reverse İç (B1C + B2)	42-mer; B1C, 22-mer; B2, 20-mer	B1C, 201 – 222; B2, 257 - 276	GAGTCTGATTGACGGGAAGGGC- AGCGATTGCAGTGAATCTGA
Loop F	Forward loop	22-mer	132 - 153	GCGTTTTAGCATATTGACAGCC
Loop B	Reverse loop	21-mer	223 - 243	CCAATACGTTTCGTGTTGGCT

Çizelge 4.2. BNV'nin NS3 geninin RT-LAMP amplifikasyonu için kullanılan oligonükleotid primerlerinin detayları

Primer Adı	Tip	Uzunluk (bp)	Genom Pozisyonu	Sekans (5'-3')
F3	Forward Dış	18-mer	58 - 75	ATTGAGGACGGCTGTGCT
B3	Reverse Dış	20-mer	261 - 280	CGTGAAATGGGCTTCATCCA
FIP	Forward İç (F1C + F2)	41-mer; F1C, 22-mer; F2, 19-mer	F1C, 133 – 154; F2, 88 – 106	CACTGCTGAGGTTTGGTACCGA- GGTCGTTGCTGCTGAGATG
BIP	Reverse İç (B1C + B2)	40-mer; B1C, 22-mer; B2, 18-mer	B1C, 181 – 202; B2, 225 - 242	CGTTGATGTCATGTGCCATGCC- TGGGGACTCTGTGTGGAG
Loop F	Forward loop	18-mer	107 - 124	TCCTCTCAGGGCCTCAGA
Loop B	Reverse loop	21-mer	203 - 223	ACCCTCACACACAGGCTGATG

Çizelge 4.3. BVN'nin E geninin RT-LAMP amplifikasyonu için kullanılan oligonükleotid primerlerinin detayları

Primer Adı	Genom Pozisyonu	Sekans (5'-3')
F3	1500 - 1520	AGAATATGGAGAGGTGACAGT
B3	1760 - 1778	AATCCACAGGAATGGCTC
FIP	1607 - 1627, 1555 - 1574	GGAGGTTGAGGTCCATGAACCTGCATACTACGTGATGACTG
BIP	1703 - 1722, 1638 - 1660	TGCTGGAAGTACTGTATGGAGGACAATGCTATCACAGACTG CT
Loop F	1587 - 1606	ACTCACGATGGACCAAGAAC
Loop B	1687 - 1702	GAACCACACGCCACGA

4.2.4. TERS-TRANSKRİPSİYON POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR)

Lineage-1 ve Lineage-2 BNV'yi tespit etme yeteneğine sahip tek adımlı RT-PCR primerleri ve problemleri önceki araştırmalara göre tasarlanmıştır. Amplifikasyon, üreticinin protokolüne göre 10 μ M forward ve reverse primer ve <2 μ L RNA ile Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kiti (New England BioLabs, ABD) kullanılarak 20 μ l toplam reaksiyon hacminde gerçekleştirildi (Çizelge 4.4.). RT-PCR reaksiyonunun termal profili, 10 dakika boyunca 55 °C'de gerçekleştirildi. Ön denatürasyon 95 °C'de 1 dakika boyunca 1 döngü olarak , ardından 10 saniye boyunca denatürasyon ve 60 °C'de 30 saniye boyunca uzama 45 döngü olarak gerçekleştirildi (Çizelge 4.5.4). Erime eğrisi analizi, her 5 saniyede 0,5 °C'lik bir artışla 65-95 °C arası gerçekleştirildi (SYBR yeşil).

Çizelge 4.4. Real Time RT-PCR karışım bileşenleri ve miktarları

Bileşen	20 μ l Reaksiyon	Final Konsantrasyon
Luna Evrensel Tek Adımlı Reaksiyon Karışımı (2X)	10 μ l	1X
Luna WarmStart® RT Enzim Karışımı (20X)	1 μ l	1X
İleri primer (10 μ M)	0.8 μ l	0.4 μ M
Geri primer (10 μ M)	0.8 μ l	0.4 μ M
Kalıp RNA	variable	< 1 μ g (Toplam RNA)
Nükleaz içermeyen su	to 20 μ l	

Çizelge 4.5. Gerçek Zamanlı RT-PCR ısı döngüsü ve döngü sayısı

Aşamalar	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ters Transkripsiyon	55°C	10 dk	1
Ön Denatürasyon	95°C	1 dk	1
Denatürasyon	95°C	10 sn	40-45
Uzama	60°C	30 sn	

Değerlendirme:

Test numunelerinin sonuçları, pozitif ve negatif kontrollerle karşılaştırılarak değerlendirildi. Ct değeri 45'in altında ve yükselen pozitif örneklerde sigmoid logaritmik eğri gözlemlendi. Negatif kontrol ve negatif örneklerde Ct değeri 45'ten büyük olan düz bir floresan çizgi gözlemlendi. Ct değeri 40-45 olan örnekler zayıf pozitif olarak kabul edildi ve tekrar test edildi.

4.2.5. TERS TRANSKRİPSİYON İLMİĞE DAYALI İZOTERMAL ÇOĞALTMA (RT-LAMP)

RT-LAMP reaksiyonu, WarmStart® LAMP Kit (New England BioLabs., ABD) kullanılarak 25 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. DNA veya RNA'nın LAMP analizi için tek adımlı basit bir çözüm sunan bu kit, optimize edilmiş bir LAMP tampon solüsyonunda Bst 2.0 WarmStart DNA Polimeraz ve WarmStart RTx Ters Transkriptaz karışımını içeren WarmStart LAMP 2X Master Mix ile birlikte sağlanır. Kit, LAMP'ın gerçek zamanlı floresan ölçümünü sağlamak için floresan bir boya da içermektedir. Reaksiyon, aşağıda bildirilen gibi üreticinin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

1. Kullanılabilir bir konsantrasyonda 6 LAMP primerinin tümünü içeren 10X LAMP primer Karışımının stokları yapıldı. Tüm primer stokları nükleaz içermeyen suda hazırlandı ve -20°C 'de saklandı.

Çizelge 4.6. 10X LAMP Primer Karışımı

Primer	10X Konsantrasyon (Stok)	1X Konsantrasyon (Final)
FIP	16 μM	1.6 μM
BIP	16 μM	1.6 μM
F3	2 μM	0.2 μM
B3	2 μM	0.2 μM
LF	4 μM	0.4 μM
LB	4 μM	0.4 μM

2. Kullanılacak tüm bileşenler oda sıcaklığında çözüldükten sonra buz üzerine alındı.
3. 25 μl LAMP reaksiyonu için reaksiyon karışımı ve hacimleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

Çizelge 4.7. Toplam 25 μl LAMP reaksiyon hacmi için kullanılan reaktifler

Reaksiyon Karışımı	RNA Hedef Tespiti	Kalıp içermeyen kontrol (NTC)
WarmStart LAMP 2X Master Karışım	12.5 μl	12.5 μl
Floresan boya (50X)	0.5 μl	0.5 μl
LAMP Primer Karışımı (10X)	2.5 μl	2.5 μl
Hedef RNA	1 μl	-
Distile su	8.5 μl	9.5 μl
Toplam	25 μl	25 μl

4. Tüm bileşenler eklendikten sonra, reaksiyon karışımı vortekslendi ve materyali toplamak için santrifüj edildi.
5. Reaksiyon karışımı, bir termal döngü cihazında 30 dakika 65°C'de inkübe edildikten 80°C'de 5 dakika inkübasyonla reaksiyon sonlandırılmıştır.

4.2.5.1. RT-LAMP Ürününün Analizi

LAMP reaksiyonun ardından, RT-LAMP reaksiyon sonucu Bio-Rad Molecular Imager® Gel Doc™ XR Görüntüleme Sistemi kullanılarak floresan ölçümü ile tespit edildi. RT-LAMP reaksiyon ürünü ayrıca agaroz jel elektroforez yöntemiyle analiz edildi. LAMP ürünlerinin jelde yürümesi için 1X TAE tamponu kullanıldı. 1 litre 5X konsantrasyonda TAE tamponu hazırlamak için 242 g Tris-base (Sigma, T-8524) 500 ml dH₂O'da çözündürüldükten sonra 57.1 ml glasiyel asetik asit (Merck, 101830) ve 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) (Merck, 324503) eklenerek son hacim dH₂O ile 1 litreye tamamlandı. 40 ml 1X TAE içerisine 0.8 g agaroz (Sigma, A5073) tartılarak mikrodalga fırın yardımıyla eritildi ve jel yaklaşık 50 °C'ye soğuduğunda üzerine 3 µl EtBr (10 mg/ml) (Sigma, E1510) eklendi. Soğutulmuş jel karışımı jel kasetine dökülerek tam bir polimerizasyon amacıyla bekletildi. Katılmış olan jel, içerisinde 1X konsantrasyonda TAE tamponu bulunan yürütme tankına yerleştirildi ve LAMP ürünlerinden 10 µl alınarak üzerine 2 µl 6X yükleme boyası (NEB, B7025S) eklenerek kuyulara yüklendi. Daha sonra örnekler 90 V'da 60 dakika yürütüldü ve jel görüntüleme cihazında (Bio-Rad Molecular Imager® Gel Doc™ XR Görüntüleme Sistemi) jelin görüntüsü alındı.

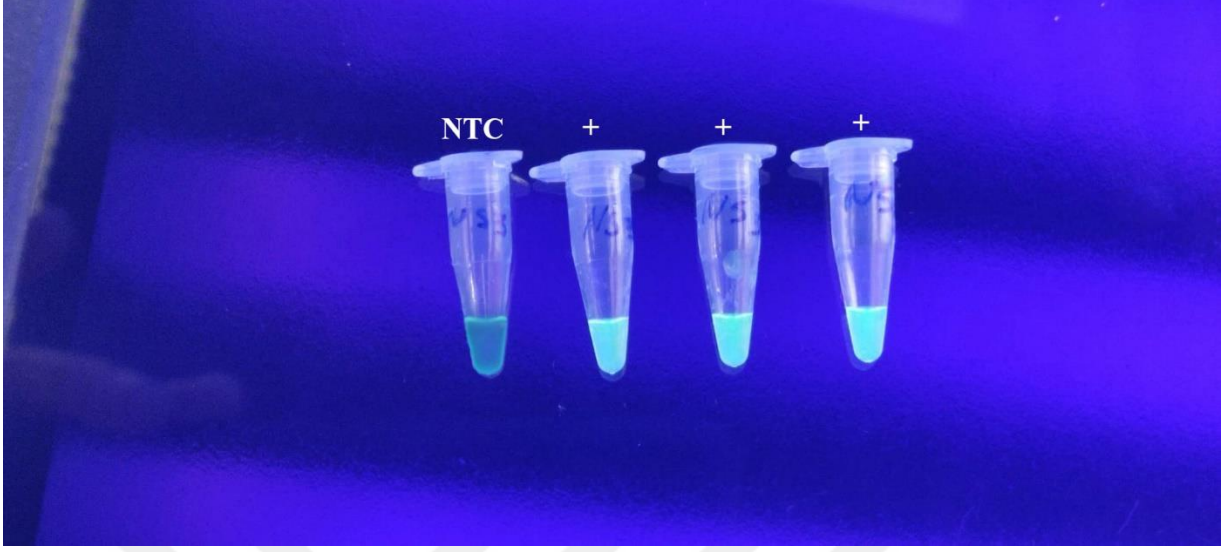
5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. RT-LAMP'IN STANDARDİZASYONU VE OPTİMİZASYONU

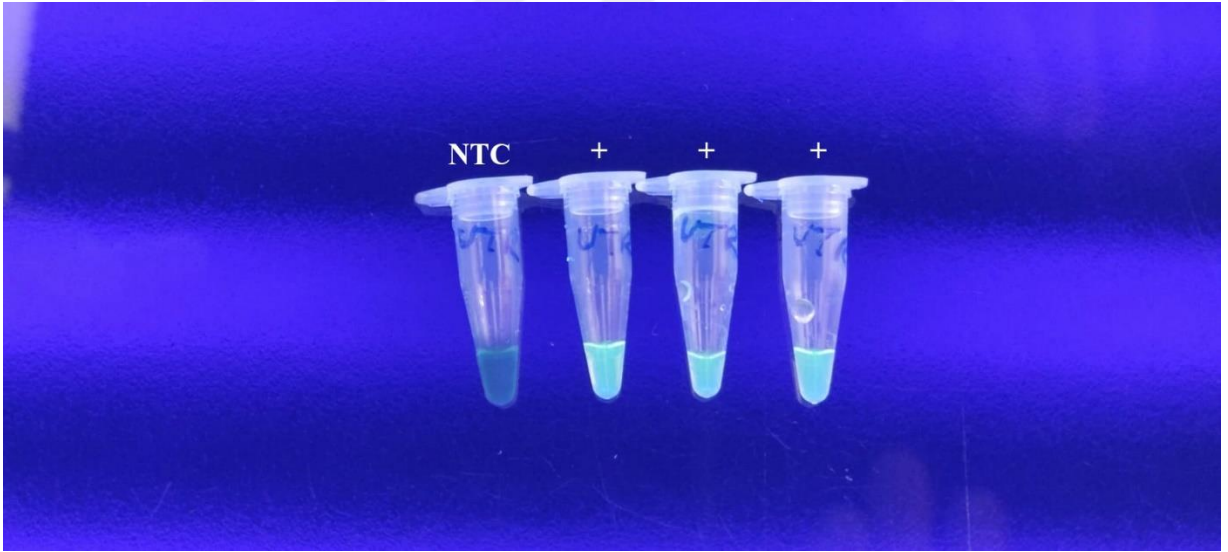
RT-LAMP testinin ilk standardizasyonu ve optimizasyonu, 3. Bölüm’de açıklandığı gibi iki dış ve iki iç primer içeren dört primer seti kullanılarak gerçekleştirildi. RT-LAMP optimizasyonunu takiben, amplifikasyon reaksiyonunu geliştirmek için iki ek döngü primeri kullanılarak hızlandırılmış bir RT LAMP analizi yapıldı, dolayısıyla tespit süresi de kısalmıştır. RT-LAMP amplifikasyonu, farklı reaksiyon sürelerinde (30, 45 veya 60 dakika) gerçekleştirildi. Eşdeğer koşullardaki farklı inkübasyon sürelerinden benzer sonuçlar elde edildi. Üreticinin protokolüne göre (WarmStart® LAMP Kit), RT-LAMP testi ile etkin amplifikasyon için optimum sıcaklık 65 °C olarak değerlendirilmiştir. Gen amplifikasyonunun tespiti, çift sarmallı DNA'ya (dsDNA) seçici olarak bağlanan floresan boya ve ayrıca agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon, değişen stem uzunluğuna sahip stem-ilmek DNA'larının ve birden çok ilmekli karnabahar benzeri yapıların oluşumu ile sonuçlandığından, reaksiyon karışımı agaroz jel üzerinde merdiven benzeri bir görüntü vermektedir (Şekil 5.5.).

5.2. NS3 GENİNİN VE UTR/C GENİNİN TESPİTİ

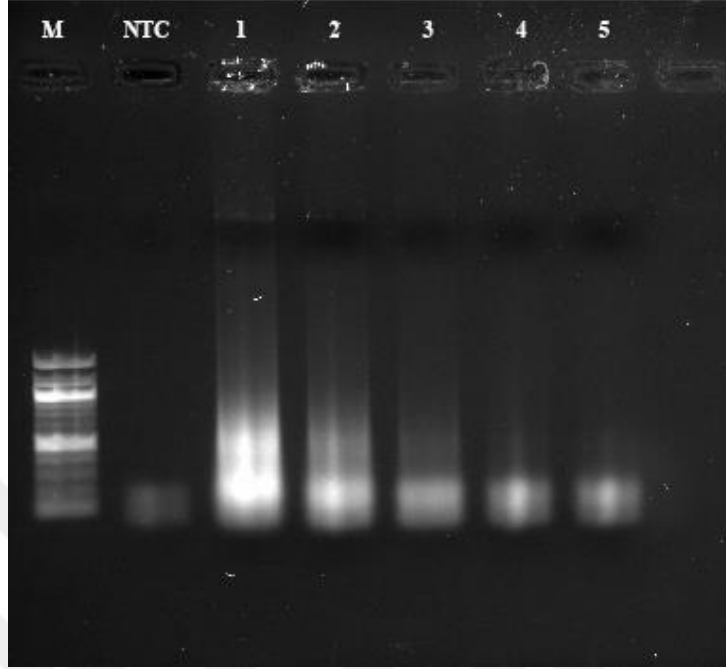
Primer seti, Batı Nil Virüsü’nün NS3 genini ve UTR/C genini saptamak üzere tasarlanmıştır. Gen amplifikasyonu, reaksiyon karışımının ProFlex™ 3 x 32 oyuklu PCR sisteminde 30 dakika boyunca 65°C'de inkübe edilmesiyle gerçekleştirildi. Her reaksiyona kalıp içermeyen kontroller (NTC) eklendi. Sonuçların doğrulanması, floresans ölçülerek ve ayrıca amplifiye DNA'nın agaroz jelde görselleştirilmesiyle doğrulandı. LAMP reaksiyonu, farklı boyutlarda birçok bant üretir, buradaki ana faktör, dış primerlerin varlığıdır. Dış primerlerden birinin şablona bağlanmaması, ilmekli yapının oluşmasını engellediğinden, sonuç agaroz jel üzerinde çok fazla bant göstermedi (Şekil 5.1., 5.2.) (Şekil 5.3., 5.4.).



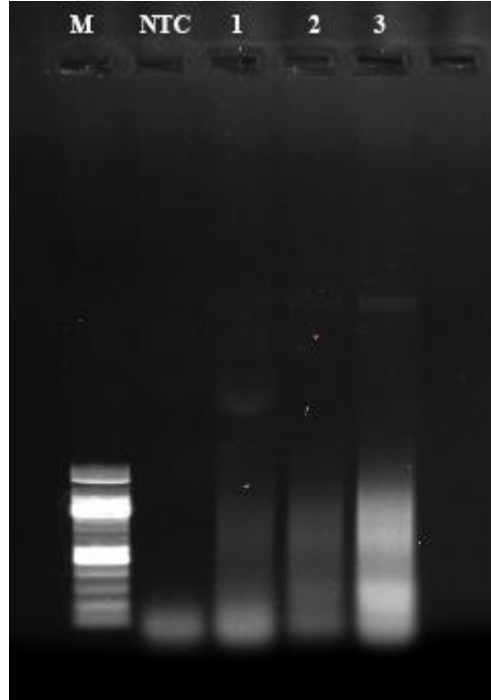
Şekil 5.1. NS3 gen ürünlerinin UV ışığı altında görsel inceleme ile değerlendirilmesi. Pozitif reaksiyon UV ışığı altında parlak yeşildi, kalıp içermeyen kontrol (NTC) ise zayıf yeşil kaldı



Şekil 5.2. UTR/C gen ürünlerinin UV ışığı altında görsel inceleme ile değerlendirilmesi. Pozitif reaksiyon UV ışığı altında parlak yeşildi, kalıp içermeyen kontrol (NTC) ise zayıf yeşil kaldı



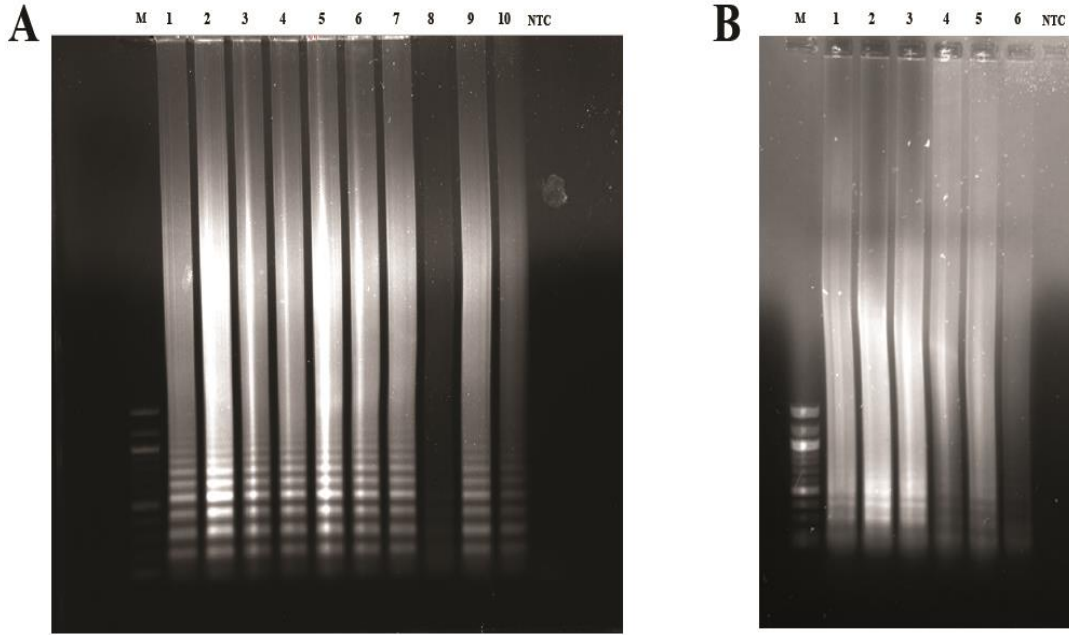
Şekil 5.3. NS3 gen ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. Şerit 1-5, BNV RNA'nın pozitif reaksiyonları; şerit NTC, kalıp içermeyen kontrol (RNA yok); şerit M, moleküler işaretleyici



Şekil 5.4. UTR/C gen ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. Şerit 1-3, BNV RNA'nın pozitif reaksiyonları; şerit NTC, kalıp içermeyen kontrol (RNA yok); şerit M, moleküler işaretleyici

5.3. RT-LAMP TESTİNİN DUYARLILIĞI

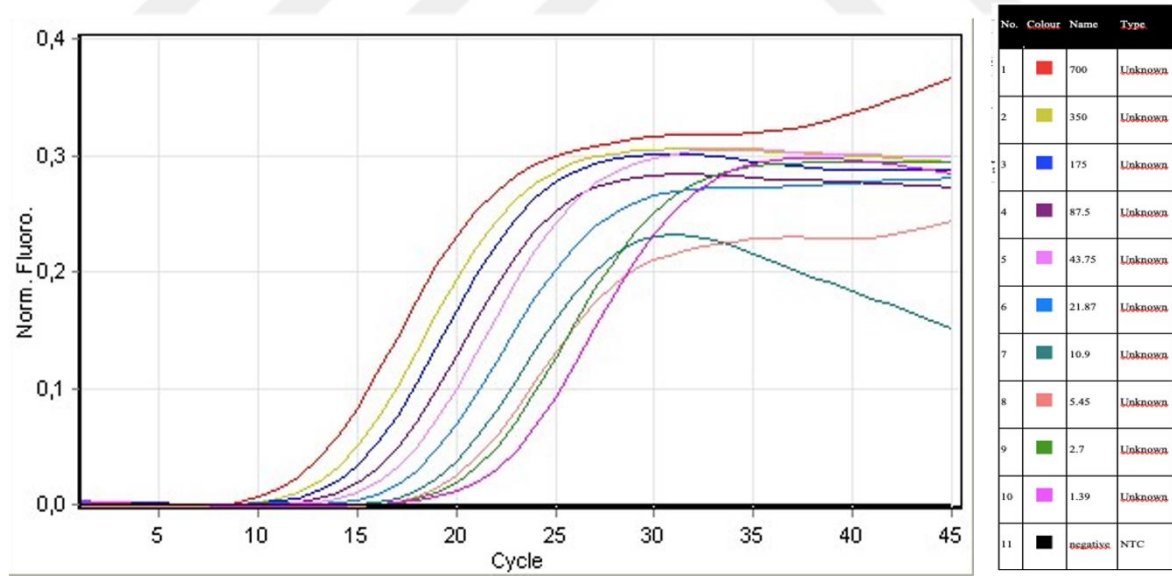
Batı Nil Virüsü ile enfekte Vero hücre süpernatantından izole edilmiş RNA'nın miktarı, nanodrop cihazı kullanılarak ölçüldü ve tespit limitini (LOD) belirlemek için seri dilüsyon hazırlandı. Viral nükleik asidin saptanabilir en düşük konsantrasyonu olan LOD, burada mikrolitre başına (μL) viral RNA olarak temsil edildi. RNA'yı nükleaz içermeyen su kullanarak çeşitli konsantrasyonlarda (700 nanogram/ μL 'den 10 pikogram/ μL 'ye kadar) seyretildi. RT-LAMP, E-gene hedefleyen primerleri için 10 pg'ye kadar tespit etti. Sonuçların doğrulanması, floresans ölçülerek ve ayrıca amplifiye edilen DNA'nın agaroz jelde görselleştirilmesiyle doğrulandı (Şekil 5.5.).



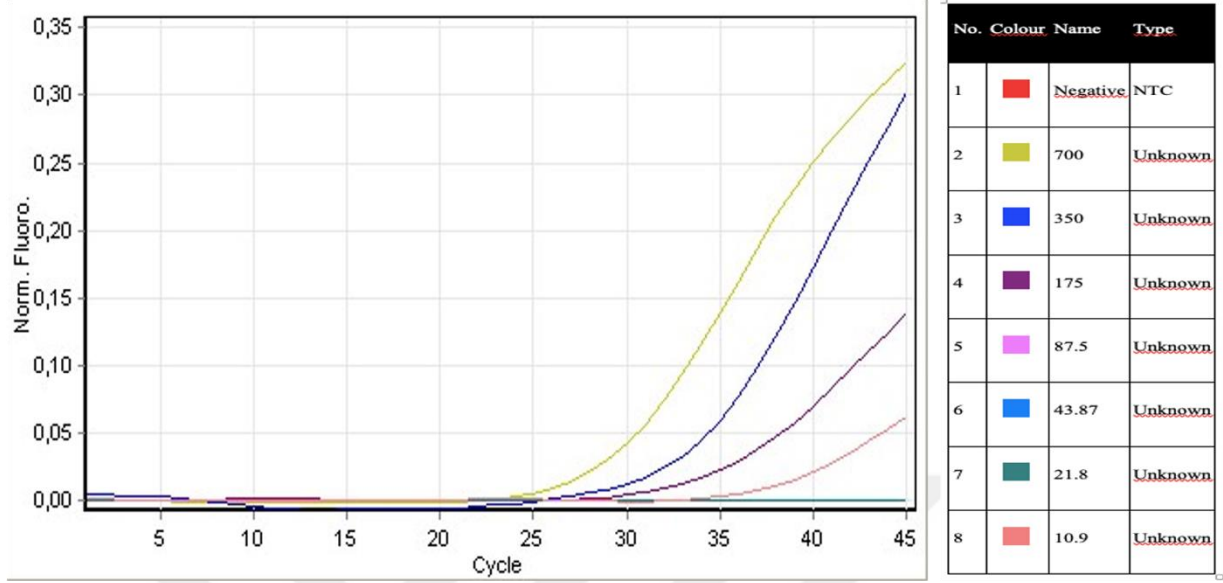
Şekil 5.5. Çeşitli WNV RNA konsantrasyonlarından Env gen ürünleri için agaroz jel elektroforezi. (A) 700 ng genomik RNA (şerit 1) ile başlayan 1 ng'ye (şerit 10) kadar çift seri seyreltmeler test edildi. Şerit NTC, kalıp içermeyen kontrol (RNA yok); şerit M moleküler işaretleyici. (B) 1 ng genomik RNA (şerit 1) ile başlayan 10 pg'ye (şerit 6) kadar çift seri seyreltmeler test edildi. Şerit NTC, kalıp içermeyen kontrol (RNA yok); şerit M moleküler işaretleyici

5.4. GERÇEK ZAMANLI RT-PCR'NİN DUYARLILIĞI

Bu araştırmada, UTR+C geni hedeflenerek BNV tespiti için RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Amplifikasyon, üreticinin protokolüne göre 10 µM forward ve reverse primer ve <2 µl RNA ile Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kiti (New England BioLabs, ABD) kullanılarak 20 µl toplam reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. RT-PCR reaksiyonunun termal profili, 10 dakika boyunca 55 °C'de gerçekleştirildi. Ön denatürasyon 95 °C'de 1 dakika boyunca 1 döngü olarak, ardından 10 saniye boyunca denatürasyon ve 60 °C'de 30 saniye boyunca uzama 45 döngü olarak gerçekleştirildi. Seyreltilmiş BNV RNA'nın bilinen tüm konsantrasyonları (700 nanogram/µl'den 10 pikogram/µl'ye kadar) ayrıca Gerçek Zamanlı RT-PCR için kalıp olarak kullanıldı. Gerçek zamanlı RT-PCR, 87,5 pg'ye kadar BNV RNA tespit etti (Şekil 5.6., 5.7.). Bu sonuçlar, gerçek zamanlı RT-LAMP'ın gerçek zamanlı RT-PCR'den daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Gerçek zamanlı RT-LAMP testi, gerçek zamanlı RT-PCR'den daha verimlidir ve 30 dakika içinde sonuç verir. Gerçek zamanlı RT-PCR durumunda, aynı BNV RNA konsantrasyonunda 30 dakika sonra (45 döngüye kadar) sonuçlar alındı.



Şekil 5.6. Real Time RT-PCR test sonucu görüntüsü. Gerçek zamanlı RT-PCR, 1 ng'ye kadar BNV RNA tespit etti



Şekil 5.7. Real Time RT-PCR test sonucu görüntüsü. Gerçek zamanlı RT-PCR, 87,5 pg'ye kadar BNV RNA tespit etti

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Viral enfeksiyonların neden olduğu hastalıkların çoğunun tanısında, hastalığın meydana gelişi seyri açısından karmaşık ve farklı viral ajanların benzer semptomlara neden olabilmesi nedeniyle zorluk yaşanabilmektedir. BNV enfeksiyonunun karakteristik olmayan semptomları nedeniyle gözden kaçabilen bir hayvan hastalığı olması, halk sağlığı için önemli bir tehdit olarak değerlendirilmektedir. Dolayısıyla enfeksiyon spektrumunda yer alan ve hastalığa özgü belirtiler veren kanatlı ile tek tırnaklı hayvanlarda hızlı ve güvenilir test sistemlerine ihtiyaç vardır. İlave olarak bu testlerin saha şartlarında uygulanabilirliği, büyük bir avantaj olarak değerlendirilmektedir.

Amplifikasyon yöntemleri, hedef sekansları benzer boyutlarda amplifiye edebilmektedirler. Tüm bu yöntemler düşük miktardaki hedef DNA'larını (10 kopyadan az) 1 saat gibi kısa sürede tespit edebilmesine rağmen, bazı dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle, bu çalışmada, BNV virüsünün tek tüpte ve tek aşamalı olarak, gerçek zamanlı hızlandırılmış bir LAMP testi ile hızlı tespitini amaçlanmıştır. Gen amplifikasyonu, viral RNA'nın, revers transkriptaz (RT) ve Bst DNA polimerazı varlığında bir primer setleri ile 30 dakika boyunca 65 °C'lik sabit bir sıcaklıkta aynı anda inkübe edilmesiyle elde edilir. Amplifikasyonun tespiti agaroz jel analizi ile gerçekleştirilir.

BNV tespiti için birkaç RT-PCR tahlili daha önceki araştırmalarda tarif edilmiştir (121-123). Bazı çalışmalar, BNV RNA'nın saptanması için 40-100 kopya arasında değişen farklı duyarlılık sonuçları göstermiştir (124, 125). Öte yandan, insan immün yetmezlik virüsü RNA kopya sayılarının nicelleştirilmesi için Nükleik Asit Sekans Temelli Amplifikasyon (NASBA) testi geliştirilmiştir ve ml başına 80 ve 50 kopya viral RNA tespit etme yeteneğine sahiptir (126). Bu çalışmada, qRT-PCR 6.4×10^8 kopya'ya kadar BNV RNA tespit ederken, gerçek zamanlı RT-LAMP 7.3×10^7 kopya'ya kadar BNV RNA'sını saptayabildiği kanıtlanmıştır (Şekil 5.7.), (Şekil 5.5.). Dolayısıyla, gerçek zamanlı RT-LAMP'ın gerçek zamanlı RT-PCR'den daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

Gen amplifikasyonunun tespiti, agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon, değişen stem uzunluğuna sahip stem-ilmek DNA'larının ve birden çok ilmekli karnabahar benzeri yapıların oluşumu ile sonuçlandığından, reaksiyon karışımı agaroz jel üzerinde merdiven benzeri bir görüntü vermektedir. Dolayısıyla, LAMP reaksiyonu, farklı boyutlarda birçok bant üretir, buradaki ana faktör, dış primerlerin varlığıdır. Dış primerlerden birinin şablona bağlanmaması, ilmekli yapının oluşmasını engellediğinden, sonuç agaroz jel üzerinde çok fazla bant göstermedi (Şekil 5.1., 5.2.) (Şekil 5.3., 5.4.) (5).

6.2. SONUÇ

RT-LAMP testi, enfeksiyon spektrumunda yer alan kanatlı ile tek tırnaklı hayvanlarda aktif bir BNV enfeksiyonunun hızlı tespitini ve ayrımını kolaylaştırır. Bu çalışmada, RT-LAMP testinin Real-time RT -PCR testinden daha duyarlı olduğu ve 10 pg'ye kadar BNV RNA'sını saptayabildiği kanıtlanmıştır. Ayrıca, RT-LAMP analizi sadece temel moleküler ve teknik beceriler gerektirir ve sonuçların yorumlanması, reaksiyon karışımındaki floresanların görsel olarak değerlendirilmesi kadar basit olabilir. Ek olarak, LAMP yaklaşımının en önemli pratik avantajlarından biri, temel ve çok ucuz ekipman kullanması ve bu da testi kırsal ve uzak yerlerde sınırlı kaynaklarla uygulamaya uygun hale getirmesidir. Ayrıca, BNV dünya çapında birçok ülkede ekonomik bir yük olduğu için hala önemli bir halk sağlığı sorunudur. Son birkaç on yılda, bu virüs dünyaya hızla yayıldı (14, 15). Bunu hafifletmeye yardımcı olmak için hızlı ve etkili teşhis yöntemleri geliştirmek gereklidir.

RT-LAMP, klinik örneklerde WNV RNA'nın erken tespiti için diğer moleküler temelli yaklaşımlar gibi destekleyici bir tanı aracı olarak amaçlanabilir. Bununla birlikte, altın standart konvansiyonel virüs izolasyonunun, virüsün duyarlı bir hücre hattında ilk amplifikasyonu için önemli olmaya devam edeceği ve bunun nedeni, sonraki moleküler karakterizasyon çalışmaları için gereken yüksek miktarda viral RNA'dır.

KAYNAKLAR

1. Abramowitz S. Towards inexpensive DNA diagnostics. Trends Biotechnol. 1996;14(10):397-401. Epub 1996/10/01. doi: 10.1016/0167-7799(96)10051-2. PubMed PMID: 8987638.
2. Vrana KE. Advancing technologies in gene amplification. Trends Biotechnol. 1996;14(11):413-5. Epub 1996/11/01. doi: 10.1016/0167-7799(96)30022-x. PubMed PMID: 8940771.
3. Walker GT. Empirical aspects of strand displacement amplification. Genome Research. 1993;3(1):1-6.
4. Njiru ZK. Loop-Mediated Isothermal Amplification Technology: Towards Point of Care Diagnostics. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2012;6(6):e1572. doi: 10.1371/journal.pntd.0001572.
5. Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research. 2000;28(12):63e-. doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
6. Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. The American Journal of Tropical Medicine. 1940;s1-20(4):471-92. doi: 10.4269/ajtmh.1940.s1-20.471.
7. Petersen LR. Epidemiology of West Nile Virus in the United States: Implications for Arbovirology and Public Health. Journal of Medical Entomology. 2019;56(6):1456-62. doi: 10.1093/jme/tjz085.
8. Schaefer. MBCTJ. West Nile Virus. August 10, 2020.
9. Murgue B, Murri S, Triki H, Deubel V, Zeller HG. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. Ann N Y Acad Sci. 2001;951:117-26. Epub 2002/01/19. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb02690.x. PubMed PMID: 11797769.

10. Bernkopf H, Levine S, Nerson R. Isolation of west nile virus in israel. *The Journal of infectious diseases*. 1953:207-18.
11. Hurlbut HS, Rizk F, Taylor RM, Work TH. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *Am J Trop Med Hyg*. 1956;5(4):579-620. Epub 1956/07/01. doi: 10.4269/ajtmh.1956.5.579. PubMed PMID: 13354882.
12. Hubálek Z, Halouzka J. West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis*. 1999;5(5):643-50. Epub 1999/10/08. doi: 10.3201/eid0505.990505. PubMed PMID: 10511520; PubMed Central PMCID: PMC2627720.
13. Sejvar JJ. West nile virus: an historical overview. *Ochsner J*. 2003;5(3):6-10. PubMed PMID: 21765761.
14. Uyar Y, Bakır E. West Nile Virus (WNV) and Current Status of West Nile Virus in Turkey. *Turk Hij Den Biyol Derg*. 2016;73(3):279-92. doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.32757.
15. Bakonyi T, Haussig JM. West Nile virus keeps on moving up in Europe. *Euro Surveill*. 2020;25(46):2001938. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.46.2001938. PubMed PMID: 33213684.
16. Ciota AT, Kramer LD. Vector-Virus Interactions and Transmission Dynamics of West Nile Virus. *Viruses*. 2013;5(12):3021-47. PubMed PMID: doi:10.3390/v5123021.
17. Bakonyi T, Ivanics E, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, et al. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(4):618-23. doi: 10.3201/eid1204.051379. PubMed PMID: 16704810.
18. McMullen AR, Albayrak H, May FJ, Davis CT, Beasley DWC, Barrett ADT. Molecular evolution of lineage 2 West Nile virus. *The Journal of general virology*. 2013;94(Pt 2):318-25. Epub 2012/11/07. doi: 10.1099/vir.0.046888-0. PubMed PMID: 23136360.

19. Fall G, Di Paola N, Faye M, Dia M, Freire CCdM, Loucoubar C, et al. Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017;11(11):e0006078. doi: 10.1371/journal.pntd.0006078.
20. Hubálek Z, Halouzka J, Juricová Z, Sebesta O. First isolation of mosquito-borne West Nile virus in the Czech Republic. *Acta Virol*. 1998;42(2):119-20. Epub 1998/10/14. PubMed PMID: 9770080.
21. Lvov DK, Butenko AM, Gromashevsky VL, Kovtunov AI, Prilipov AG, Kinney R, et al. West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. In: Calisher CH, Griffin DE, editors. *Emergence and Control of Zoonotic Viral Encephalitides*. Vienna: Springer Vienna; 2004. p. 85-96.
22. Bondre VP, Jadi RS, Mishra AC, Yergolkar PN, Arankalle VA. West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *J Gen Virol*. 2007;88(Pt 3):875-84. Epub 2007/02/28. doi: 10.1099/vir.0.82403-0. PubMed PMID: 17325360.
23. Vazquez A, Sanchez-Seco MP, Ruiz S, Molero F, Hernandez L, Moreno J, et al. Putative new lineage of west nile virus, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(3):549-52. Epub 2010/03/06. doi: 10.3201/eid1603.091033. PubMed PMID: 20202444; PubMed Central PMCID: PMC3322021.
24. Fall G, Diallo D, Soumaila H, Ndiaye EH, Lagare A, Sadio BD, et al. First Detection of the West Nile Virus Koutango Lineage in Sandflies in Niger. *Pathogens*. 2021;10(3):257. PubMed PMID: doi:10.3390/pathogens10030257.
25. Fall G, Diallo M, Loucoubar C, Faye O, Sall AA. Vector competence of *Culex neavei* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Senegal for lineages 1, 2, Koutango and a putative new lineage of West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90(4):747-54. Epub 2014/02/26. doi: 10.4269/ajtmh.13-0405. PubMed PMID: 24567319; PubMed Central PMCID: PMC3973524.

26. Pachler K, Lebl K, Berer D, Rudolf I, Hubalek Z, Nowotny N. Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(12):2119-22. Epub 2014/11/25. doi: 10.3201/eid2012.140921. PubMed PMID: 25418009; PubMed Central PMCID: PMC4257835.
27. Fall AG, Lo MM, Diouf ND, Ciss M, Bitèye B, Bakhoun MT, et al. West Nile Fever: A Challenge in Sahelian Africa. In: Kardjadj M, Diallo A, Lancelot R, editors. *Transboundary Animal Diseases in Sahelian Africa and Connected Regions*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 149-77.
28. Bakonyi T, Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N. Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerging infectious diseases.* 2005;11(2):225-31. doi: 10.3201/eid1102.041028. PubMed PMID: 15752439.
29. Martín-Acebes MA, Saiz J-C. West Nile virus: A re-emerging pathogen revisited. *World J Virol.* 2012;1(2):51-70. doi: 10.5501/wjv.v1.i2.51. PubMed PMID: 24175211.
30. Hunt TA, Urbanowski MD, Kakani K, Law LM, Brinton MA, Hobman TC. Interactions between the West Nile virus capsid protein and the host cell-encoded phosphatase inhibitor, I2PP2A. *Cell Microbiol.* 2007;9(11):2756-66. Epub 2007/09/18. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01046.x. PubMed PMID: 17868381.
31. Moesker B, Rodenhuis-Zybert IA, Meijerhof T, Wilschut J, Smit JM. Characterization of the functional requirements of West Nile virus membrane fusion. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 2):389-93. Epub 2009/10/16. doi: 10.1099/vir.0.015255-0. PubMed PMID: 19828760.
32. Sánchez MD, Pierson TC, McAllister D, Hanna SL, Puffer BA, Valentine LE, et al. Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. *Virology.* 2005;336(1):70-82. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.02.020>.
33. Youn S, Ambrose RL, Mackenzie JM, Diamond MS. Non-structural protein-1 is required for West Nile virus replication complex formation and viral RNA synthesis.

- Viol J. 2013;10:339. Epub 2013/11/20. doi: 10.1186/1743-422x-10-339. PubMed PMID: 24245822; PubMed Central PMCID: PMC3842638.
34. Rossi SL, Ross TM, Evans JD. West Nile virus. Clin Lab Med. 2010;30(1):47-65. doi: 10.1016/j.cll.2009.10.006. PubMed PMID: 20513541.
 35. Colpitts TM, Conway MJ, Montgomery RR, Fikrig E. West Nile Virus: biology, transmission, and human infection. Clin Microbiol Rev. 2012;25(4):635-48. Epub 2012/10/05. doi: 10.1128/cmr.00045-12. PubMed PMID: 23034323; PubMed Central PMCID: PMC3485754.
 36. Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. Virology. 1998;245(2):203-15. Epub 1998/06/24. doi: 10.1006/viro.1998.9156. PubMed PMID: 9636360.
 37. Evans JD, Seeger C. Differential effects of mutations in NS4B on West Nile virus replication and inhibition of interferon signaling. J Virol. 2007;81(21):11809-16. Epub 2007/08/24. doi: 10.1128/jvi.00791-07. PubMed PMID: 17715229; PubMed Central PMCID: PMC2168815.
 38. Samuel MA, Diamond MS. Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. J Virol. 2006;80(19):9349-60. doi: 10.1128/JVI.01122-06. PubMed PMID: 16973541.
 39. Kilpatrick AM, Kramer LD, Campbell SR, Alleyne EO, Dobson AP, Daszak P. West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm. Emerg Infect Dis. 2005;11(3):425-9. Epub 2005/03/11. doi: 10.3201/eid1103.040364. PubMed PMID: 15757558; PubMed Central PMCID: PMC3298247.
 40. Shocket MS, Verwillow AB, Numazu MG, Slamani H, Cohen JM, El Moustaid F, et al. Transmission of West Nile and other temperate mosquito-borne viruses peaks at intermediate environmental temperatures. bioRxiv. 2020:597898. doi: 10.1101/597898.

41. Bin H, Grossman Z, Pokamunski S, Malkinson M, Weiss L, Duvdevani P, et al. West Nile fever in Israel 1999-2000: from geese to humans. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;951:127-42. Epub 2002/01/19. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb02691.x. PubMed PMID: 11797770.
42. Eda D, YILDIRIM Y. Batı Nil Virüs Enfeksiyonu. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi.* 2016;27(2):139-48.
43. Fulton CDM, Beasley DWC, Bente DA, Dineley KT. Long-term, West Nile virus-induced neurological changes: A comparison of patients and rodent models. *Brain, Behavior, & Immunity - Health.* 2020;7:100105. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2020.100105>.
44. Byrne SN, Halliday GM, Johnston LJ, King NJ. Interleukin-1beta but not tumor necrosis factor is involved in West Nile virus-induced Langerhans cell migration from the skin in C57BL/6 mice. *J Invest Dermatol.* 2001;117(3):702-9. Epub 2001/09/21. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01454.x. PubMed PMID: 11564180.
45. Donadieu E, Bahuon C, Lowenski S, Zientara S, Couplier M, Lecollinet S. Differential virulence and pathogenesis of West Nile viruses. *Viruses.* 2013;5(11):2856-80. doi: 10.3390/v5112856. PubMed PMID: 24284878.
46. Monath TP, Cropp CB, Harrison AK. Mode of entry of a neurotropic arbovirus into the central nervous system. Reinvestigation of an old controversy. *Lab Invest.* 1983;48(4):399-410. Epub 1983/04/01. PubMed PMID: 6300550.
47. Lim SM, Koraka P, Osterhaus AD, Martina BE. West Nile virus: immunity and pathogenesis. *Viruses.* 2011;3(6):811-28. Epub 2011/10/14. doi: 10.3390/v3060811. PubMed PMID: 21994755; PubMed Central PMCID: PMC3185772.
48. Seo YJ, Hahm B. Type I interferon modulates the battle of host immune system against viruses. *Adv Appl Microbiol.* 2010;73:83-101. Epub 2010/08/31. doi: 10.1016/s0065-

- 2164(10)73004-5. PubMed PMID: 20800760; PubMed Central PMCID: PMCPMC7112037.
49. Shrestha B, Wang T, Samuel MA, Whitby K, Craft J, Fikrig E, et al. Gamma interferon plays a crucial early antiviral role in protection against West Nile virus infection. *J Virol.* 2006;80(11):5338-48. Epub 2006/05/16. doi: 10.1128/jvi.00274-06. PubMed PMID: 16699014; PubMed Central PMCID: PMCPMC1472130.
 50. Ma D, Jiang D, Qing M, Weidner JM, Qu X, Guo H, et al. Antiviral effect of interferon lambda against West Nile virus. *Antiviral Res.* 2009;83(1):53-60. Epub 2009/06/09. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.03.006. PubMed PMID: 19501257; PubMed Central PMCID: PMCPMC2694136.
 51. Wang Y, Lobigs M, Lee E, Müllbacher A. CD8+ T cells mediate recovery and immunopathology in West Nile virus encephalitis. *J Virol.* 2003;77(24):13323-34. Epub 2003/12/04. doi: 10.1128/jvi.77.24.13323-13334.2003. PubMed PMID: 14645588; PubMed Central PMCID: PMCPMC296062.
 52. Asensio VC, Maier J, Milner R, Boztug K, Kincaid C, Moulard M, et al. Interferon-independent, human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated induction of CXCL10/IP-10 gene expression by astrocytes in vivo and in vitro. *J Virol.* 2001;75(15):7067-77. Epub 2001/07/04. doi: 10.1128/jvi.75.15.7067-7077.2001. PubMed PMID: 11435587; PubMed Central PMCID: PMCPMC114435.
 53. Glass WG, Lim JK, Cholera R, Pletnev AG, Gao JL, Murphy PM. Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *J Exp Med.* 2005;202(8):1087-98. Epub 2005/10/19. doi: 10.1084/jem.20042530. PubMed PMID: 16230476; PubMed Central PMCID: PMCPMC2213214.
 54. Sari T, Menemenlioglu D, Aydin E, Ozden TN, Kizilelma M, Irmak H, et al. ASSESSMENT OF WEST NILE VIRUS INFECTION IN TURKEY BASED ON TWO

RECENT CASES. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 2019;50(1):86-93.

55. Ergunay K, Whitehouse CA, Ozkul A. Current status of human arboviral diseases in Turkey. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011;11(6):731-41. Epub 2010/12/08. doi: 10.1089/vbz.2010.0162. PubMed PMID: 21133776.
56. Kalaycioglu H, Korukluoglu G, Ozkul A, Oncul O, Tosun S, Karabay O, et al. Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011. Eurosurveillance. 2012;17(21):20182. doi: doi:<https://doi.org/10.2807/es.e17.21.20182-en>.
57. Heperkan Y, Ari A. A Study on the Presence of Arbovirus Infection in Turkey. Turk Ijiyen ve Tecrubi Biyoloji Dergisi. 1964;24(2):113-18.
58. TOSUN S. Batı Nil Virüs Enfeksiyonu. Journal of Experimental and Clinical Medicine. 2012. doi: 10.5835/jecm.omu.29.s3.015.
59. Radda A. Antibodies against group A and B Arboviruses in domestic animals from Turkey. EU Tıp Fak Mec. 1971;10:227-30.
60. Meço O. [West Nile arbovirus antibodies with hemagglutination inhibition (HI) in residents of Southeast Anatolia]. Mikrobiyol Bul. 1977;11(1):3-17. Epub 1977/01/01. PubMed PMID: 857119.
61. Ozkul A, Yildirim Y, Pinar D, Akcali A, Yilmaz V, Colak D. Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey. Epidemiol Infect. 2006;134(4):826-9. Epub 2005/12/01. doi: 10.1017/s0950268805005492. PubMed PMID: 16316496; PubMed Central PMCID: PMCPMC2870448.
62. Ozkul A, Ergunay K, Koysuren A, Alkan F, Arsava EM, Tezcan S, et al. Concurrent occurrence of human and equine West Nile virus infections in Central Anatolia, Turkey:

- the first evidence for circulation of lineage 1 viruses. *Int J Infect Dis.* 2013;17(7):e546-51. Epub 2013/03/23. doi: 10.1016/j.ijid.2013.02.005. PubMed PMID: 23517780.
63. Ergunay K, Ozer N, Us D, Ozkul A, Simsek F, Kaynas S, et al. Seroprevalence of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in southeastern Turkey: first evidence for tick-borne encephalitis virus infections. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007;7(2):157-61. Epub 2007/07/14. doi: 10.1089/vbz.2006.0574. PubMed PMID: 17627432.
64. Ergünay K, Aydoğan S, Menemenlioğlu D, Sener B, Lederer S, Steinhagen K, et al. [Investigation of West Nile virus in central nervous system infections of unknown etiology in Ankara, Turkey]. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44(2):255-62. Epub 2010/06/17. PubMed PMID: 20549960.
65. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988;239(4839):487-91. Epub 1988/01/29. doi: 10.1126/science.2448875. PubMed PMID: 2448875.
66. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985;230(4732):1350-4. Epub 1985/12/20. doi: 10.1126/science.2999980. PubMed PMID: 2999980.
67. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature.* 1991;350(6313):91-2. Epub 1991/03/07. doi: 10.1038/350091a0. PubMed PMID: 1706072.
68. Guatelli JC, Whitfield KM, Kwoh DY, Barringer KJ, Richman DD, Gingeras TR. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(5):1874-8. Epub 1990/03/01. doi: 10.1073/pnas.87.5.1874. PubMed PMID: 2308948; PubMed Central PMCID: PMC53586.

69. Walker GT, Little MC, Nadeau JG, Shank DD. Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(1):392-6. Epub 1992/01/01. doi: 10.1073/pnas.89.1.392. PubMed PMID: 1309614; PubMed Central PMCID: PMCPMC48243.
70. Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JG, Malinowski DP. Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(7):1691-6. Epub 1992/04/11. doi: 10.1093/nar/20.7.1691. PubMed PMID: 1579461; PubMed Central PMCID: PMCPMC312258.
71. Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*. 2015;53(1):1-5. doi: 10.1007/s12275-015-4656-9.
72. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of infection and chemotherapy*. 2009;15(2):62-9.
73. Chander Y, Koelbl J, Puckett J, Moser MJ, Klingele AJ, Liles MR, et al. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Frontiers in Microbiology*. 2014;5(395). doi: 10.3389/fmicb.2014.00395.
74. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature protocols*. 2008;3(5):877-82.
75. Zhang J, Borth W, Lin B, Melzer M, Shen H, Pu X, et al. Multiplex detection of three banana viruses by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Tropical Plant Pathology*. 2018;43(6):543-51.
76. Hadersdorfer J, Neumüller M, Treutter D, Fischer T. Fast and reliable detection of Plum pox virus in woody host plants using the Blue LAMP protocol. *Annals of Applied Biology*. 2011;159(3):456-66.

77. Mori Y, Hirano T, Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC biotechnology*. 2006;6(1):3.
78. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*. 2002;16(3):223-9. doi: <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>.
79. Abd-Elsalam KA. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *african Journal of biotechnology*. 2003;2(5):91-5.
80. PrimerExplorer. 2020.
81. Torres C, Vitalis EA, Baker BR, Gardner SN, Torres MW, Dzenitis JM. LAVA: An Open-Source Approach To Designing LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) DNA Signatures. *BMC Bioinformatics*. 2011;12(1):240. doi: 10.1186/1471-2105-12-240.
82. Fu S, Qu G, Guo S, Ma L, Zhang N, Zhang S, et al. Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2011;163(7):845-50.
83. Shirato K, Yano T, Senba S, Akachi S, Kobayashi T, Nishinaka T, et al. Detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Virology journal*. 2014;11(1):139.
84. Nakauchi M, Takayama I, Takahashi H, Tashiro M, Kageyama T. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid diagnosis of avian influenza A (H7N9) virus infection. *Journal of virological methods*. 2014;204:101-4.
85. Hoos J, Peters RM, Tabatabai J, Grulich-Henn J, Schnitzler P, Pfeil J. Reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of respiratory

syncytial virus directly from nasopharyngeal swabs. *Journal of virological methods*. 2017;242:53-7.

86. Nyan D-C, Swinson KL. A method for rapid detection and genotype identification of hepatitis C virus 1–6 by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *International Journal of Infectious Diseases*. 2016;43:30-6.
87. Oloniniyi OK, Kurosaki Y, Miyamoto H, Takada A, Yasuda J. Rapid detection of all known ebolavirus species by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of virological methods*. 2017;246:8-14.
88. Tian B, Qiu Z, Ma J, de la Torre TZG, Johansson C, Svedlindh P, et al. Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loop-mediated isothermal amplification and AC susceptometry. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016;86:420-5.
89. Hu S-f, Li M, Zhong L-l, Lu S-m, Liu Z-x, Pu J-y, et al. Development of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes 1–4. *BMC microbiology*. 2015;15(1):1-15.
90. Lau YL, Lai MY, Teoh BT, Abd-Jamil J, Johari J, Sam SS, et al. Colorimetric Detection of Dengue by Single Tube Reverse-Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138694. Epub 2015/09/19. doi: 10.1371/journal.pone.0138694. PubMed PMID: 26384248; PubMed Central PMCID: PMC4575147.
91. Ocwieja KE, Sherrill-Mix S, Liu C, Song J, Bau H, Bushman FD. A reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay optimized to detect multiple HIV subtypes. *PloS one*. 2015;10(2):e0117852.
92. Damhorst GL, Duarte-Guevara C, Chen W, Ghonge T, Cunningham BT, Bashir R. Smartphone-imaged HIV-1 reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) on a chip from whole blood. *Engineering*. 2015;1(3):324-35.

93. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;289(1):150-4. doi: <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921>.
94. Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex, M. avium, and M. intracellulare in sputum samples. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(6):2616-22.
95. Curtis KA, Rudolph DL, Owen SM. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of virological methods*. 2008;151(2):264-70.
96. Hill J, Beriwal S, Chandra I, Paul VK, Kapil A, Singh T, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of Escherichia coli. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(8):2800-4.
97. Dukes J, King D, Alexandersen S. Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *Archives of virology*. 2006;151(6):1093-106.
98. Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao P, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in medical virology*. 2008;18(6):407-21.
99. Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K-I. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*. 2009;46(3):167-72.
100. Zoheir KM, Allam AA. A rapid method for sexing the bovine embryo. *Animal reproduction science*. 2010;119(1-2):92-6.

101. Parida M, Horioke K, Ishida H, Dash PK, Saxena P, Jana AM, et al. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(6):2895-903.
102. Maeda H, Koikeguchi S, Fujimoto C, Tanimoto I, Yoshizumi W, Nishimura F, et al. Detection of periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* by loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2005;43(2):233-9.
103. Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. *Clinical chemistry*. 2001;47(9):1742-3.
104. Peyrefitte CN, Boubis L, Coudrier D, Bouloy M, Grandadam M, Tolou HJ, et al. Real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Rift Valley fever virus. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(11):3653-9.
105. Mabey D, Peeling RW, Ustianowski A, Perkins MD. Diagnostics for the developing world. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2(3):231-40.
106. Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *Journal of biochemical and biophysical methods*. 2007;70(3):499-501.
107. Lin Z, Zhang Y, Zhang H, Zhou Y, Cao J, Zhou J. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and real-time PCR method targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Veterinary parasitology*. 2012;185(2-4):296-300.
108. Francois P, Tangomo M, Hibbs J, Bonetti E-J, Boehme CC, Notomi T, et al. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2011;62(1):41-8.

109. Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. *Journal of infection and chemotherapy*. 2013;19(3):404-11.
110. Wang Q, Zhou Y, Li S, Zhuo C, Xu S, Huang L, et al. Real-time fluorescence loop mediated isothermal amplification for the detection of *Acinetobacter baumannii*. *PloS one*. 2013;8(7):e66406.
111. Watts MR, James G, Sultana Y, Ginn AN, Outhred AC, Kong F, et al. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *Strongyloides stercoralis* in stool that uses a visual detection method with SYTO-82 fluorescent dye. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2014;90(2):306-11.
112. Sahoo PR, Sethy K, Mohapatra S, Panda D. Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases. *Veterinary world*. 2016;9(5):465.
113. Dhama K, Karthik K, Chakraborty S, Tiwari R, Kapoor S, Kumar A, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*. 2014;17(2):151-66.
114. Bista BR, Ishwad C, Wadowsky RM, Manna P, Randhawa PS, Gupta G, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of BK virus. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(5):1581-7.
115. Wastling SL, Picozzi K, Kakembo AS, Welburn SC. LAMP for human African trypanosomiasis: a comparative study of detection formats. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(11):e865.
116. Hsieh K, Mage PL, Csordas AT, Eisenstein M, Soh HT. Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-

- supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP). *Chemical communications*. 2014;50(28):3747-9.
117. Karthik K, Rathore R, Thomas P, Arun T, Viswas K, Dhama K, et al. New closed tube loop mediated isothermal amplification assay for prevention of product cross-contamination. *MethodsX*. 2014;1:137-43.
 118. Bi A, Nakajima C, Fukushima Y, Tamaru A, Sugawara I, Kimura A, et al. A rapid loop-mediated isothermal amplification assay targeting hspX for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Japanese journal of infectious diseases*. 2012;65(3):247-51.
 119. Fischbach J, Xander NC, Frohme M, Glökler JF. Shining a light on LAMP assays' A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *Biotechniques*. 2015;58(4):189-94.
 120. Lee JW, Won Y-J, Lee S-G, Paik S-Y. Development of a Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for the Detection of West Nile Virus. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2020;13(10).
 121. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, Nitsche A, Pauli G. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *Journal of Virological Methods*. 2007;146(1):355-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.05.021>.
 122. Herman N. Real-Time Rt-Pcr Assays To Detect West Nile Virus In Mosquito Pools. 2015.
 123. Vázquez A, Herrero L, Negredo A, Hernández L, Sánchez-Seco MP, Tenorio A. Real time PCR assay for detection of all known lineages of West Nile virus. *Journal of Virological Methods*. 2016;236:266-70. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.07.026>.

124. Lanciotti Robert S, Kerst Amy J, Nasci Roger S, Godsey Marvin S, Mitchell Carl J, Savage Harry M, et al. Rapid Detection of West Nile Virus from Human Clinical Specimens, Field-Collected Mosquitoes, and Avian Samples by a TaqMan Reverse Transcriptase-PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(11):4066-71. doi: 10.1128/JCM.38.11.4066-4071.2000.
125. Shi P-Y, Kauffman Elizabeth B, Ren P, Felton A, Tai Jennifer H, Dupuis Alan P, et al. High-Throughput Detection of West Nile Virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(4):1264-71. doi: 10.1128/JCM.39.4.1264-1271.2001.
126. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. 1991;350:91-2.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Saeed Salah Alsmami Ahmed

Yabancı Dili: İngilizce, Türkçe

Eğitim Durumu

Lise: Bashir Mohamed Saeed Lisesi (2010-2013)

Lisans: The National Ribat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi laboratuvar (2013-2017)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (2019-2022)

Yayınlar ve Bildiriler

“Ethical Issues Concerned with CRISPR-Cas9 System” başlıklı bildiri 9-12 Aralık 2021’de 6. Uluslararası Öğrenci Bilimler Kongresinde sunulmuştur.

İş Tecrübesi

Kurumu: The National Ribat Üniversitesi Lisansüstü Çalışmalar Koleji Tıbbi Araştırma Merkezi

Görevi: Laboratuvar Teknisyeni

Yılları: 2017-2018

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR



ETHICAL ISSUES CONCERNED WITH CRISPR-CAS9 SYSTEM

Saeed Salah Alsmami Ahmed

138

CRISPR is an abbreviation for (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) and it is a group of DNA sequences (short repeated sequences) that are naturally found in the genomes of prokaryotes. Although CRISPR acts as a defense mechanism to protect prokaryotes against infesting plasmids and viruses, researchers adapted it to work similarly in the lab to cure life-threatening genetic diseases, design drugs, and enable accelerate experiments. Generally, the use of CRISPR technology on somatic cells for therapeutic purposes is morally fairly agreeable, however, its use in germlines still ethically controversial. Here we review the main ethical issues concerned with CRISPR

technology which include the following: 1) Biosafety when using on germline; 2) Equal access to the peoples; 3) misuse of technology for non-therapeutic purposes; 4) Ecological disequilibrium. We conclude that CRISPR is not perfect and still being discovered. Especially after it became clear that data and full knowledge about benefits and risks are unavailable. Public discussion over the social, ethical, and legal implications are needed, as long as CRISPR technology advances, ethical decision-making must advance with it.

Keywords: CRISPR-Cas9, Gene Editing, Germline, Social Implications, Ethical Considerations.