



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KEDİLERDE ONKOJENİK ETKİLİ
HEPADNAVİRUS ENFEKSİYONLARININ
EPİDEMİYOLOJİK STATÜSÜNÜN MOLEKÜLER
METOTLARLA ARAŞTIRILMASI**

Ece ADIGÜZEL

VİROLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tuba Çiğdem OĞUZOĞLU

**ANKARA
2023**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEDİLERDE ONKOJENİK ETKİLİ
HEPADNAVİRUS ENFEKSİYONLARININ
EPİDEMİYOLOJİK STATÜSÜNÜN MOLEKÜLER
METOTLARLA ARAŞTIRILMASI

Ece ADIGÜZEL

VİROLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tuba Çiğdem OĞUZOĞLU

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
21L0239016 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kedilerde Onkojenik Etkili Hepadnavirus Enfeksiyonlarının Epidemiyolojik Statüsünün Moleküler Metotlarla Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ece ADIGÜZEL

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Viroloji Anabilim Dalında
Ece ADIGÜZEL tarafından hazırlanan “Kedilerde Onkojenik Etkili
Hepadnavirus Enfeksiyonlarının Epidemiyolojik Statüsünün Moleküler Metotlarla
Araştırılması”
Adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul/red edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	1
1.2. Amaç ve Kapsam	3
1.3. Taksonomi	6
1.4. Etiyoloji	6
1.4.1. Yüzey (Surface-S) Gen Bölgesi	10
1.4.2. Polimeraz gen bölgesi	10
1.4.2.1. Terminal protein bölgesi	11
1.4.2.2. Ara bölge	12
1.4.2.3. Reverse transkriptaz (RT) bölgesi	12
1.4.2.4. RNase H bölgesi	12
1.4.3. Core gen bölgesi	12
1.4.4. X gen bölgesi	13
1.4.5. Hepadnavirus replikasyon siklusu	14
1.4.5.1. Viral bağlanma ve internalizasyon	14
1.4.5.2. cccDNA oluşumu	15
1.4.5.3. dsDNA oluşumu	15
1.4.5.4. Pre-genomik RNA'ların transkripsiyonu	15
1.4.5.5. Olgun partiküllerin ve SVP'lerin hücre dışına salınımı	16
1.4.6. Hepadnavirusların otofajiye etkisi	18
1.5. Epizootiyoloji	18
1.6. Epidemiyoloji	19
1.7. Klinik	21
1.8. Patogenez	21
1.9. İmmunité	23
1.10. Tanı	23
1.11. Kontrol	24
2. GEREÇ VE YÖNTEM	26
2.1. Gereç	26
2.1.1. Çalışmalarda Kullanılan Örnekler	26
2.1.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeleri	27
2.1.3. Cihazlar	28
2.2. Yöntem	28
2.2.1. Kan ve Serum Örneklerinin Hazırlanması	28
2.2.2. Organ ve Asites Örneklerinin Hazırlanması	29

2.2.3. Viral Nükleik Asit İzolasyonu	29
2.2.4. Polymerase Chain Reaction (PCR) Yardımıyla Tanı ve Moleküler Karakterizasyon	30
2.2.5. Tüm Genom Dizilemesi	31
2.2.6. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi	34
2.2.7. Amplikonların Purifikasyonu ve Dizin Analizi	34
2.2.8. Moleküler Karakterizasyon ve Filogenetik Analiz	34
2.2.9. Nükleotit Benzerliklerinin Belirlenmesi	35
2.2.10. Frekans (Sıklık) Analizi	35
3. BULGULAR	36
3.1. DCH Enfeksiyonu Nükleik Asiti Tarama Bulguları	36
3.2. Elde Edilen Epidemiyolojik Veriler ve İstatistiksel Analizler	37
3.3. DCH Enfeksiyonu Moleküler Karakterizasyon Bulguları	39
3.4. DCH Pozitif Örneklerle Ait Filogenetik Analiz Bulguları	41
3.5. DCH Pozitif Numunelere Ait Aminoasit ve Nükleotid Benzerliklerinin Karşılaştırılması	47
3.6. DCH Pozitif Örneklerde Ko-Enfeksiyon ve Hemogram Bulguları	55
4. TARTIŞMA	58
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
ÖZET	70
SUMMARY	71
KAYNAKLAR	72
EKLER	79
Ek-1 Etik Kurul Raporu	79
Ek-2 Çizelge. DCH pozitif bulunan bazı örneklerle ait hemogram çizelgesi	80
Ek-3 Çizelge. DCH pozitif örneklerin ekstraktlarındaki DNA miktarı	81
ÖZGEÇMİŞ	82

ÖNSÖZ

Onkojenite, mikrobiyal ajanların da dahil olduğu çok bileşenli yapıda kompleks bir süreçtir. Bazı viral etkenler de enfekte ettikleri canlılarda bu yönde bir etki gösterebilirler. Bu sürecin bir parçası olan İnsan Hepatit B virusu binlerce insanın ölümünden sorumlu tutulurken, *Hepadnaviridae* ailesinin yeni bir üyesi olan *felid* Hepadnavirus yakın zamanda pet hayvanlarında tanımlanmış olup, bu virusun sosyal yaşamın bir parçası haline gelen evcil kedilerde ortaya çıkaracağı etkiler, devam etmekte olan çalışmaların konusunu oluşturmaktadır.

Bu tez konusu, evcil kedilerin hepadnavirus (Domestic Cat Hepadnavirus, DCH) enfeksiyonlarının ülkemizde varlığı ve yaygınlığının saptanmasını kapsamakta olup, örneklenen hayvanlardan kayıt altına alınan bilgiler ışığında (yaş, ırk, cinsiyet, klinik bulgu, vb.) elde edilen verilerin istatistiksel analiz metotları kullanılarak enfeksiyon ile ilişkisinin sorgulanması hedeflenmiştir.

Tez kapsamında karaciğer enzimlerinde normalden sapma gösterenler başta olmak üzere, sağlıklı görünümlü ve klinik bulgulu olması ayırt edilmeksizin 550 kedi, Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı ve Veteriner Fakültesi Merkez Tanı Laboratuvar'ından alınan izinlerle (05/09/2018 tarih, toplantı no: 2018/17, dosya no: 2018/87, karar no: 2018/17/106, 22/07/2020 tarih, toplantı no: 2020/13, dosya no:2020/90, karar no: 2020/13/111 ve 07/07/2020 tarihli E-4710 sayılı yazı) örneklenmiştir. Tez çalışması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nce (27/05/2021 tarih ve 03 sayılı toplantı, proje no: 21L0239016) desteklenmiştir.

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında çalışma imkânı sunan ve akademik desteğini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a, zaman içinde danışman hocam olmaktan çok öteye geçen ve bana kanatlarının altında uçmayı öğretene, çoğu zaman sabrına ve sevgisine hayran kaldığım

danışman hocam Prof. Dr. Tuba Çiğdem OĞUZÖĞLU'na, eğitimim süresince yardımlarını ve güler yüzlerini asla esirgemeyen değerli Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri, Prof. Dr. Feray ALKAN, Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP, Prof. Dr. Mehmet Taner KARAOĞLU, Doç. Dr. Ayşe Zeynep AKKUTAY-YOLDAR ve Doç. Dr. İlke KARAYEL-HACIOĞLU'na, emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Yılmaz AKÇA'ya, uzakta olmasına rağmen kendi yoğunluğu içinde sorularıma aradığım cevapları bulmama yardım eden Doç Dr. B. Taylan KOÇ'a, tez verilerinin istatistiksel değerlendirmelerinde desteğini aldığım Prof.Dr. İ. Safa GÜRCAN'a, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı araştırma görevlileri ile lisansüstü öğrencilerine ve idari personeline, tezimi maddi olanaklarını sağladıklarından dolayı Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, yıllardır pek çok konuda fikrine ve bilgisine başvurduğum canım arkadaşım Veteriner Hekim Cansu DEMİRDEN'e, yardımlarını ve desteğini asla unutmayacağım doktora öğrencisi arkadaşım Veteriner Hekim Eda ERDEM ŞAHİNKESEN'e, izinli olarak laboratuvara geldiğim günlerde eksikliğimi fark ettirmeyen ve her zaman desteğini hissettiğim mesai arkadaşım Veteriner Hekim Onur OKUR'a, hayata bakış açısıyla bana yeni bir pencere açan, gülümsemeyi hayat felsefesi olarak benimsemiş canım arkadaşım Gamze KAYA'ya, mesafelerin bir önemi olmadığını öğreten ve nerede olurlarsa olsunlar bana güç veren canım arkadaşlarım Ecem TAŞDEMİR ve Çağlar Tolgahan KAYA'ya teşekkür ederim.

Son olarak, desteğinden asla şüphe etmediğim, en başından bu yana yolculuğuma eşlik eden ve hakkını ödeyemeyeceğimi bildiğim annem Sevim ADIGÜZEL'e ve hayatım boyunca hayalini kurduğum her yeni hevesimde, ilk adımı atarak bana cesaret veren dünya tatlısı babam Adil ADIGÜZEL'e hissettirdikleri derin sevgi, karşılıksız emekleri ve hayatıma kattıkları anlamın yanı sıra ettikleri umut tohumları için sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim...

SİMGELER VE KISALTMALAR

AuAg	Avustralya Antijeni
bp	Baz Çifti/Base Pair
C ORF	Core Açık Okuma Alanı
cccDNA	Kovalent Kapalı Sirküler Deoksiribo Nükleik Asit
DCH	Evcil Kedi Hepadnavirusu
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribo Nükleik Asit Nükleotid Bazları
dsDNA	Double Stranded Linear Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
ER	Endoplasmik Retikulum
ϵ	Epsilon
FCoV	Feline Corona Virus
FeLV	Feline Leukemia Virus
FIV	Feline Immunodeficiency Virus
FPV	Feline Panleukopenia Virus
HBcAg	Nükleokapsit Core Proteinleri
HBeAg	Pre-core Proteinini
HBsAg	İnsan Hepatit B Virusu
HBV	Nükleokapsit Yüzey Proteinleri
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virus
HSPG	Heparin Sülfat Proteoglikanlar
ICTV	Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi
kb	Kilobaz
KDa	Kilo Dalton
LHB	Large (büyük) Hepatit B yüzey proteini
MHB	Middle (orta) Hepatit B yüzey proteini
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
μ l	Mikrolitre
ml	Mililitre

nm	Nanometre
nmol	Nanomol
NTCP	Sodyum Taurokolat Ko-transporting Polipeptid
ORF	Açık Okuma Alanı
PCR	Polymerase Chain Reaction
PgRNA	Pre-genomik Ribonükleik-Asit
P ORF	Polymerase Açık Okuma Alanı
RcDNA	Released-circular Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
RT	Reverse Transkriptaz
SHB	Small (küçük) Hepatit B Yüzey Proteini
S ORF	Surface Açık Okuma Alanı
SVP	Subviral Partiküller
TAE	Tris Asetat Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
X ORF	X Açık Okuma Alanı

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. <i>Hepadnaviridae</i> taksonomik düzeni	6
Şekil 1.2. DCH genom yapısı	7
Şekil 1.3. DCH'ye ait epsilon ve HBV'ye ait epsilon yapısı	9
Şekil 1.4. Hepadnaviruslara ait polimeraz enzimi	11
Şekil 1.5. Hepadnavirusların replikasyon siklusu	17
Şekil 1.6. DCH enfeksiyonunun küresel yayılımı	20
Şekil 2.1. Tez çalışması kapsamında dizayn edilen primerlerin hedef gen bölgeleri	33
Şekil 3.1. Tespit edilen pozitifliklerin (n=23) örnek türüne göre dağılımı	36
Şekil 3.2. DCH tanı primerleri ve tüm genoma yönelik primerlerin jel görüntüsü	39
Şekil 3.3. Core gen bölgesine ait filogenetik analiz (n=21)	42
Şekil 3.4. Polimeraz gen bölgesine ait filogenetik analiz (n=17)	43
Şekil 3.5. Surface gen bölgesine ait filogenetik analiz (n=18)	44
Şekil 3.6. X gen bölgesine yönelik filogenetik analiz (n=17)	45
Şekil 3.7. Toplam 13 tüm genom dizini elde edilen Türkiye orijinli DCH örneğinin filogenetik analizi	46
Şekil 3.8. DCH pozitif örneklerle ait aminoasit farklılıkları	48
Şekil 3.9. Core gen bölgesine yönelik nükleotid benzerliklerinin analiz	50
Şekil 3.10. Tüm genomu aydınlatılan DCH pozitif örneklerin nükleotid benzerliklerinin karşılaştırılması	51
Şekil 3.11. X gen bölgesine yönelik nükleotid benzerliklerinin karşılaştırılması	52
Şekil 3.12. Polimeraz gen bölgesine yönelik nükleotid benzerliklerinin karşılaştırılması	53
Şekil 3.13. Surface gen bölgesine yönelik nükleotid benzerliklerinin karşılaştırılması	54
Şekil 3.14. Ko-enfeksiyonların değerlendirilmesine yönelik grafik	55
Şekil 3.15. Ko-enfeksiyon sonuçlarına ait grafik	55

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Hepadnaviruslara ait gen bölgeleri ve sentezlenen proteinler	9
Çizelge 2.1. DCH tanısında kullanılan primer dizinler	30
Çizelge 2.2. PCR analizlerinde kullanılan karışımın komponent miktarları	31
Çizelge 2.3. Tüm genomun amplifikasyonu için kullanılan primerlere ait bilgiler	32
Çizelge 2.4. PCR döngü protokolü	33
Çizelge 3.1. Toplanan örnek sayısı ve DCH pozitifliği saptanan örneklerin sayısı	36
Çizelge 3.2. DCH nükleik aiti yönünden pozitif olan kedilere ait anamnez bilgileri	38
Çizelge 3.3. DCH pozitif sekans dizilerine ait Genbank Accession numaraları ve baz uzunlukları	40
Çizelge 3.4. DCH pozitif örneklerle ait nükleotit benzerlikleri	47
Çizelge 3.5. DCH pozitif kedilere ait frekans (sıklık) analiz çizelgesi	57
Çizelge 4.1. DCH pozitif bulunan bazı örneklerle ait hemogram çizelgesi	80
Çizelge 4.2. DCH pozitif örneklerin ekstraktlarındaki DNA miktarı	81

GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Hepadnavirus enfeksiyonları Veteriner Hekimliği alanında son on yılda pek çok hayvan türünde (yarasalar, kanatlı hayvanlar, soğuk kanlı hayvanlar, kemirgenler, farklı balık ve maymun türleri vb.) tanımlanmış olup, yakın zamanda pet hayvanlarından evcil kedi ve köpeklerde de tespit edilmiştir (Aghazadeh ve ark., 2018; Diakoudi ve ark., 2022; Drexler ve ark., 2011). İlk kez 2018 yılında Avustralya’da, kusma, ağırlık kaybı, büyük hücreli lenfoma ve FIV enfeksiyonunun eşlik ettiği klinik tabloya sahip bir kedide Hepadnavirus enfeksiyonu tanısı konulmuş olup (Aghazadeh ve ark., 2018), hastalıkla ilgili olarak giderek artan oranda farklı ülkelerden raporlar enfeksiyonun epidemiyolojik açıdan da yaygın olduğunu ortaya koymuştur (Anpuanandam ve ark., 2021; Capozza ve ark., 2023; Jeanes ve ark., 2021; Lanave ve ark., 2019; Piewbang ve ark., 2020; Stone ve ark., 2022; Takahashi ve ark., 2022).

Hepadnaviridae’ye ait etkenlerin kökeni, Bronz ve Demir çağlarına ait kemik ve diş örneklerinde bu ailenin prototip ajanı olan insan Hepatit B Virus (HBV) hakkında yapılan çalışmalara dayandırılmış olup, farklı coğrafya ve dönemlerde tespit edilen genotiplerin, belgelenmiş insan göçleriyle uyumlu olduğu bulunmuştur (Mühlemann ve ark., 2018). Ayrıca kökene yönelik bu çalışmalar, bu aileye ait üyelerin enfekte ettikleri konakçılarla beraber evrimleştiğine dair kanıtlar sunmaktadır (Lauber ve ark., 2017). Rekombinasyon analizleri, bazı insan HBV genotiplerinin diğerlerinin atası olduğu şeklinde yorumlanmaktadır (Mühlemann ve ark., 2018). Bu bağlamda, evcil kedilerdeki Hepadnavirus (Domestic Cat Hepadnavirus-DCH) suşlarının evrimsel sürecinde rekombinasyonun olası bir rolü olabileceğine dikkat çeken çalışmalar da bulunmakta olup, DCH’nin genomik analizleri, bu etkenin prototip insan virusuna genetik açıdan benzer olduğunu ortaya koymaktadır (Anpuanandam ve ark., 2021; Lanave ve ark., 2019; Piewbang ve ark., 2020). HBV ile DCH genomlarının yüzey proteinlerinde aminoasit benzerlikleri

bulunduğu (Stone ve ark., 2022), her iki virusun hücreye girişte aynı reseptörleri (NTCP) kullanabildiği ve HBV enfeksiyonunun deneysel araştırmalarında DCH virusunun model olarak kullanılabileceği de ileri sürülen hipotezler arasındadır (Shofa ve ark., 2023). Yakın zamanda tespiti yapılan Evcil Köpek Hepadnaviruslarının ise genetik olarak DCH'ye yakın olduğu ve genomik yönden %98'e ulaşan benzerlik oranı sergileyebildiği rapor edilmiştir (Diakoudi ve ark., 2022). Etkenin prototip virusla olan benzerliği göz önüne alındığında zooanthroponoz bir karaktere sahip olup olmadığı, yeni araştırmaları gerektiren bir durum olarak yorumlanmaktadır (Shofa ve ark., 2023). Ayrıca, filogenetik analizlerde dünyanın farklı ülkelerinde tespit edilen suşların ayrı gruplarda kümелendiği göz önüne alındığında, etkenin genetik çeşitliliği dikkat çekmektedir (Capozza ve ark., 2023). DCH viruslarının evrimsel süreci ortaya çıkarmak ve türler arası geçiş potansiyelini sorgulamak için, farklı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç olduğu rapor edilmektedir (Capozza ve ark., 2023; Shofa ve ark., 2023).

İnsan ve kedilerdeki Hepadnaviruslara ait benzer ilişkilendirmeye diğer bir örnek ise Retrovirus enfeksiyonlarındaki ko-enfeksiyon tablosudur. Örneğin, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) enfeksiyonunun, DCH ile enfekte kedilerde sıklıkla tespit edildiği rapor edilmiştir (Anpuanandam ve ark., 2021; Lanave ve ark., 2019). Benzer soru, ko-enfeksiyon oluşturabilecek potansiyele sahip Feline Leukemia Virus enfeksiyonunun Hepadnavirus enfeksiyonlarına ne oranda eşlik ettiği ya da edebileceği konusunu da gündeme getirmektedir.

Karaciğer fonksiyonlarında bozukluklarla ilişkilendirilen ALT ve AST enzimlerdeki artış, Hepadnaviruslarla enfekte kedilerde saptanmış olup, hemogram tablosunda anormal değerlere sahip kedilerde Hepadnavirus enfeksiyonundan şüphe edilmesi gerektiğini ortaya koyan istatistiksel analizler rapor edilmiştir (Anpuanandam ve ark., 2021; Lanave ve ark., 2019).

Bu tez kapsamında, rastgele örnekleme metoduyla seçilen 550 adet evcil kediden alınan örnekler bu tez çalışmasına dâhil edilmiştir. Toplam 23 adet örnek, konvensiyonel PCR metodu ile DCH yönünden pozitif bulunmuştur. Bu tez

kapsamında Hepadnavirusların farklı gen bölgelerine ait sentezlenen yeni primer çiftleri ile yapılan PCR çalışmaları ve sekans analizleri sonucunda toplamda 13 adet örneğin tüm genomik dizilemesi yapılmış, 10 adet pozitif örneğin parsiyel genomik dizinleri elde edilmiştir. Tüm dizinlerin GenBank veri tabanından accession numaraları alınmıştır.

1.2. Amaç ve Kapsam

DCH enfeksiyonunun yakın zamanda yapılan identifikasyonundan bu yana (Aghazadeh ve ark., 2018), bu enfeksiyonunun varlığı/yaygınlığı, ilişkilendirildiği olası klinik bulgular, epidemiyolojik statüsü, patogenezi mekanizması ve ko-enfeksiyon tablosu üzerine yapılan çalışmalar pek çok ülkeden rapor edilmiş olmakla birlikte (Anpuanandam ve ark., 2021; Capozza ve ark., 2023; Jeanes ve ark., 2021; Lanave ve ark., 2019; Piewbang ve ark., 2020; Stone ve ark., 2022; Takahashi ve ark., 2022), literatürde ülkemizde bu enfeksiyonun varlığını araştıran ve epidemiyolojik statüsünü ortaya çıkarmayı hedefleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Ülkemizde pet hayvanlarının bakım ve beslenmesi alanında evcil kediler büyük bir yer kaplamaktadır. Viroloji biliminin önemli etkenleri arasında yer alan Hepadnavirus enfeksiyonuna yakalanan kedilerde, etkenin kedilerin hem yaşam süresini hem de kalitesini etkileyebilme potansiyeli göz önüne alındığında Veteriner Hekimler tarafından tanı panellerine eklenebilecek yeni ve önemli bir patojen olduğu açıkça anlaşılmaktadır.

Bu doktora tez çalışmasında, moleküler tanı ve karakterizasyonun yapılabilmesi için başlıca Hepadnavirusların tespitinde kullanılan polymerase gen bölgesine yönelik pan-generik primerler ve Evcil Kedi Hepadnaviruslarının tanısına yönelik core gen bölgesinin amplifikasyonunu hedefleyen pan-generik primerler kullanılmış olup, full genoma ulaşabilmek için diğer gen bölgelerini de kapsayan farklı primer çiftleri bu tez çalışması kapsamında dizayn edilmiştir. Sekans analiz işlemlerini takiben, genetik farklılıkların ve benzerliklerin ortaya çıkarılması amacıyla örneklerimiz dünyadaki

hem cinsleri ile GenBank veri tabanından alınan diziler kullanılarak karşılaştırılmış olup, tüm ve parsiyel genom analizleri yapılarak, filogenetik ağaçlar hazırlanmıştır.

Bu tez çalışması ile;

- Kedilerde ilk identifikasyonu 2018 yılına dayanan ve pek çok ülkede rapor edilen, ancak ülkemizde henüz tespiti yapılmamış olan Hepadnavirus enfeksiyonlarının araştırılması,

- Öncelikle patogenezi sebebiyle karaciğer bozuklukları olan kediler başta olmak üzere, herhangi klinik bulgu gözetilmeksizin rastgele örnekleme metodu kullanılarak alınan tam kan, serum, organ ve asites sıvılarında konvansiyonel PCR yardımı ile Hepadnavirus nükleik asiti varlığının sorgulanması,

- DCH enfeksiyonun ülkemizde varlığının ve görülme sıklığının ortaya çıkarılması ve diğer ülkelerde rapor edilen DCH enfeksiyonu prevalansları ile karşılaştırılması,

- Örneklenen kedilere ait kaydedilen bilgiler ve çalışma sonuçları eşliğinde istatistiksel analizlerin yapılmasının yanı sıra, bu hastalığın ortaya çıkışında olası predispozisyon faktörlerinin sorgulanması ve bu faktörlerin DCH enfeksiyonunun epidemiyolojisindeki rolünün değerlendirilmesi,

- Literatür bilgide anılan kedilerde gözlenen immunsupresif Retrovirus enfeksiyonları (FeLV, FIV) başta olmak üzere, DCH nükleik asiti pozitif kedilerde Feline Panleukopenia Virus (FPV) ve Feline Corona Virus (FCoV) enfeksiyonlarının eş zamanlı bulunup bulunmadığının araştırılması ve ko-enfeksiyon tablosunun ortaya çıkarılması,

- Özel kliniklerde ve hayvan hastanelerinde henüz fazla tanınmayan bu enfeksiyonun veteriner tanı panellerine eklenerek farkındalık oluşturulması,

- Dünyadaki diğer çalışmalarda kullanılan tam kan ve serum örneklerinin yanı sıra, organ ve asites sıvılarının da çalışmaya dâhil edilmesi ile Hepadnavirus laboratuvar tanısında hangi örneklerin kullanılabileceğinin araştırılması,

- Hepadnavirus nükleik asiti yönünden pozitif bulunan örneklerde, farklı gen bölgelerine yönelik dizayn edilen primerler de kullanılarak, tüm ve parsiyel genom analizlerinin gerçekleştirilmesi ve genom yapısının aydınlatılması,

- Sekans analizleri yardımıyla elde edilen dizinlerin, uygun software programlar kullanılarak hizalanması ve ülkemiz orijinli dizinlerin GenBank veri tabanında bulunan dünyadaki hemcinsleri ile benzerlik/farklılıklarının karşılaştırılması,

- Genbank veri tabanından elde edilen dizinler de kullanılarak filogenetik ağaçlar hazırlanması ve oluşturulan ağaçlarda genetik yakınlık/uzaklık durumunun yorumlanması hedeflenmiştir.

1.2. Taksonomi

Evcil kedileri enfekte edebilen hepadnaviruslar, nomenklatürde Uluslararası Virus Taksonomisi Komitesi tarafından *Blubervirales* takımı, *Hepadnaviridae* ailesinde sınıflandırılmıştır. *Hepadnaviridae* ailesi, *Avihepadnavirus*, *Herpetohepadnavirus*, *Metahepadnavirus*, *Orthohepadnavirus* ve *Parahepadnavirus* olmak üzere 5 genustan oluşmaktadır. DCH, konakçı spektrumunda memeli canlıların bulunduğu bilinen *Orthohepadnavirus* genusunda klasifiye edilmiş olup, bu genusa ait 12 üyeden biridir. *Hepadnaviridae* ailesinin güncel klasifikasyonu Şekil 1.1.'de gösterilmiştir (ICTV, Erişim tarihi: 20/12/2022).

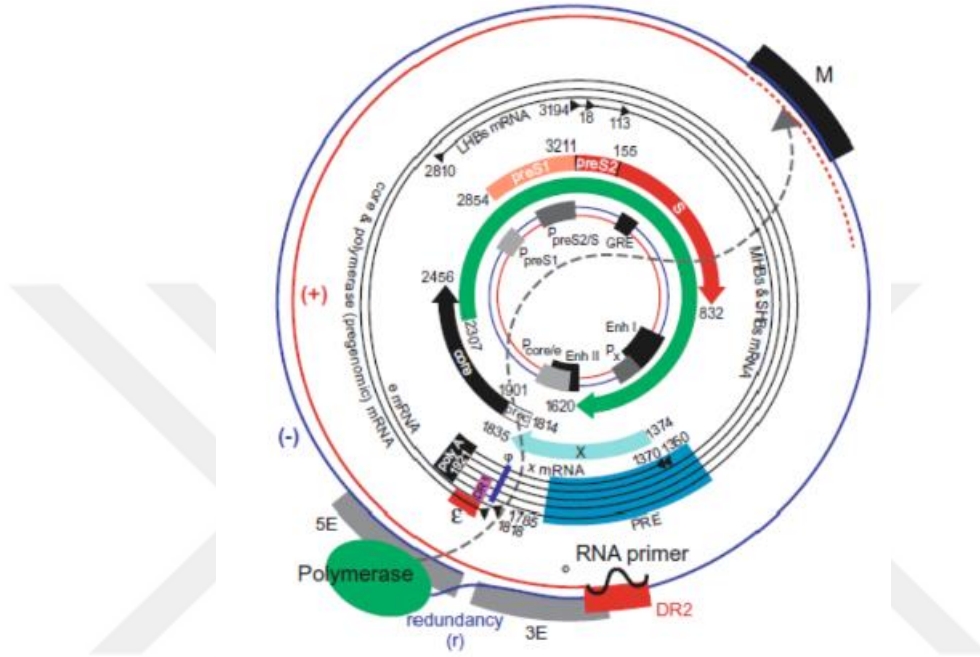
— Realm: Riboviria	
+ Kingdom: Orthornavirae	Realm: Riboviria
— Kingdom: Pararnavirae	Realm: Riboviria
— Phylum: Artverviricota	Kingdom: Pararnavirae
— Class: Revtraviricetes	Phylum: Artverviricota
— Order: Blubervirales	Class: Revtraviricetes
— Family: Hepadnaviridae	Order: Blubervirales
+ Genus: Avihepadnavirus	Family: Hepadnaviridae
+ Genus: Herpetohepadnavirus	Family: Hepadnaviridae
+ Genus: Metahepadnavirus	Family: Hepadnaviridae
— Genus: Orthohepadnavirus	Family: Hepadnaviridae
Species: Capuchin monkey hepatitis B virus	Genus: Orthohepadnavirus
Species: Chinese shrew hepatitis B virus	Genus: Orthohepadnavirus
Species: Domestic cat hepatitis B virus	Genus: Orthohepadnavirus
Species: Ground squirrel hepatitis virus	Genus: Orthohepadnavirus
Species: Hepatitis B virus	Genus: Orthohepadnavirus
Species: Long-fingered bat hepatitis B virus	Genus: Orthohepadnavirus
Species: Pomona bat hepatitis B virus	Genus: Orthohepadnavirus
Species: Roundleaf bat hepatitis B virus	Genus: Orthohepadnavirus
Species: Tai Forest hepatitis B virus	Genus: Orthohepadnavirus
Species: Tent-making bat hepatitis B virus	Genus: Orthohepadnavirus
Species: Woodchuck hepatitis virus	Genus: Orthohepadnavirus
Species: Woolly monkey hepatitis B virus	Genus: Orthohepadnavirus
+ Genus: Parahepadnavirus	Family: Hepadnaviridae

Şekil 1.1. *Hepadnaviridae* taksonomik düzeni (<https://ictv.global/taxonomy> Erişim Tarihi: 20/12/2022).

1.3. Etiyoloji

Hepadnaviridae ailesi, *Orthohepadnavirus* genusu üyesi olan DCH, bu grubun yapısal ve genomik özelliklerini taşımaktadır (Aghazadeh ve ark., 2018; Magnus ve ark., 2020). DCH genomu yaklaşık 3200 baz çifti büyüklüğünde olup, sirküler yapı

sergilemektedir (Aghazadeh ve ark., 2018; Lanave ve ark., 2019). Viral genom, surface, polymerase, core ve X olmak üzere dört ORF'den (open reading frame/açık okuma alanı) oluşur (Aghazadeh ve ark., 2018; Magnusius ve ark., 2020). Bu gen bölgeleri, Şekil 1.2.'de gösterilmiştir (Aghazadeh ve ark., 2018; Shofa ve ark., 2022).



Şekil 1.2. DCH genom yapısı (Magnusius ve ark., 2020).

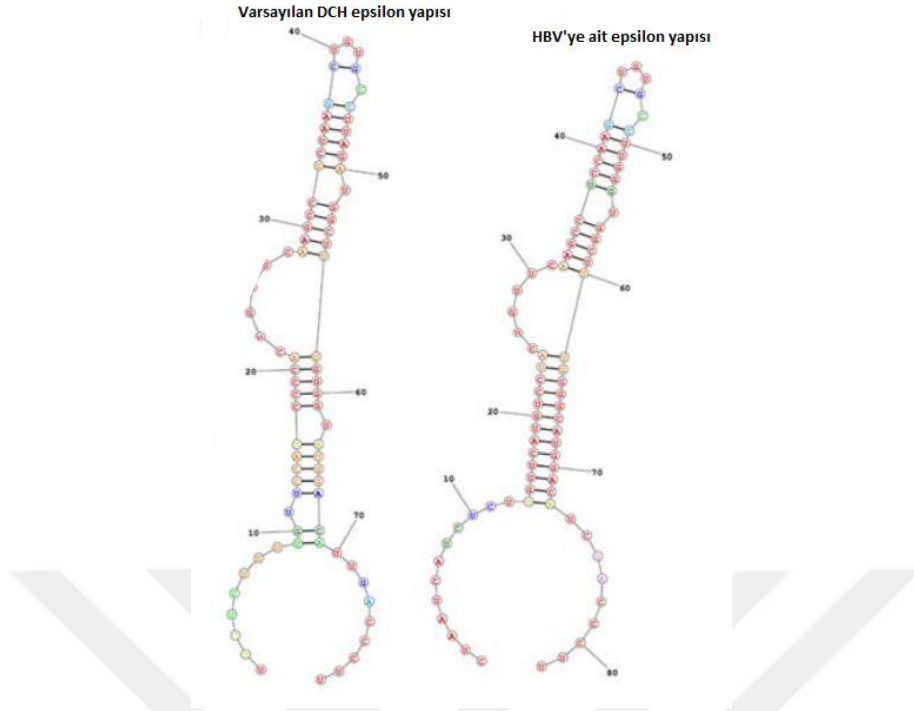
Hepadnaviruslar elektron mikroskopik olarak 42-50 nm arasında değişen boyutta, ikozahedral simetrik nükleokapsite sahip, zarflı etkenlerdir (Drexler ve ark., 2011). Diğer zarflı virüslere kıyasla, kimyasallara ve çevre şartlarına daha dayanıklı oldukları bilinmektedir (Hollinger ve ark., 2001). *Felidae* ailesi üyelerini enfekte eden Hepadnavirusların, çevre şartlarına direnci ve/veya duyarlılığı hakkında literatür veri henüz bildirilmemiştir.

Hepatit B virüsleri, reverse transkripsiyon sırasında proof-reading mekanizması sergilememesi ve yüksek miktarda replikasyona sahip olması sebebiyle *quasispecies* olarak adlandırılan bir çeşit mutant havuzu oluştururlar (Cao ve ark., 2014; Mathet ve ark., 2003). DCH suşları bugüne dek iki genotipe ayrılmış olup, genotipler arasında %8'den fazla farklılık oranı tespit edilmiştir (Piewbang ve ark., 2020). Avustralya, Asya ve Avrupa suşları *Genotip A* olarak isimlendirilmiş olup

kendi içinde 2 kümeye ayrılmıştır (Capozza ve ark., 2023; Piewbang ve ark., 2020). Japonya’da tespit edilen tek suş *Genotip B* olarak adlandırılmıştır (Capozza ve ark., 2023). DCH’ye ait sınırlı sayıda tespit edilmiş suş varlığı ve bu suşlar arasındaki az sayıda varyasyon, genomik yapılarının birbirine yakın olduğunu göstermektedir (Capozza ve ark., 2023; Piewbang ve ark., 2020). DCH enfeksiyonu ile ilgili farklı ülkelerden giderek artan sayıdaki virus çeşitliliği, olası *quasispecies* olgusunun araştırılması için bir imkan sunmaktadır.

Sıklıkla replikasyonunu genom integrasyonuna dayandıran Retroviruslarda görülen endojen karakter, Hepadnaviruslarda da tespit edilmiştir. Bu durum, virusların evrimsel süreçlerinin ortaya çıkarılmasına, fosil kayıtların oluşturulmasına ve evrimsel ayak izi bırakılmasına imkân sağlamaktadır (Gilbert ve Feschotte, 2010). Hepadnavirusların replikasyon siklusu sırasında üretilen double stranded linear DNA (dsIDNA) formunun, endojenizasyon aşamasında konakçı genomuna entegre olma özelliğine sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır (Liu ve ark., 2012; Wang ve ark., 2017). DCH’nin endojen karaktere sahip olup olmadığı, mevcut bilgiler ışığında aydınlatılmamıştır.

DCH, relaxed-circular DNA (rcDNA) olarak adlandırılan genomik yapıya sahiptir ve pozitif iplikçiğin aksine negatif iplikçiğin tamamlandığı dikkat çeker (Aghazadeh ve ark., 2018). Sekans analizleri, DCH’nin pregenomik RNA yapısında bulunan insan hepatit B virusundakine benzer epsilon yapısına ve iki adet doğrudan tekrar bölgesine sahip olduğunu göstermiştir. Bu durum, Hepadnaviruslarda gözlenen replikasyon yönteminin DCH enfeksiyonu için de kabul edilebileceğini düşündürmektedir. DCH ve HBV etkenlerinin tahmini RNA yapısı Şekil 1.3.’de verilmiştir (Capozza ve ark., 2023).



Şekil 1.3. DCH'ye ait epsilon ve HBV'ye ait epsilon yapısı (Capozza ve ark., 2023).

DCH genomunda bulunan gen bölgeleri 4 adet olup, aminoasit büyüklüklerini de içeren bilgiler Çizelge 1.1'de sunulmuştur (Aghazadeh ve ark., 2018; Seeger ve ark., 2013).

Çizelge 1.1. Hepadnaviruslara ait gen bölgeleri ve sentezlenen proteinler.

Gen bölgesi	Sentezlenen Protein	Gen Bölgesinin Görevi	Aminoasit Büyüklüğü
Yüzey gen bölgesi	Yüzey proteini	Zarf proteinlerini sentezi	381
Polimerase gen bölgesi	Polimeraz proteini	-Viral polimeraz -Reverse transkripsiyon	837
Core gen bölgesi	Core proteini	- HBeAg'nin üretimi -HBcAg'nin üretimi	218
X gen bölgesi	X proteini	HBxAg'nin üretimi	145

1.4.1. Yüzey (Surface-S) Gen Bölgesi

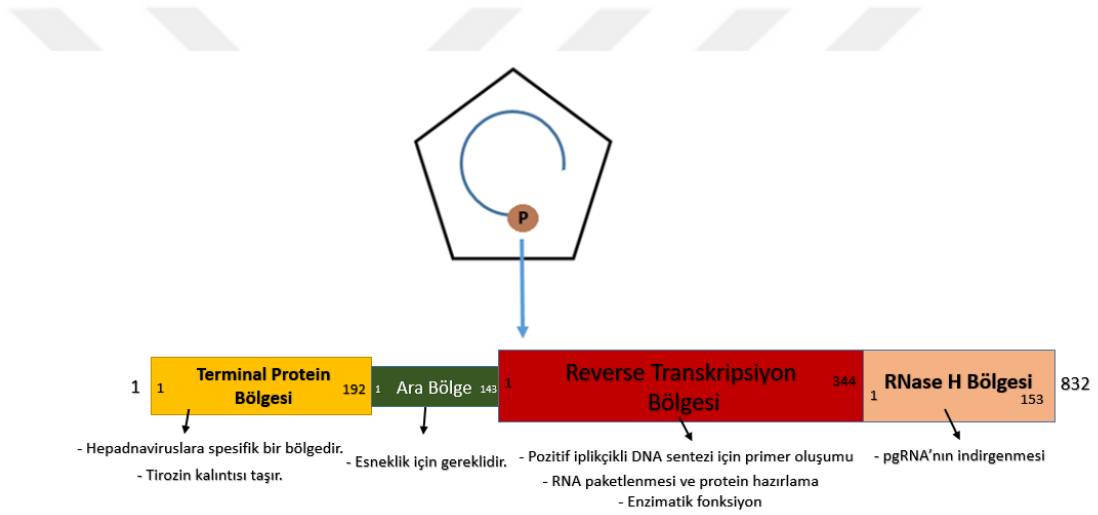
DCH genomunun bu gen bölgesinde (S) üç farklı başlangıç kodonu (AUG) bulunur (Aghazadeh ve ark., 2018; Anpuanandam ve ark., 2021). Virionun bir komponenti olan viral zarf, PreS1, PreS2 ve S alanlarında kodlanan yüzey proteinlerinden ve lipidden oluşmakla birlikte, bu gen bölgesinin sentezlenmesi sonucu farklı büyüklüklerde ve glikozillenmiş yapıya sahip küçük (SHB), orta (MHB) ve büyük (LHB) olarak adlandırılan 3 yüzey proteininin sentezi gerçekleşir (Ganem ve Schneider, 2001; Luangsay ve Zoulim, 2014). DCH'a ait pre-S1 peptidinin 47 aminoasitten oluştuğu, HBV genomunun preS1 sekansına yakın olduğu ve evcil kedilerdeki Hepadnavirus enfeksiyonlarında hücreye girişte görev aldığı belirlenmiştir (Shofa ve ark., 2023).

SHB, en küçük yapıda ve en yüksek miktarda üretilen proteindir (Berting ve ark., 1995). Viral ve subviral partiküllerin ana bileşeni olarak tanımlanmakla birlikte, L proteinlerine destek vererek, viral partikülün hücreye girişine ve hücreden çıkışına yardım eder (Xu ve ark., 1997). MHB'lerin ise rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, enfektivite için gerekli olmadıkları ve orthohepadnaviruslar arasında korunduğu tespit edilmiştir (Glebe ve Urban, 2007). Large Hepatit B yüzey proteini, hepatositlere girişte görevlidir ve dolayısıyla viral yaşam siklusunda önemli bir yere sahiptir (Gripon ve ark., 1995). DCH enfeksiyonunun yakın tarihli tespiti nedeniyle (Aghazadeh ve ark., 2018), bahsedilen proteinlerin henüz DCH replikasyonunda ek görevleri olduğuna dair bir çalışmaya rastlanmamıştır.

1.4.2. Polimeraz Gen Bölgesi

Polimeraz proteini, replikasyon boyunca farklı görevler üstlenen 90 kd boyutunda bir polipeptittir (Aghazadeh ve ark., 2018; Seeger ve ark., 2013). Katalitik bölgesinin ana kısmını YMDD sekans motifi oluşturur (Luangsay ve Zoulim, 2014). Polimeraz gen bölgesi, DCH genomunun yaklaşık %70'ini kapsar, 2,5 kb uzunluğundadır ve pek çok ayrıcalıklı özellikleri bulunan viral polimerazı kodlar

(Aghazadeh ve ark., 2018; Lanave ve ark., 2019). DCH genomunda bu gen bölgesi diğer tüm gen bölgeleriyle örtüşmektedir (Lanave ve ark., 2019). Polimeraz gen bölgesinden sentezlenen polimeraz enziminin, DNA polimeraz ve RNase H aktiviteleri dışında bilinen başka enzimatik fonksiyonu bulunmamaktadır (Hu ve Seeger, 2015). Beşeri hekimlikte, nükleos(t)id analoglarının hedef bölgesi olması açısından da önemli bir proteindir (Luangsay ve Zoulım, 2014). Prototip virusla olan etiyolojik benzerlikler düşünüldüğünde, kedilerde enfeksiyonun tedavisi için geliştirilecek antivirallerin, olası hedef bölgesi olması açısından önem taşımaktadır (Shofa ve ark., 2023). Hepadnavirusların polimeraz geni dört ana kısımdan oluşur. Bu geni kodlayan bölgeler, Şekil 1.3.'de şema haline getirilmiştir.



Şekil 1.4. Hepadnaviruslara ait polimeraz enzimi (Buhlig ve ark., 2020'den uyarlanmıştır).

1.4.2.1. Terminal Protein Bölgesi

Terminal proteini (TP), içeren gen bölgesidir. TP, RT bölgesine bağlı amino uçta bulunan ve ϵ (epsilon)-RNA bağlanması yanı sıra RNA paketlenmesinde işlevsel olan kısımdır (Stuyver ve ark., 2001).

1.4.2.2. Ara Bölge

TP ve RT bölgeleri arasında köprü görevi gören ve sekans farklılıklarıyla en çok karşılaşılan bölgedir (Clark ve Hu, 2015). Polimeraz enziminin işleyişi açısından kritik olmamakla birlikte, yüzey gen bölgesi ile örtüşen alanlara sahip olması sebebiyle HBsAg'de değişiklikler açısından önemli bir bölgedir (Meier ve ark., 2013). Terminal protein ile birlikte, hepatit B viruslarında polimeraz enzimine özgü oldukları bilinmektedir (Nassal, 1999).

1.4.2.3. Reverse transkriptaz (RT)

RT, polimeraz aktivitesine sahip katalitik merkezdir. Enzimatik fonksiyonlarına ek olarak RT; epsilon-RT bağlanması, proteinlerin hazırlanması ve RNA paketlenmesinde de rol oynamaktadır (Hu ve Seeger, 2019). Benzerliğe sahip olmaları sebebiyle, HBV'ye ait RT alanı, şablon olarak HIV'e ait RT kullanılarak yapısal olarak modellenmiştir (Bartholomeusz ve ark., 2004).

1.4.2.4. RNase H bölgesi

RNase H bölgesi, karboksi terminalinde bulunan ve işi biten şablon RNA'nın ortadan kaldırılması için gerekli olan bölgedir (Clark ve Hu, 2015). H bölgesinin, core proteinlerinin toplanması sırasında bu proteinlerle olan etkileşim için gerekli olmasının yanı sıra (Hu ve Seeger, 2019), RNA paketlenmesi ve hazırlamasında görev aldığı bilinmektedir (Jones ve ark., 2014).

1.4.3. Core gen bölgesi

DCH genomunda bulunan core geni, 657 nükleotitten oluşur ve 219 adet aminoasit bu gen bölgesi tarafından kodlanır (Aghazadeh ve ark., 2018; Lanave ve

ark., 2019). Hong-Kong'ta tespit edilen bir suşta bu gen bölgesinde delesyonlar tespit edilmiş olup, 1 proteinin eksik kodlandığı rapor edilmiştir (Capozza ve ark., 2023). Hepadnaviruslarda core gen bölgesi, core proteini ve e antijeninin (HBeAg) kodlandığı gen bölgesi olarak bilinmektedir (Bock ve ark., 2001). Core proteininin, 21,5 kDa ağırlığında olduğu, kapsitle ilişkilendirilen rollerinin yanı sıra, cccDNA fonksiyonlarını ve transkripsiyonunu düzenlenmesi aynı zamanda konakçı proteinleriyle etkileşimlerde bulunarak virus-konakçı ilişkisine etki edebildiği bilinmektedir (Bock ve ark., 2001).

1.4.4. X gen bölgesi

Konakçı hücrelerde ve viral ajanlarda tanımlanmış hiçbir proteinle benzerlik göstermemesi ve aynı zamanda keşfedildiği dönemde işlevinin henüz anlaşılamamış olması sebebiyle X olarak adlandırılmış olan bir bölgedir (Miller ve Robinson, 1986). Özellikle memeli Hepadnavirusları arasında yüksek oranda korunmakla birlikte, varlığı DCH genomunda da tespit edilmiştir (Aghazadeh ve ark., 2018).

DCH genom yapısında, X gen bölgesi 154 aminoasit uzunluğuna ve 17 kd ağırlığındaki X proteinini kodlar (Takahashi ve ark., 2022). Hepadnaviruslarda X proteini, proliferasyon, kalsiyum regülasyonu, hücresel sinyal ağı veya DNA onarımının inhibisyonu ile ilgili viral ve hücresel promotörlerin aktivitesini etkileyebilir (Neuveut ve ark., 2010). X proteininin *in vivo* ve *in vitro* şartlarda, kısa yarılanma ömrüne sahip olduğu ve oldukça düşük seviyedeki ekspresyonu sebebiyle gösterilmesinin oldukça zor olduğu belirtilmiştir (Kekulê, 1994).

Ayrıca, sekans analizlerinin yapıldığı bir DCH suşunda, Japonya'da tespit edilen bir enfeksiyonda X gen bölgesinde genetik farklılıklar bulunduğu rapor edilmiştir (Takahashi ve ark., 2022). X genlerindeki mutasyonlardan köken alan varyantlara ilerlemiş karaciğer hastalıklarına sahip bireylerde sık rastlanmakla birlikte (Putri ve ark., 2019), kedilerde bu gen bölgesinin patogeneze olan etkisi henüz belirlenememiştir.

1.4.5. Hepadnavirus Replikasyon Siklusu

Tez çalışmasının bu bölümünde, Hepadnavirusların duyarlı hücreye penetrasyonundan başlamakla birlikte, saçılım aşamasına kadar araştırılan güncel bilgiler derlenerek yorumlanmıştır.

1.4.5.1. Viral bağlanma ve internalizasyon

DCH enfeksiyonlarında, NTCP molekülü kedi hücrelerine girişte spesifik reseptör olarak tanımlanmış olup, insan hücrelerinde bulunan NTCP moleküllerini de bağlayabildiği gösterilmiştir (Shofa ve ark., 2023). Hepatit B enfeksiyonlarında viral bağlanmada ana reseptörler kadar görev üstlenen epidermal büyüme faktörü reseptörü, skuamöz hücreli karsinom antijen 1 (SCCA1) ve ferritin hafif zinciri (FTL), bağlanma gücünü etkileyen ko-reseptörler olarak tanımlanmıştır (Hao ve ark., 2012). E-cadherin ise, konakçı hücrede bulunan ve glikozillenmiş NTCP'ye bağlanarak, bu reseptörün bazolateral plazma zarına yeniden yerleşmesini sağlayan bir protein olarak bilinmektedir (Hu ve ark., 2020). DCH enfeksiyonunda da ko-reseptörler yardımıyla bağlanma mümkün görünmektedir ancak tanımlanan spesifik bir ko-reseptör bulunmamaktadır.

Hepatit B enfeksiyonlarında efektif bağlanmayı takiben virusun hücre içine alınması, endositozun indüklenmesine aracılık eden caveolin aracılı endositoz veya klatrin aracılı kimyasal yolaklar vasıtasıyla gerçekleşir (Iwamoto ve ark., 2019; Macovei ve ark., 2010). Bu basamağı takiben, sitoplazmada bulunan çıplak kapsitler mikrotübül aracılı nakil mekanizması vasıtasıyla çekirdeğe ulaşır (Hu ve Seeger, 2015; Nassal, 1999).

1.4.5.2. cccDNA oluşumu

Hepadnavirusların yaşam döngüsü incelendiğinde, virusun devamlılığını sağlayarak persiste enfeksiyon tablosunun oluşmasında anahtar aşamalardan biri rcDNA'dan, cccDNA'nın oluşumudur (Bock ve ark., 1994). CccDNA, antivirallere dirençli viral bir minikromozom olarak adlandırılan kompakt kromatin benzeri yapıya sahiptir (Bock ve ark., 2001; Levrero ve ark., 2009). Bu stabil yapı, pre-genomik RNA'lar ve mRNA'ların sentezlenmesinde şablon görevi görür (Rall ve ark., 1983; Salpini ve ark., 2019). CccDNA oluşumu, RT fonksiyonu ve hücresel DNA onarım enzimlerinin aktivitesi ile gerçekleşir (Gao ve Hu, 2007; Koniger ve ark., 2014).

1.4.5.3. dsDNA oluşumu

Viral döngünün tamamlanmasında zorunlu aşamalardan biri olmamakla birlikte, konakçı genomuna homolog olmayan rekombinasyon yoluyla entegre olabilen dsDNA'nın oluşumu Hepadnaviruslarda karşımıza çıkmaktadır (Paterlini-Brechot ve ark., 2003). Genellikle az sayıda virion dsDNA içerir ancak bu oranın beşeri hekimlikte hastalığın farklı fazlarında olan bireylerde değişebileceği rapor edilmiştir (Zhao ve ark., 2015). DsDNA'nın kapsit, polimeraz enzimi ve pgRNA'nın ekspresyonunun olmamasından dolayı replikasyon yeteneği bulunmamaktadır (Schüt ve ark., 1996). HBsAg yönünden negatif hastaların ilerleyen aşamalarda, HBsAg kaynağı olarak dsDNA'nın kullanılabildiği gösterilmiştir (Wooddell ve ark., 2017). DCH enfeksiyonunda dsDNA'nın entegre olabileceği gen bölgesi ve DCH'nin patogeneizindeki rolü ile ilgili bir bilgiye ulaşılamamıştır.

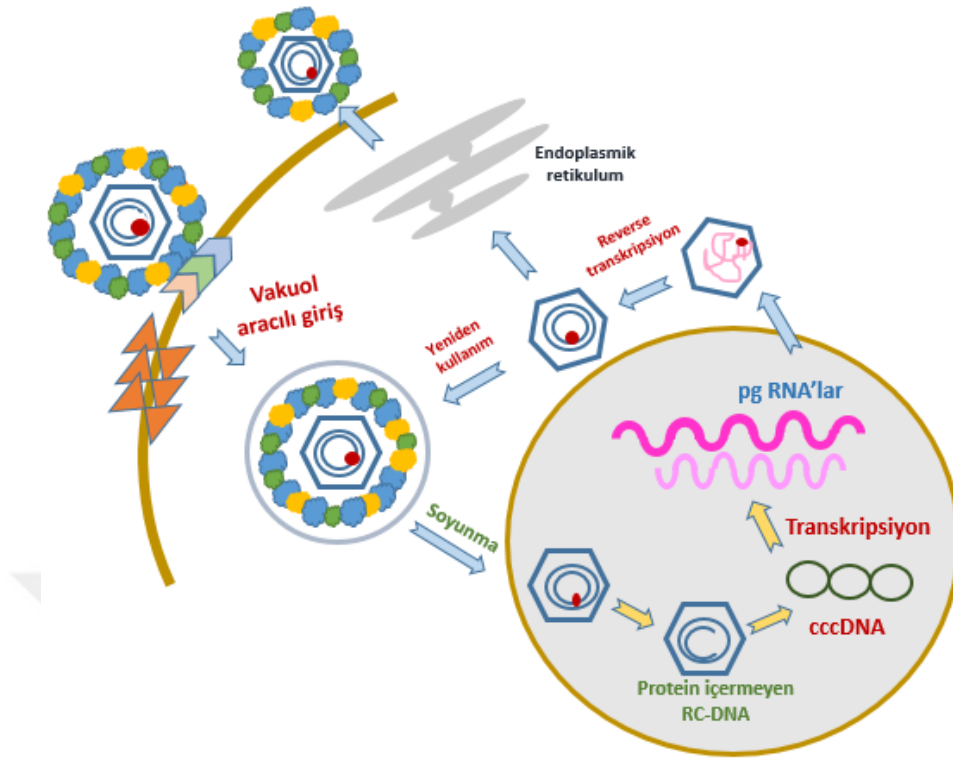
1.4.5.4. Pre-genomik RNA'ların transkripsiyonu

Hepadnavirusların replikasyon siklusunda konakçı hücre çekirdeğinde, cccDNA'dan sentezlenen pre-genomik RNA'ların (pgRNA), RNA polimeraz II

tarafından transkripsiyonu gerçekleştirir (Tu ve ark., 2017). Polimeraz enzimi, hem viral DNA sentezini hem de nükleokapsid toplanmasını başlatabilmek için pgRNA'nın 5' kısmı içindeki tokayı andıran ve kapsülleme sinyali görevine sahip epsilon (ϵ) bağlanır (Tavis ve Ganem, 1996). Epsilon sekansı, DCH genomunda da aydınlatılmıştır (Capozze ve ark., 2023). Kapsidlenmiş pgRNA, negatif iplikçikli viral DNA'yı oluşturmak üzere reverse transkribe edilir. Bu aşamada, polimerazın RT bölgesinde bulunan YMDD motifi nükleotit hazırlığı için oldukça önemlidir (Shin ve ark., 2011). Ardından bu iplikçik, pozitif iplikçikli DNA sentezi için şablon görevi görür. Nükleokapsid, rcDNA oluştuğunda olgunlaşır ve bu aşamadan sonra virion, enfektif virus partikülü olarak zarflanıp hücreden salgılanabilir ya da cccDNA havuzuna katkı sağlamak üzere çekirdeğe yönlendirilebilir (Tu ve ark., 2017; Tuttleman ve ark., 1986).

1.4.5.5. Olgun partiküllerin ve subviral partiküllerin hücre dışına salınımı

Zarf proteinleri nükleokapsitin hücre dışına salınabilmesi için yeterli miktara ulaştığında, olgunlaşmış partiküller zarf proteinlerinin N-terminal ucu ile etkileşime girer. Bu etkileşim sonucunda, core partikülleri endoplasmik retikulum aracılığı ile tomurcuklanır (Bruss, 2007). Hepadnavirusların replikasyon siklusu Şekil 1.5.'te özetlenmiştir.



Şekil 1.5. Hepadnavirusların replikasyon siklusu (Urban ve ark., 2010'dan modifiye edilmiştir).

Enfektif virionların yanı sıra, yüzey nükleokapsitten bağımsız olarak birleşmesi sonucunda, subviral partiküller sentezlenir (Luangsay ve Zoulim, 2014). Viral kapsitten ve genomdan yoksun olan subviral partiküller, enfektif virionlara kıyasla kanda 1,000 ila 100,000 kat daha fazla bulunabilirler ve dolaşımdaki bağışıklık komplekslerinin bileşenleridir (Hu ve Liu, 2017; Madalinski ve ark., 1991). Dolaşım sisteminde sferikal veya filamantöz yapıdaki SVP'lere rastlanmakla birlikte, sferikal yapıya serumda daha sık rastlanır (Lok ve McMahon., 2009).

SVP'lerin en çok dikkat çektikleri alan, immün sistemle olan bağlantılarıdır. Öncü yapılar olarak, virüsü bağışıklık elemanlarından korumaya yönelik görev yaparlar. "Viral apoptotik benzeri taklit" mekanizmasıyla bağışıklık toleransını indükleyebilir ve Dane partikülünün humoral immün yanıtı korumasını sağlarlar (Vanlandschoot ve ark., 2003). Bu mekanizma yoluyla, enfeksiyon için asıl gerekli olan tüm virusun immün sistem elemanlarıyla karşılaşmasını engellemek ve virionların enfeksiyona duyarlı hücrelere ulaşmasını kolaylaştırırlar (Chai ve ark.,

2008). Subviral partiküllerin varlığı, DCH enfeksiyonuna yakalanan kedilerde de gösterilmiştir (Fruci ve ark., 2022).

1.4.6. Hepadnavirusların otofajiye etkisi

Programlı hücre ölümü olarak da tanımlanan otofaji, hasarlı hücrelerin ve istenmeyen proteinlerin yanı sıra mikrobiyal ajanların uzaklaştırılmasında kullanılan homeostasisin korunmasında görevli bir mekanizmadır (Deter ve De Duve, 1967; Shin ve ark., 2016). Hepadnavirusların otofajiyi desteklediği, replikasyonu ve patogenezi için lehine kullanabileceği gösterilmiştir (Sir ve ark., 2010). *In-vitro* çalışmalar, otofaji sürecinde X ve küçük yüzey proteinlerinin önemli bir rol oynadığını, hücrede otofajinin baskılanması sonucunda özellikle DNA replikasyonunun olumsuz etkilendiğini göstermiştir (Li ve ark., 2011; Tang ve ark., 2009).

Sonuç olarak, hücresel dengeyi sağlamada görevli otofaji, kronik headpanavirus enfeksiyonlarında karaciğer hücrelerinin durumunu kötüleştirir ve bu enfeksiyonun en dikkat çekici sonuçlarından biri olan HBV ile ilişkili HCC'nin patogeneze ve gelişmesine katkıda bulunur (Lee ve ark., 2001).

1.5. Epizootiyoloji

DCH enfeksiyonunun bulaşı hakkında henüz kesin bir yargı bulunmamakta olup, ilk tespitin tam kan örneklerinde yapılması (Aghazadeh ve ark., 2018), bulaşın kan yolu ile olabileceği ihtimalini ortaya koymuştur. Takip eden çalışmalarda, DCH nükleik asitinin hem serum hem de tam kan örneklerindeki keşfi, vücut sıvıları vasıtasıyla gerçekleşen bulaş ihtimalini güçlendirmiştir (Lanave ve ark., 2019). Kediler arası bulaş yolları olarak, cinsel temas ve ısırık yolu ile de DCH enfekte bireylerden saçılma olabileceğini varsayan hipotezleri öne süren çalışmalar bulunmaktadır (Lanave ve ark., 2019). Enfeksiyonun vertikal/perinatal yollarla

bulaşma olasılığını destekleyen raporlar olup, maternal bağışıklığın azalması nedeniyle 3 ay yaştaki kedilerde DCH pozitifliklerinin viral enfeksiyonun varlığı yönünde araştırılması gerektiğine dikkat çekilmektedir (Capozza ve ark., 2023). DCH enfeksiyonunda viremik hayvanlardan kan transfüzyonu ve organ transplantasyonu konularında dikkatli olunması, donör olacak hayvanların DCH yönünden taranması gerekliliğine dikkat çekilmektedir (Lanave ve ark., 2019).

1.6. Epidemiyoloji

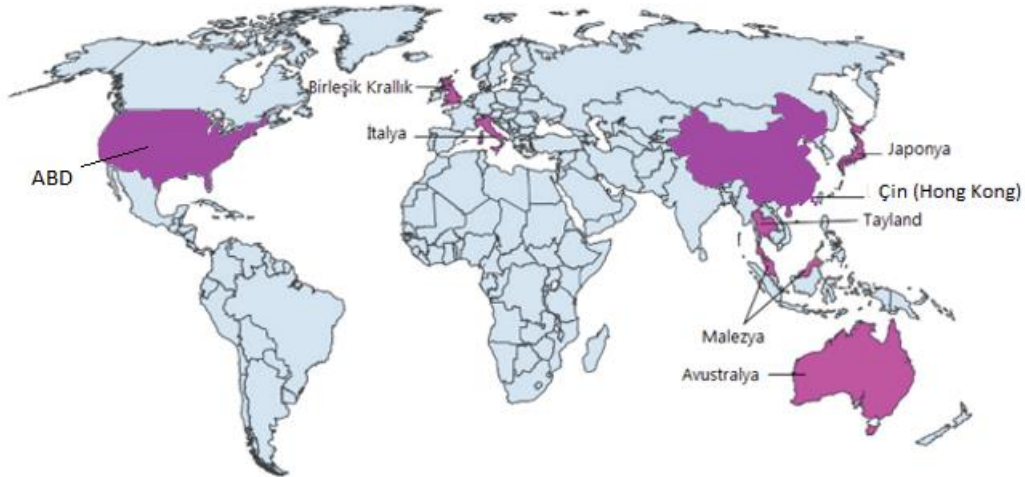
Enfeksiyonun epidemiyolojik araştırmasını temel alan çalışmalarda, 2 yaş üzerindeki kedilerin DCH enfeksiyonuna yakalanma riskinin 2 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Anpuanandam ve ark., 2021). Jeanes ve ark. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada ise, 2 yaşından küçük ve 8-13 yaş arası olan kedilerde yüksek pozitiflik bildirilmiştir. Ayrıca, bazı çalışmalarda DCH enfeksiyonunun yaygın olarak 1 yaşından küçük hayvanlarda görüldüğü rapor edilmiştir (Fruci ve ark., 2021; Lanave ve ark., 2019). Erkek kedilerde, dişi kedilere kıyasla daha yüksek prevalanslar tespit edilmekle birlikte (Anpuanandam ve ark., 2021; Lanave ve ark., 2019; Scavone ve ark., 2022), yaş ve cinsiyetin DCH enfeksiyonu üzerindeki etkisini araştıran çalışmaların istatistiksel değerlendirmeleri, bu kriterlerin enfeksiyonun ortaya çıkışında risk faktörü olmadıkları görüşüne odaklanmaktadır (Anpuanandam ve ark., 2021; Capozza ve ark., 2023; Jeanes ve ark., 2021; Lanave ve ark., 2019; Scavone ve ark., 2022).

Özellikle DCH ile Retroviral ajanların birlikte olduğu enfeksiyonlar, çalışma konularında sıklıkla yer almaktadır. Hatta DCH'nin ilk tespitinin FIV ile enfekte kedilerde yapılmış olması önem arz etmektedir. Söz konusu bu çalışmada FIV ile enfekte kedilerin %10'unda DCH enfeksiyonuna rastlanmıştır (Aghazadeh ve ark., 2018). DCH enfeksiyonunun araştırıldığı diğer çalışmalarda da (Jeanes ve ark., 2021; Lanave ve ark., 2019; Piewbang ve ark., 2020) benzer bir durum görülmekte olup, DCH pozitif kedilerde Feline Retroviral enfeksiyonların varlığı da önemli derecede

yüksek bulunmuştur. Feline Coronavirus enfeksiyonu da yaygın bir ko-enfeksiyon bileşeni olarak tanımlanmıştır (Jeanes ve ark., 2021).

Kedilerin yaşam ve barınma şartlarının, ev ortamında yaşamaları veya dış ortamla ilişkilerinin olup olmadığının araştırıldığı bir çalışmada, DCH pozitif olduğu tespit edilen kedilerin çoğunluğunun evde bakılan kediler olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, kedilerin yaşam şeklinin DCH enfeksiyonu için bir risk faktörü olup olmadığının tanımlanabilmesi için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç bulunduğu rapor edilmiştir (Anpuanandam ve ark., 2021).

DCH enfeksiyonu son yıllarda küresel ölçekte önem kazanmış olup, pek çok ülkeden yeni bildirimler yapılmaktadır. Bugüne dek, Avustralya, İtalya, Malezya, Japonya, Çin (Hong Kong), Birleşik Krallık ve ABD’de tespit edilmiştir (Aghazadeh ve ark., 2018; Anpuanandam ve ark., 2021; Capozza ve ark., 2023; Jeanes ve ark., 2021; Lanave ve ark., 2019; Piewbang ve ark., 2020; Stone ve ark., 2022; Takahashi ve ark., 2022). Hong Kong’ta tespit edilen suşlar, Asya suşlarının devamı olarak nitelendirilmiştir (Shofa ve ark., 2022). DCH’nin küresel yayılımını gösteren harita Şekil 1.6’te sunulmuştur.



Şekil 1.6. DCH enfeksiyonunun küresel yayılımı (Capozza ve ark., 2023; Shofa ve ark., 2022; Stone ve ark., 2022).

1.7. Klinik

Kedilerde Hepadnavirus enfeksiyonlarıyla ilişkilendirilen patognomik bir semptom henüz bulunmamakla birlikte, DCH nükleik asiti yönünden pozitif bulunan hayvanlarda gözlenen bazı klinik bulgular rapor edilmiştir (Capozza ve ark., 2023; Lanave ve ark., 2019). DCH enfeksiyonunun ilk tespit edildiği kedide, karın bölgesinde tespit edilen kitlenin yanı sıra, kusma ve iştah kaybı semptomları kaydedilmiştir (Aghazadeh ve ark., 2018).

Üveitis tablosu, DCH pozitifliği tespit edilen 2 kedide rapor edilmiş semptomlardan biridir (Jeanes ve ark., 2021). Karaciğer ilişkili hastalıkların teşhis edildiği kedilerde, DCH pozitifliklerine rastlanmıştır (Piewbang ve ark., 2020). Aynı zamanda, herhangi bir semptom göstermeyen kedilerde de DCH enfeksiyonu tespit edilmiştir (Lanave ve ark., 2019; Takahashi ve ark., 2022).

1.8. Patogenez

DCH'nin kedilerde patogenez mekanizması netlik kazanmamakla birlikte (Capozza ve ark., 2023), kedilerin hepatotropik enfeksiyonları arasında yerini aldığı bilinmektedir (Pesavento ve ark., 2019). HBV ilişkili vakalarla kıyaslandığında, inflamasyon ve neoplazinin histopatolojik özellikleri iki hastalığın patogenezindeki benzerliği ortaya çıkarmaktadır (Pesavento ve ark., 2019). Hepadnaviruslar, replikasyonu sırasında sitopatolojik bozukluk meydana getirmemektedir (Chisari, 2000). Hepatit ve bunun sonucunda ortaya çıkan herhangi bir karaciğer hasarına, konakta virusa karşı oluşan immünolojik tepki aracılık eder ki, bu durum hastalığın immün yanıt aracılı viral enfeksiyonlar arasında sınıflandırılmasına neden olmuştur (Valaydon ve Locarnini, 2017).

DCH enfeksiyonunda, formalinle fikse edilmiş parafin gömülü dokunun immünohistopatolojik incelemesi sırasında çok merkezli, büyük hücreli, yüksek dereceli B hücreli lenfomaya rastlanmıştır (Aghazadeh ve ark., 2018). Biyopsi

örneklerinin kullanıldığı bir çalışmada, kronik hepatitli kedilerin %43'ünde ve hepatosellüler karsinomlu kedilerin ise %28'inde DCH enfeksiyonuna rastlanmıştır. Histopatolojide parçalı nekroz, apoptik cisimler ve sinüzoidal inflamasyon dahil olmak üzere hepatit ile tutarlı ancak patognomonik olmayan mikroskopik görüntüler, sadece DCH pozitif örneklerde tanımlanmış, DCH pozitif kedilerin karaciğerlerinde, hepatosit proliferasyonu, DCH negatif olan kedilere göre daha yoğun bulunmuştur (Pesavento ve ark., 2019). İmmunohistokimyasal boyama metotlarıyla, DCH pozitif olduğu tespit edilen kedilerde hepatitis, hepatik fibrozis, glomerulonefritis, lenfoplasmatik enteritis ve lenfadenitis gibi sistemik inflamasyona yönelik bulgular tespit edilmiş olup, karaciğer hasarlı kedilerde pozitiflik oranı %20 olarak belirlenmiştir (Piewbang ve ark., 2020).

Karaciğer enzim değerlerinde hiçbir farklılık göstermeyen kedilerde de DCH enfeksiyonu tespit edilmiştir (Lanave ve ark., 2019). Ancak, hematokimyasal profilde karaciğer hastalıklarından şüphelenilen kedilerin DCH enfeksiyonu yönünden pozitif olma ihtimali, kan değerleri fizyolojik sınırlar içinde olan kedilere kıyasla 3 kat daha fazla bulunmuştur (Anpuanandam ve ark., 2021). Serolojik değerlendirmelerde karaciğer hastalığı yönünden kuvvetli şüpheli olan kedilerin hiçbirinde DCH tespitinin yapılmadığı çalışmalar da bulunmakla birlikte, DCH DNA'sının enfeksiyonun bazı evrelerinde sadece karaciğer dokusunda saptanabilmesi de söz konusu olduğu göz önüne alınmalıdır (Scavone ve ark., 2022).

DCH'nin sistemik enfeksiyona sebep olduğu yakın tarihli bir çalışmada belirlenmiş olup, DCH enfeksiyonunun ekstra-hepatik dokularda varlığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, histopatolojik incelemelerde böbrekte glomeruler kapillerde kalınlaşmalara, akciğerlerde alveolar intersitisyumların genişlemesine, kalpte miyokardiyal düzensizliklere, hipertrofilere ve epikardiumda kalınlaşmalara, bağırsak ve lenf nodüllerinde ise histiyosit lenfadenit tablosuna rastlanmıştır. Serebellumda nöronlarda ve glia hücrelerinin boyandığı tespit edilmiş ve etkenin kan-beyin bariyerini geçme olasılığı desteklenmiştir (Piewbang ve ark., 2020).

1.9. İmmunite

Bakülovirus kullanılarak DCH'ye ait core proteinine karşı oluşan IgM ve IgG antikorlarının tespitleri yapılmış olup, DCH'ye ait core proteinlerinden sentezlenen subviral partiküllerin elektron mikroskopik incelemelerle varlığı gösterilmiş ve bu partiküllerin yaklaşık 27 nm çapında olduğu tespit edilmiştir (Fruci ve ark., 2022). DCH enfeksiyonunun evresinin belirlenmesinde, core proteinine karşı oluşan antikorların tespitinin tek başına yeterli olmadığı, aynı zamanda yüzey antijenine karşı oluşan antikorların da değerlendirilmesi gerektiği bildirilmektedir (Fruci ve ark., 2022; Wang ve ark., 2017).

1.10. Tanı

DCH'nin ilk tanısı, dondurulmuş lenfoma dokusundan ekstrakte edilen DNA'nın, etkenin core gen bölgesinin amplifikasyonuna yönelik hazırlanan pangenerik primerler ile PCR testine tabi tutulmasıyla gerçekleşmiş olup, bu primer çifti ile 230 bp uzunluğundaki bölge çoğaltılmıştır (Aghazadeh ve ark., 2018). Dünyanın farklı bölgelerinden rapor edilen çalışmalar, kan ve serum örneklerinin PCR testlerinin yapıldığı moleküler çalışmalarda tanı materyallerinin önemli bir kısmını oluşturduğunu göstermektedir (Anpuanandam ve ark., 2021; Lanave ve ark., 2019). DCH genomunun tespitine yönelik, enfeksiyonun bulaş yollarını aydınlatmayı hedefleyen retrospektif çalışmalarda, enfekte kedilerin uzun süreli örneklenmesi sırasında oral, konjuktival, prepusyal ve rektal sürüntülerinde nükleik asitin tespitinin yapılmadığını rapor edilmiştir. Sonuçlar, enfeksiyonun tespitinde kullanılabilecek örneklerin öncelik sırası açısından değerlendirildiğinde önemli bulunmuştur (Capozza ve ark., 2021).

Ayrıca, PCR yöntemi ile birlikte in situ hibridizasyon metodunun kullanıldığı, kedilerin formalinle fikse edilmiş ve parafin emdirilmiş karaciğer örneklerinde DCH dağılımını ve hepatotropizmi belirleyen çalışmalar ile tanıya gitmek mümkündür (Pesavento ve ark., 2019). Son yıllarda, böcek hücrelerinde Bakulovirus tarafından

eksprese edilen DCH core proteini kullanılarak antikor tespitine yönelik ELISA testi geliştirilmiştir (Fruci ve ark., 2022).

DNA ekstraksiyonu yapmadan, tam kan örneklerinde DCH genomunu tespit etmeye yönelik prob tabanlı dupleks real-time PCR metodu kullanılan teknikler arasındadır (Shofa ve ark., 2023). Western-blot analizleriyle yapılan çalışmalarda, DCH ile enfekte kedilere ait karaciğer örneklerinde viral proteinlerin varlığı gösterilmiş olup aynı çalışmada, geçirimli elektron mikroskop yardımıyla yapılan analizlerde DCH partiküllerinin intrasellüler lokalizasyonu da gösterilmiştir (Piewbang ve ark., 2020).

Serolojik sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde, ALT seviyesinde yükselmeler bu enfeksiyonla ilişkili bulunmakla birlikte enfeksiyonun tanısında değerlendirilebileceği rapor edilmiştir (Anpuanandam ve ark., 2021; Piewbang ve ark., 2022).

1.11. Kontrol

Kedilerin yaşam şekilleri göre düşünüldüğünde, ortak kum ve mama kaplarının kullanımının yanı sıra, hasarlı deri ile vücut sıvılarının teması olası enfeksiyon yollarıdır. Bu bağlamda, fazla sayıda kedinin bir arada bulunmaması, yaralayıcı temasının engellenmesi ve kedi malzemelerinin temiz kullanımına dikkat edilmesi enfeksiyondan korunmada etkili yollar olarak değerlendirilmiştir (Lanave ve ark., 2019).

DCH'nin kan ve serumdaki tespitleri, donör olacak kedilerin bu enfeksiyon yönünden taranması gerektiğini ortaya çıkarmıştır (Lanave ve ark., 2019). DCH enfeksiyonlarıyla mücadelede henüz bir preparat üretilmemiş olup, beşeri hekimlikte hepatit B enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan nükleotit/nükleosid analoglarının kediler için kabul edilemeyecek seviyede toksik olduğu bildirilmiştir (Capozza ve ark., 2023; Hartmann ve ark., 2015). Ancak, genom yapısındaki benzerlikler ve

hücreye girişte kullandığı ortak reseptörler, enfeksiyondan korunma konusunda atılacak adımlar adına bir bakış açısı oluşturmaktadır (Capozza ve ark., 2023; Piewbang ve ark., 2020; Shofa ve ark., 2023).

Bu doktora tez çalışmasında, moleküler tanı ve karakterizasyonun yapılabilmesi için başlıca Hepadnavirusların tespitinde kullanılan polymerase gen bölgesine yönelik pan-generik primerler ve Evcil Kedi Hepadnaviruslarının tanısına yönelik core gen bölgesinin amplifikasyonunu hedefleyen pan-generik primerler kullanılmış olup, full genoma ulaşabilmek için diğer gen bölgelerini de kapsayan farklı primer çiftleri bu tez çalışması kapsamında dizayn edilmiştir. Sekans analiz işlemlerini takiben, genetik farklılıkların ve benzerliklerin ortaya çıkarılması amacıyla örneklerimiz dünyadaki hem cinsleri ile GenBank veri tabanından alınan diziler kullanılarak karşılaştırılmış olup, tüm ve parsiyel genom analizleri yapılarak, filogenetik ağaçlar hazırlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Çalışmalarda Kullanılan Örnekler

Bu doktora tez çalışması kapsamında, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Merkez Tanı Laboratuvarı'ndan, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan ve özel kliniklerden, Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Kararı (05/09/2018 tarih, 2018/17 toplantı numarası, 2018/87 dosya numarası, 2018/17/106 karar numarası ve 22/07/2020 tarih, 2020/13 toplantı numarası, 2020/90 dosya numarası, 2020/13/111 karar numarası) ve Aydınlatılmış Onam Formu ile toplamda 550 kediden; 498 adet kan (498 adet EDTA'lı kan örneği ve 104 adet serum örneği), 50 adet organ ve 2 adet asites sıvısı alındı.

Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA) içeren tüplere alınan tam kan örnekleri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'na soğuk zincir altında ulaştırıldı. Kan ve asites örnekleri ekstraksiyon işlemine dek +4 °C'de, organ örnekleri ise -20 °C'de muhafaza edildi. Ekstraksiyon işlemi sonrası arta kalan örnekler, -20 °C'de donduruldu. Örneklemeye dâhil edilen kedilere ait bilgiler (yaş, ırk, cinsiyet, klinik bulgular, yaşam statüsü) kaydedildi.

2.1.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeleri

Bu doktora tez çalışması boyunca kullanılmak amacıyla temin edilen kimyasal ve sarf malzemeler aşağıda belirtilmiştir.

- ✓ 5 ml EDTA'lı kan tüpü
- ✓ 5 ml serum tüpü
- ✓ Organ materyali alma kutusu
- ✓ Saklama kutusu
- ✓ 500 ml. PBS Solution
- ✓ 10 µl tip
- ✓ 100 µl tip
- ✓ 1000 µl tip
- ✓ Nitril eldiven (small)
- ✓ Bisturi ucu (no:23)
- ✓ N lauril sarcosin
- ✓ Guanidin isotiyosiyanat
- ✓ Water Molecular biology grade
- ✓ Steril tüp (15 ml)
- ✓ MgCl₂
- ✓ 100 bp DNA Ladder
- ✓ Dream Taq DNA polymerase
- ✓ Primer 100 nmol
- ✓ dNTP mix
- ✓ 6X Loading Dye
- ✓ 0,2 ml flat kapak PCR tüp
- ✓ 1,5 ml flat kapak PCR tüp
- ✓ TAE Buffer
- ✓ Tris Base

2.1.3. Cihazlar

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen tüm araştırmalar, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı envanterinde bulunan cihazlar kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan cihazlar aşağıda belirtilmiştir.

- ✓ +4 °C Buzdolabı
- ✓ -20 °C Derin dondurucu
- ✓ -80 °C Derin dondurucu
- ✓ Vera Scientific Vortex
- ✓ Sigma Mikro Santrifüj 1-14k (Michael Christ design)
- ✓ Metis Lab Biyogüvenlik II Kabini
- ✓ Biometra 96-well Gradient Thermal Cyclers (Analytik Jena, Almanya)
- ✓ Kyrattec 96-well Gradient Thermal Cyclers (Kyrattec Inc., Avustralya)
- ✓ Mikrodalga Fırın
- ✓ Cleaver® Scientific Elektroforez Seti
- ✓ Kodak 1D Gel Logic Kamera
- ✓ UV Tranilluminator

2.2. Yöntemler

2.2.1. Kan ve Serum Örneklerinin Hazırlanması

Soğuk zincir altında laboratuvara getirilen EDTA'lı kan örnekleri testlerde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı. Serum örnekleri ise, serumun ayrılması amacıyla 3000 rpm'de +4°C'de 10 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra, eppendorf tüplere alındı ve testlerde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

2.2.2. Organ ve Asites Örneklerinin Hazırlanması

Karaciğer başta olmak üzere soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılan organ örnekleri, öncelikle -20 °C’de dondurma çözme işlemini takiben biyogüvenlik kabini (Metis Safe, Türkiye) işlenerek steril petri kaplarına, 0,5 gr olacak şekilde alındı. Bistüri ve makas yardımıyla küçültüldükten sonra steril tüplere aktarıldı, üzerlerine 4,5 ml fosfat buffered saline (PBS, 1/10 oranında) ilave edilip, vortekslendi. Takiben tüpler; 3000 rpm’de 4°C’de 10 dakika santrifüj edildi ve ekstraksiyon işlemi için kullanılmak amacıyla süpernatant kısmından 300 mikrolitre (µl) alındı. Arta kalan örnekler; şahit numune olarak -80 °C derin dondurucuya kaldırıldı. Soğuk zincir altında laboratuvara getirilen asites sıvıları testlerde direkt olarak kullanılmış olup, -20°C’de saklandı.

2.2.3. Viral Nükleik Asit İzolasyonu

Viral nükleik asit (DNA) ekstraksiyonu, Sambrook ve Russell (2001), tarafından bildirilen metot kullanılarak gerçekleştirildi. Ekstraksiyonda takip edilen uygulama protokolü aşağıda belirtilmiştir:

300 µl örnek üzerine eşit hacimde olacak şekilde Denatürasyon Solüsyonu ilave edildi.

15 saniye vortekslemeyi takiben, 300 µl Alkali Fenol ve 300 µl Kloroform/İzomilalkol (24:1) ekstraksiyon metodunda anlatıldığı gibi eklendi, 15 saniye vortekslenen karışım 12.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj basamağını takiben, üstte kalan sıvıdan 700 µl alınarak temiz eppendorf tüpe aktarıldı ve 700 µl izopropil alkol ilave edildi.

Total hacmin 1:10’u oranında Na-Acetate ilave edildi, 10 saniye vorteksledikten sonra karışım, -80 °C’de en az 1 saat süreyle nükleik asitin

presipitasyonu için bekletildi. Süre sonunda oda derecesinde çözündürülen tüpler 12.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi, üzerindeki sıvının büyük bölümü vakum pompası ile çekildi. Kalan kısma ise izopropil alkolün yıkanması amacıyla 300 µl %70 Etil alkol ilave edildi.

Tekrar 12.000 rpm’de 2-3 dakika santrifüj edilen tüplerin içindeki Etil alkol aspire edilerek uzaklaştırıldı.

37 °C’de tüm alkol kalıntısı uzaklaşana dek bekletilen tüplere 20 µl moleküler grade distile su ilave edildi, spektrofotometrede DNA miktarı ölçülen ekstraktlar (Ek-3, Çizelge 4.2.), testlerde kullanılmak üzere -80°C’de muhafaza edildi.

2.2.4. Polymerase Chain Reaction (PCR) Yardımıyla Tanı ve Moleküler Karakterizasyon

DCHV’un moleküler tanısı amacıyla kedi Hepadnavirus core gen bölgesini hedef alan pan-generik primer çifti (Aghazadeh ve ark., 2018) ve polimeraz gen bölgesine spesifik primer çifti (Wang ve ark., 2017) kullanıldı. İlgili primer dizinleri Çizelge 2.1.’de sunulmuştur. PCR analizlerinde kullanılan karışım miktarları Çizelge 2.2.’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. DCH tanısında kullanılan primer dizinleri.

Hedef Gen Bölgesi	Primer Adı	Baz Dizini	Ürün Boyutu (bp)	Referans
Core Gen Bölgesi	Hgap F	CTAGAATGGCTACATGGGGTTAG	230	Aghazadeh ve ark., 2018
	Hgap R	GTGCTCTGATAACCGTATGCTC		

Polimeraz Gen Bölgesi	Pol 1-F	TAGACTSGTGGTGGACTTCTC	593	Wang ve ark., 2017
	Pol 1-R	CATATAASTRAAAGCCAYACAG		
	Pol 2-F	TGCCATCTTCTTGTTGGTTC	258	
	Pol 2-R	AGTRAAYTGAGCCAGGAGAAAC		

Çizelge 2.2. PCR analizlerinde kullanılan karışımın komponent miktarları.

Komponent	Miktar
10X DreamTaq Buffer 20 mM	3,0 µl
dNTP mix 10 mM	0,5 µl
MgCl ₂ 25 mM	2,4 µl
Forward primer	0,5 µl
Reverse primer	0,5 µl
Taq DNA Polymerase	0,25
Moleküler Deiyonize Su	19,85 µl
DNA	3 µl
TOPLAM	30 µl

2.2.5. Tüm Genom Dizilemesi

DCH nükleik asiti yönünden pozitif olduğu tespit edilen örneklerin tüm genomunu aydınlatmak amacıyla hem literatürdeki primerler hem de hem de bu tez çalışması kapsamında GenBank veri tabanında bulunan MK117078.1 numaralı suş referans alınarak sentezlenen primer çiftleri kullanılmış olup, dizinler Çizelge 2.3.'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Tüm genomun amplifikasyonu için kullanılan primerlere ait bilgiler.

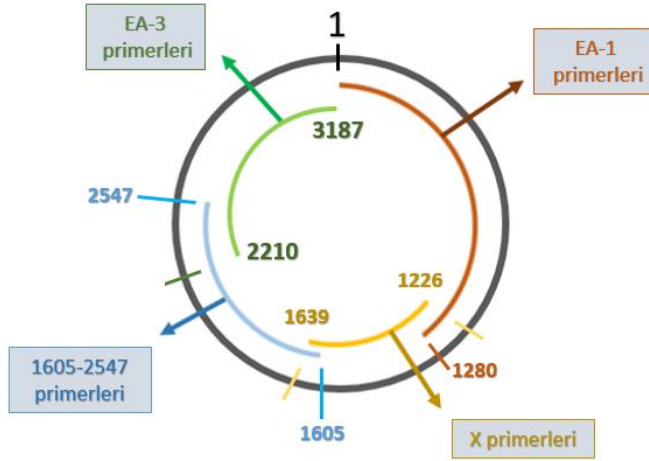
Primer Adı	Baz Dizini	Başlangıç – Bitiş Bölgeleri	Ürün Boyutu (bp)	Referens
EA-F1	ATGGGCAACATYACCTCAGGT	1 → 21	1260	Bu tez çalışması kapsamında dizayn edilmiştir.
EA-R1	GTAGACGAAGGACACGTCC	1280 → 1262		
EA-F3	AGCACGTAGACCTGCTAGGTC	2210 → 2230	920	
EA-R3	TCGTCAACGGCGGAGACGA	3164 → 3146		
1605-F	CCAGGTTATGTACATATCTTGTA	1605 → 1627	900	
2547-R	AAGAGGAAAATATTTGGTGTG	2547 → 2527		
X-F	ATGGCTGCTCGCCTGCGCTGC	1226 → 1246	400	
X-R	TCAGCGGGTGTGCAAGGTTTTATGT	1663 → 1639		
				Anpuanandam ve ark., 2021
A-F	TGGGCAACATTACCTCAGGTCC	2 → 223	1700	
A-R	GGAACAAAAGAGAACGCACAGG	1700 → 1679		
B-F	GGTCTGACGCCCAGGTTATG	1595 → 1614	1700	
B-R	ACCACGAGTCTGCACTCTGC	106 → 87		
C-F	CTCAGGTCTTTGCCCCACTCA	792 → 811	1155	
C-R	AGCTGACTCCTCCCAACAGT	1946 → 1927		
D-F	AACTAAGCATGAACTCCGCC	2469 → 2488	1173	
D-R	TGGGCCAACAGGTGCAATTT	454 → 435		

Tez çalışmasının moleküler karakterizasyon aşamasında kullanılan PCR protokolleri ve primerlerin bağlanma dereceleri Çizelge 2.4.'de sunulmuştur.

Çizelge 2.4. PCR döngü protokolü.

PCR testlerinde kullanılan protokol		Primer Adı	Bağlanma Derecesi
Başlangıç denatürasyonu	96 °C → 6 dk	Hgap	55 °C
Döngü (35 siklus)	94 °C → 1 dk	Pol 1. tur	45 °C
	Bağlanma derecesi → 2 dk	Pol 2. tur	45 °C
	72 → 1 dk	EA-1	54 °C
		EA-3	56 °C
Son Uzama	72 °C → 10 dk	1605-2547	50 °C
		X	66 °C

Tüm genomun aydınlatılmasında MK117078.1 accessin numaralı, GenBank alınan sekans referans alınarak dizayn edilen primerlerin, DCH genomunda amplifiye ettikleri gen bölgeleri Şekil 2.1.'de sunulmuştur.



Şekil 2.1. Tez çalışması kapsamında dizayn edilen primerlerin hedef gen bölgeleri.

2.2.6. PCR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

Amplikonların görüntülenmesi aşamasında, GelRed® (Biotium, ABD) içeren %1,5'lik agaroz jel (Prona, EU) hazırlandı. Tampon sıvı olarak 10xTAE (Tris Asetat Ethylenediamine tetraacetic acid-EDTA) kullanıldı. 0,5xTAE solüsyonu içinde mikrodalga fırın kullanılarak ısı aracılığı ile çözülen agaroz, soğutulurken üzerine 0,5 µl/100ml oranında GelRed® konulan karışım homojen yapıya ulaşana kadar karıştırıldı ve taraklar yerleştirilmiş olan jel küvetine döküldü. Çeker ocak altında, jel donana kadar beklendi, taraklar çıkarılarak elektroforez tankına yerleştirildi.

PCR ürünleri yükleme boyası (6x Loading Dye, Jena, Almanya) ile karıştırılarak jele yüklendi. Jelin başındaki ve sonundaki kuyucuklara 100 bp'lik marker (Jena Bioscience, Almanya) ve 1 kb'lik marker (GeneOn) solüsyonundan 1 µl yüklendi. Jele yapılan yüklemeler sonrası, 20 dakika, 16 Volt/cm elektrik akımına tabi tutulan jel, görüntüleme sistemi (Kodak, Gel Logic 100) kullanılarak UV ışık altında görüntülendi.

2.2.7. Amplikonların Purifikasyonu ve Dizin Analizi

Tespit edilen amplikonların purifikasyonu ve bu amplikona ait ürünlerin dizin analiz işlemleri, tez projesi kapsamında sağlanan hizmet alımı yoluyla gerçekleşti. Örnekler, ticari bir firma olan BM Labosis/Ankara'ya gönderildi.

2.2.8. Moleküler Karakterizasyon ve Filogenetik Analizler

Moleküler karakterizasyona başlamadan önce, yanlış negatiflik ihtimalini ekarte edebilmek amacıyla, analiz işlemini takiben elde edilen dizinlerin doğrulanması gerekir. Bu amaçla, Finch TV'ye yüklenen dizinler National Center for Biotechnology Information (NCBI)'ın veritabanında yer alan Basic Local Alignment

Search Tool (BLAST) programına (Camacho ve ark., 2009) yüklendi ve dizinlerin konfirmasyonu yapıldı.

DCH enfeksiyonu yönünden pozitif olduğu tespit edilen örneklerin dünyadaki hemcinsleri ile karşılaştırılması için öncelikle referens örnekler GenBank veri tabanından toplandı. BioEdit programı vasıtası ile tüm örnekler hizalandı. Filogenetik analiz, Mega XI programından Maximum Likelihood metodu kullanılarak yapıldı.

2.2.9. Nükleotit Benzerliklerinin Belirlenmesi

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen tüm genom ve parsiyel genomlara ait nükleotid dizinleri, GenBank veri tabanından alınan DCH suşları ile MatGAT (2.01) (Campanella ve ark., 2003) programı kullanılarak karşılaştırılmıştır.

2.2.10. Frekans (Sıklık) Analizi

Bu tez kapsamında, DCH nükleik asiti yönünden pozitif örnek sayısının az olması sebebiyle istatistiksel değerlendirme olarak frekans (sıklık) analizi yapılmıştır.

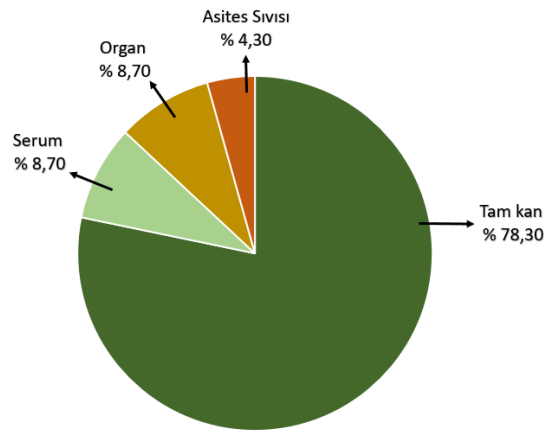
3. BULGULAR

3.1. DCH Enfeksiyonu Nükleik Asiti Tarama Bulguları

Doktora tezi kapsamında 550 adet evcil kedi örneklenmiş olup, kan (n=498), serum (n=104), asites sıvısı (n=2) ve organ örneklerinin (n=50), 23'ü DCH nükleik asiti yönünden pozitif tespit edilmiştir. Tez çalışmasına dâhil edilen, tür bazlı toplam örnek sayısı ve DCH pozitifliği saptanan örnek sayıları Çizelge 3.1.'de sunulmuştur. Ayrıca, farklı örnek türlerindeki DCH pozitifliklerinin yüzdesel dağılımı Şekil 3.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Toplanan örnek sayısı ve DCH pozitifliği saptanan örneklerin sayısı.

Örnek Türü	Örnek sayısı	DCH nükleik asit pozitifliği
Tam Kan	498	18
Serum	104	2
Organ	50	2
Asites	2	1



Numune Türü	Pozitiflik Sayısı	Yüzde Oran
Tam kan	18	%78,30
Serum	2	%8,70
Organ	2	%8,70
Asites Sıvısı	1	%4,30

Şekil 3.1. Tespit edilen pozitifliklerin (n=23) örnek türüne göre dağılımı.

DCH nükleik asiti yönünden pozitiflik dağılımı incelendiğinde, tam kan numuneleri %78,30 (n=18, 18/23), serum (2/23) ve organ örnekleri (2/23) %8,70 ve asites sıvısının (1/23) da %4,30 oranda sıralandığı belirlenmiştir.

3.2. Elde Edilen Epidemiyolojik Veriler ve İstatistiksel Analizler

Bu doktora tez çalışması kapsamında DCH nükleik asiti yönünden pozitiflik saptanan kedilere ait anamnez bilgileri (yaş, ırk, cinsiyet, yaşam şekli, klinik bulgular vs.) Çizelge 3.2.'de sunulmuştur. Pozitif örneklerin çoğunluğunu 2 yaş altı kediler (%69,6) oluşturmaktadır. İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde, anlamlı bir farklılık görülmemekle birlikte, erkek kedilerde (%56,5) dişi kedilere (%43,5) oranla, DCH nükleik asit pozitifliğinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında örneklenen 23 kediden 18'inin tekir ırk kediler olduğu ve bu kedilerde DCH enfeksiyonunun görülme sıklığının %78,3 olduğu belirlenmiştir. Bu oran, çalışma kapsamında örneklenen diğer ırklar olan sarman (%13) ve Van kedilerine (%8,7) göre yüksek olup, enfeksiyona yakalanma sıklığı yönünden tekir ırk kedilerde DCH pozitifliğinin daha yüksek olduğu bulunmuştur.

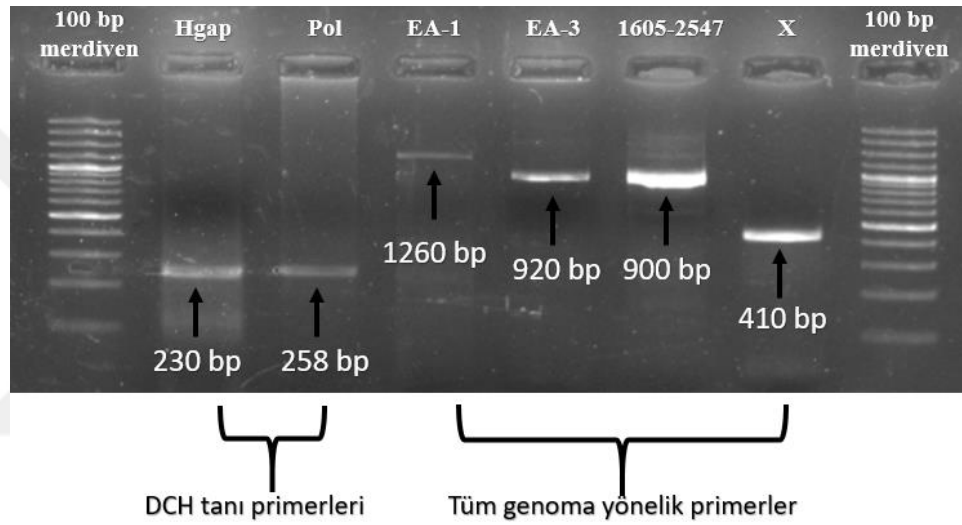
DCH enfeksiyonu saptanan 23 kediden 6'sının (%26,08) asemptomatik olduğu, bu kedilerin veteriner kliniklerine aşılama öncesi kontrol veya cerrahi müdahale amaçlı getirildiği öğrenilmiştir. DCH enfeksiyonu pozitifliği tespit edilen 17 kedide ise, FIP ilişkili semptomlar yanı sıra, inkoordinasyon, halsizlik, iştahsızlık, kusma, bazı oküler bulgular, asites, kardiyomiyopati, akut bronşitis, hepatik lipidoz, stomatitis ve gingivitis gibi semptomlar kaydedilmiş olup, ayrıca DCH pozitifliği saptanan kedilerin 7'sinin (%30,43) öldüğü not edilmiştir. Yaşam statüsü yönünden incelendiğinde, DCH enfeksiyonu pozitif kedilerin %73,9'unun örnekleme döneminde evde bakılan kediler olduğu, ancak büyük bir bölümünün yaşamlarının bir döneminde sokaktan sahiplenildikleri de bildirilmiştir.

Çizelge 3.2. DCH nükleik asiti yönünden pozitif olan kedilere ait anamnez bilgileri.

Örnek No	Örnek Türü	Yaş	Cinsiyet	İrk	Klinik bulgu	Yaşam Şekli	Mevcut Enfeksiyon
TR-SV8	Organ	2 yaşlı	Erkek	Tekir	FIP ilişkili semptomlar Ölüm	Evde bakım	FCoV
TR-SV15	Organ	2 yaşlı	Erkek	Tekir	FIP ilişkili semptomlar Ölüm	Evde bakım	FCoV
TR-03-PEY	Tam kan	4 yaşlı	Erkek	Sarman	Arka bacaklarda inkoordinasyon Halsizlik Hipertrofik kardiyomiyopati Ölüm	Evde bakım	FeLV
TR-07	Tam kan	2 yaşlı	Dişi	Tekir	İnkoordinasyon Göz lezyonları Ölüm	Evde bakım	FeLV
TR-55	Tam kan	3 yaşlı	Erkek	Tekir	Halsizlik İştahsızlık Ölüm	Sokak kedisi	FCoV
TR-61	Tam kan	1 yaşlı	Erkek	Tekir	Klinik bulgu yok	Evde bakım	FeLV
TR-68	Tam kan	2 yaşlı	Erkek	Tekir	Kusma	Sokak kedisi	Negative
TR-131	Serum	4 yaşlı	Erkek	Van	Halsizlik İştahsızlık	Evde bakım	Negative
TR-177	Tam kan	6 aylık	Dişi	Tekir	Cerrahi müdahale	Sokak kedisi	FeLV, FPV
TR-185	Tam kan	6 aylık	Dişi	Sarman	Yabancı cisim yutma	Evde bakım	FeLV
TR-192	Serum	1 yaşlı	Erkek	Tekir	Akut bronşit Göz ekstirpasyonu	Evde bakım	FeLV
TR-275	Tam kan	5 yaşlı	Dişi	Tekir	FIP ilişkili semptomlar Ölüm	Evde bakım	FCoV
TR-288	Tam kan	4 yaşlı	Dişi	Tekir	İştahsızlık	Evde bakım	FeLV
TR-296	Tam kan	6 yaşlı	Erkek	Van	Hepatik lipidoz	Evde bakım	FeLV
TR-382	Tam kan	6 aylık	Dişi	Tekir	Kusma	Evde bakım	Negative
TR-404	Tam kan	8 aylık	Dişi	Tekir	Mikrooftalmi	Evde bakım	Negative
TR-409	Tam kan	1 yaşlı	Dişi	Tekir	Halsizlik	Evde bakım	FeLV
TR-428	Tam kan	2 yaşlı	Dişi	Tekir	Klinik bulgu yok	Evde bakım	Negative
TR-453	Tam kan	1 yaşlı	Erkek	Tekir	Klinik bulgu yok	Sokak kedisi	FeLV
TR-503	Tam kan	1 yaşlı	Erkek	Tekir	Diaphragmatic hernia	Evde bakım	FeLV
TR-744	Tam Kan	2 yaşlı	Dişi	Tekir	Halsizlik	Sokak kedisi	Negative
TR-27-02	Tam kan	4 yaşlı	Erkek	Sarman	İshal Stomatit Gingivitis Mantar enfeksiyonu Dehidrasyon	Sokak kedisi	FeLV
TR-ASC1	Asites sıvısı	1 yaşlı	Erkek	Tekir	Karında asites sıvısı Ölüm	Evde bakım	FeLV, FCoV

3.3. DCH Enfeksiyonu Moleküler Karakterizasyon Bulguları

Enfeksiyonun tespitinde kullanılan DCH nükleik asiti tespitine yönelik pan-generik Hgap primerlerinin kullanılması ile gerçekleştirilen konvensiyonal PCR ile Hepadnavirusların tespitine yönelik pan-generik Pol primerleri ile gerçekleştirilen konvensiyonel PCR testleri eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu tez kapsamında kullanılan tanı ve tüm genomun aydınlatılmasına yönelik primerlerin amplifiye ettikleri ürünleri gösteren agaroz jel görüntüsü Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. DCH tanı primerleri ve tüm genomaya yönelik primerlerin jel görüntüsü.

Tüm örnekler hem core hem de pol genlerine yönelik primerlerle PCR'a tabii tutulmuş olup, 23 pozitif örneğin 21'i core gen spesifik primerlerle reaksiyon verirken, 2 adedi (TR-61 ve TR-177) sadece pol gen spesifik primerlerle pozitiflik vermiştir. Ayrıca, 23 pozitif örneğin 17'si pol gen spesifik primerlerle reaksiyon vermiştir. Hepadnavirus X gen bölgesi spesifik primerlerle 23 adet örnekten 17 adedi pozitif reaksiyon vermiştir. Tez kapsamında dizayn edilen yeni primerler kullanılarak, 13 adet DCH tüm genomu karakterize edilmiştir.

Sekans analizi, hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiş olup, elde edilen dizinler GenBank veri tabanında BLAST programında dünyadaki hem cinsleri ile karşılaştırıldı. Dizinler, BioEdit programında hizalandıktan sonra, tüm genomun kazanımı için ilgili gen bölgelerinin birleştirilmesi yapıldı. Parsiyel olan sekansların

da aynı yol izlenerek BLAST programında düzenlenmesini takiben, elde edilen tüm dizinlerin aminoasit çevrimleri gerçekleştirildi. Veriler, metin dosyasına kaydedilerek GenBank veri tabanından girişleri yapıldı ve accession numaraları alındı. Elde edilen sekanslar, accession/erişim numaraları ve baz uzunlukları Çizelge 3.3.'de sunulmuştur.

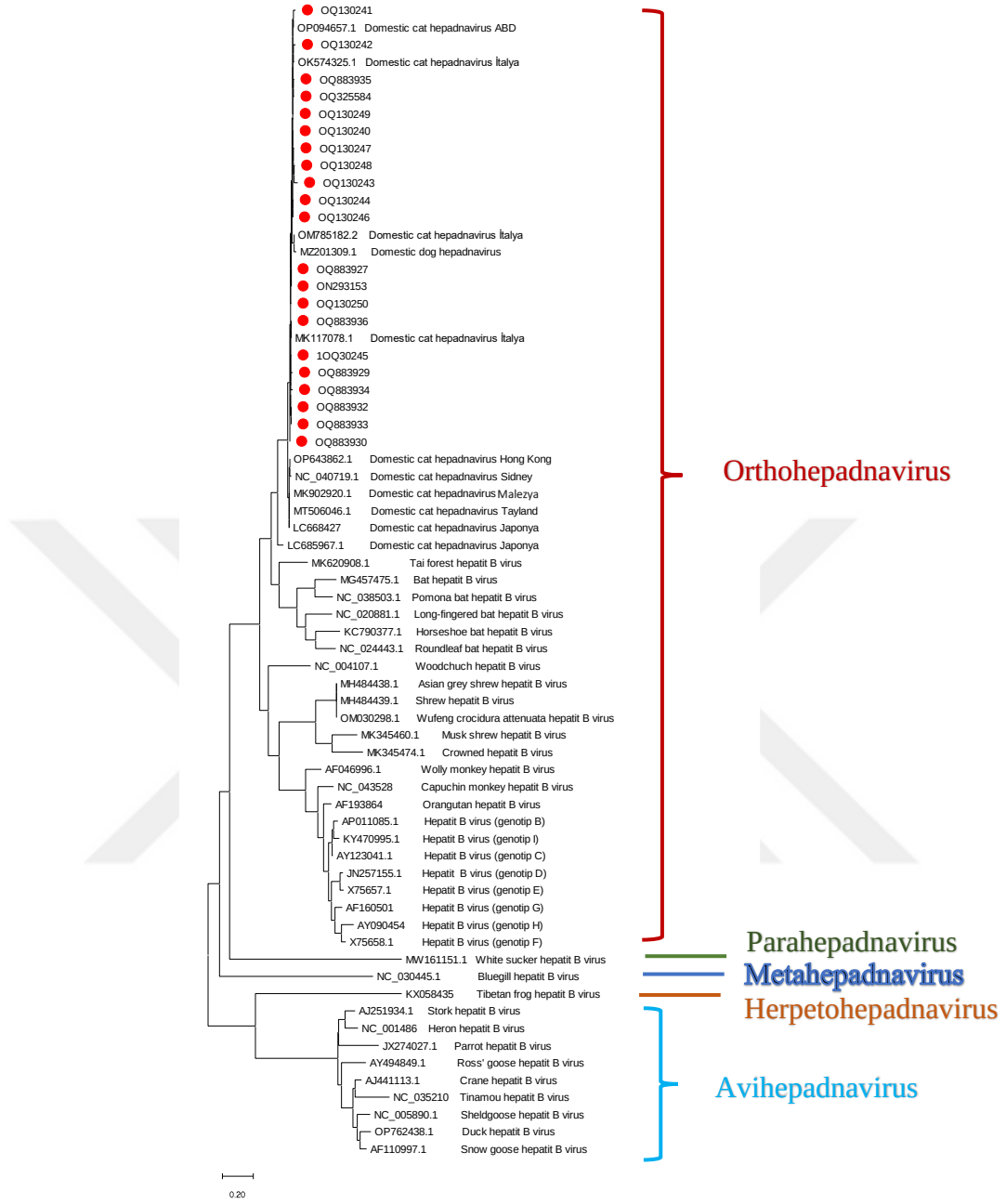
Çizelge 3.3. DCH pozitif sekans dizilerine ait Genbank Accession numaraları ve baz uzunlukları.

Örnek Adı	Accession No	Uzunluk (bp)
TR-03-PEY	OQ130240	3184
TR-SV8	ON325584	3185
TR-07	OQ130241	3184
TR-SV15	ON293153	3193
TR-55	OQ130249	3184
TR-61	OQ883928	232
TR-68	OQ883929	925
TR-131	OQ883930	1936
TR-177	OQ883931	227
TR-185	OQ883932	1104
TR-192	OQ883933	1934
TR-275	OQ130242	3184
TR-288	OQ883934	193
TR-296	OQ130243	3184
TR-382	OQ130244	3184
TR-404	OQ130245	3184
TR-409	OQ130246	3184
TR-428	OQ130247	3184
TR-453	OQ883935	1312
TR-503	OQ130248	3184
TR-744	OQ130250	3184
TR-27-02	OQ883927	1931
TR-ASC1	OQ883936	214

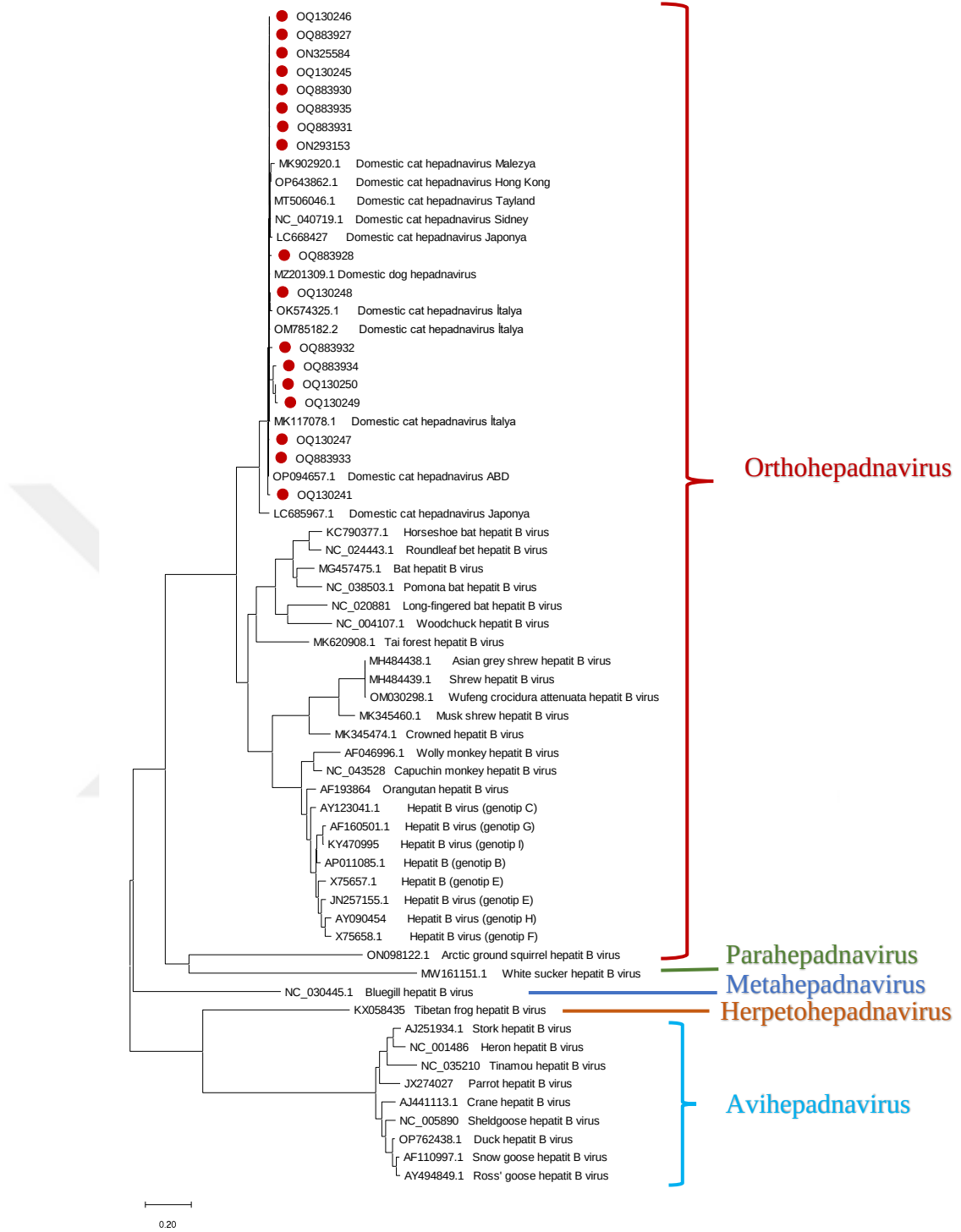
3.4. DCH Pozitif Örneklerle Ait Filogenetik Analiz Bulguları

Elde edilen sekans dizilerinin, GenBank veri tabanında bulunan hemcinsleri ile karşılaştırılması sonrasında, BioEdit software programda hizalanmasını takiben, MEGA XI software programında Maximum Likelihood metodu kullanılarak filogenetik analiz yapıldı. Core, pol, surface ve X gen bölgelerine ait filogenetik analizler sırasıyla Şekil 3.3., Şekil 3.4., Şekil 3.5. ve Şekil 3.6.'de sunuldu. Ayrıca, tüm genom analizi yapılan 13 örnek ve GenBank veri tabanından elde edilen Hepadnavirus tüm genomları kullanılarak yapılan filogenetik analiz Şekil 3.7.'de sunuldu.

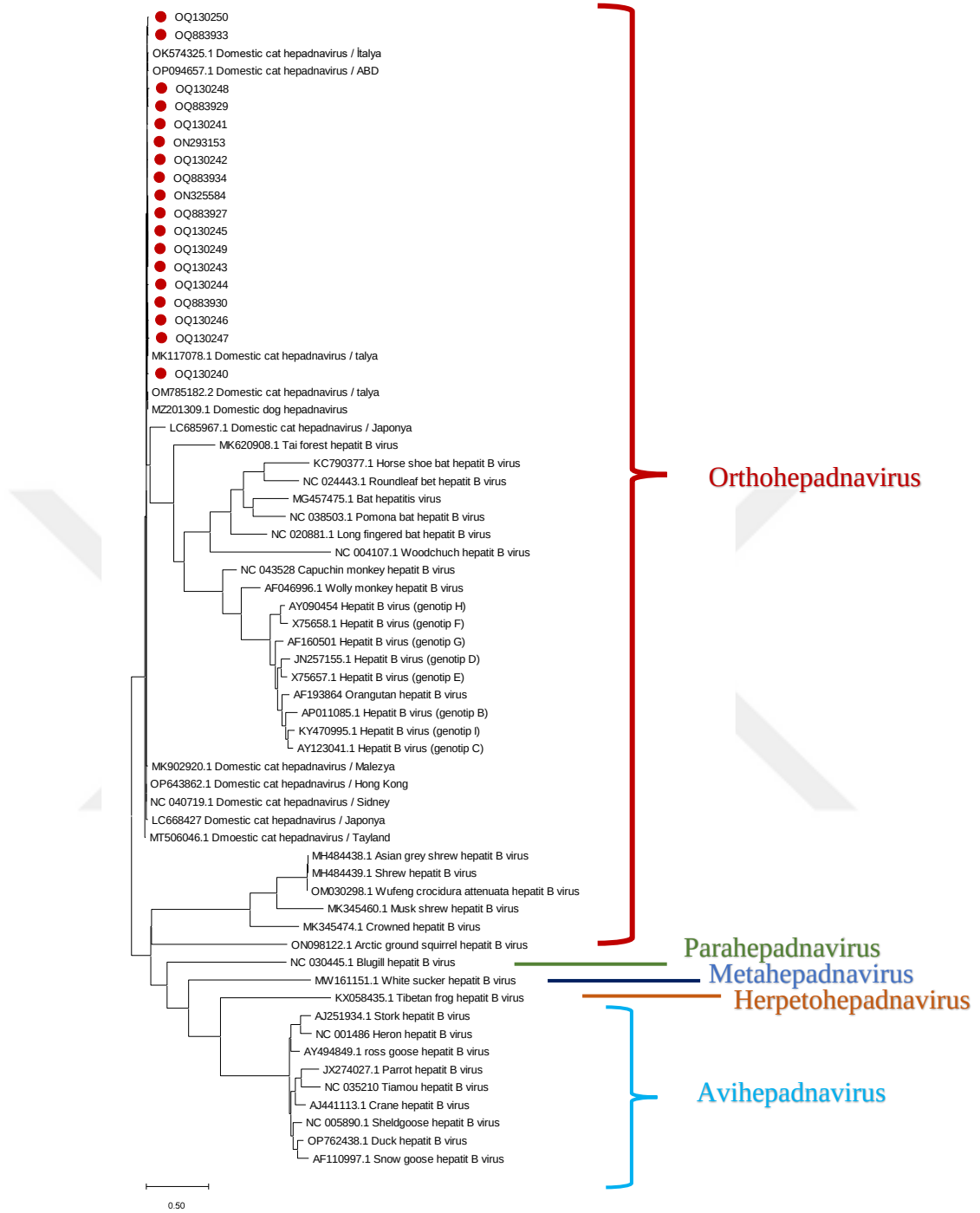
Moleküler değerlendirmede, tez kapsamında elde edilen 23 örneğin tümünün genel olarak, *Orthohepadnavirus* genusunda yer alan örneklerle aynı kümede lokalize oldukları belirlendi. Tüm genomik analize göre özellikle İtalya'dan elde edilen kedi örnekleriyle parafiletik yakınlık gösteren örneklerin (n=12) varlığı yanı sıra, ABD'den elde edilen kedi örnekleriyle de yakınlık gösteren DCH suşlarının (n=1) ülkemizde sirküle oldukları belirlendi. Tez çalışmasındaki sekanslar kullanılarak yapılan karşılaştırmalarda tüm genomik analizde TR-03 nolu örneğin köpek orijinli İtalyan suşuna diğer kedi orijinli suşlardan daha yakın olduğu belirlendi. Pol geni yönünden yapılan karşılaştırmada ise, TR-61 ve TR-503 nolu örneklerin köpek orijinli İtalyan suşuna diğer kedi orijinli suşlardan daha yakın olduğu belirlenirken, core gen bölgesi yönünden yapılan analizlerde TR-409 ve TR-27-02 nolu örneklerin köpek orijinli İtalyan suşuna daha yakın lokalize oldukları belirlendi. TR-SV15 nolu kedi örneğinin ülkemiz orijinli tüm kedi örnekleri başta olmak üzere, dünyadaki hem cinslerinden de hem nükleotid hem de aminoasit ifadesi anlamında farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.



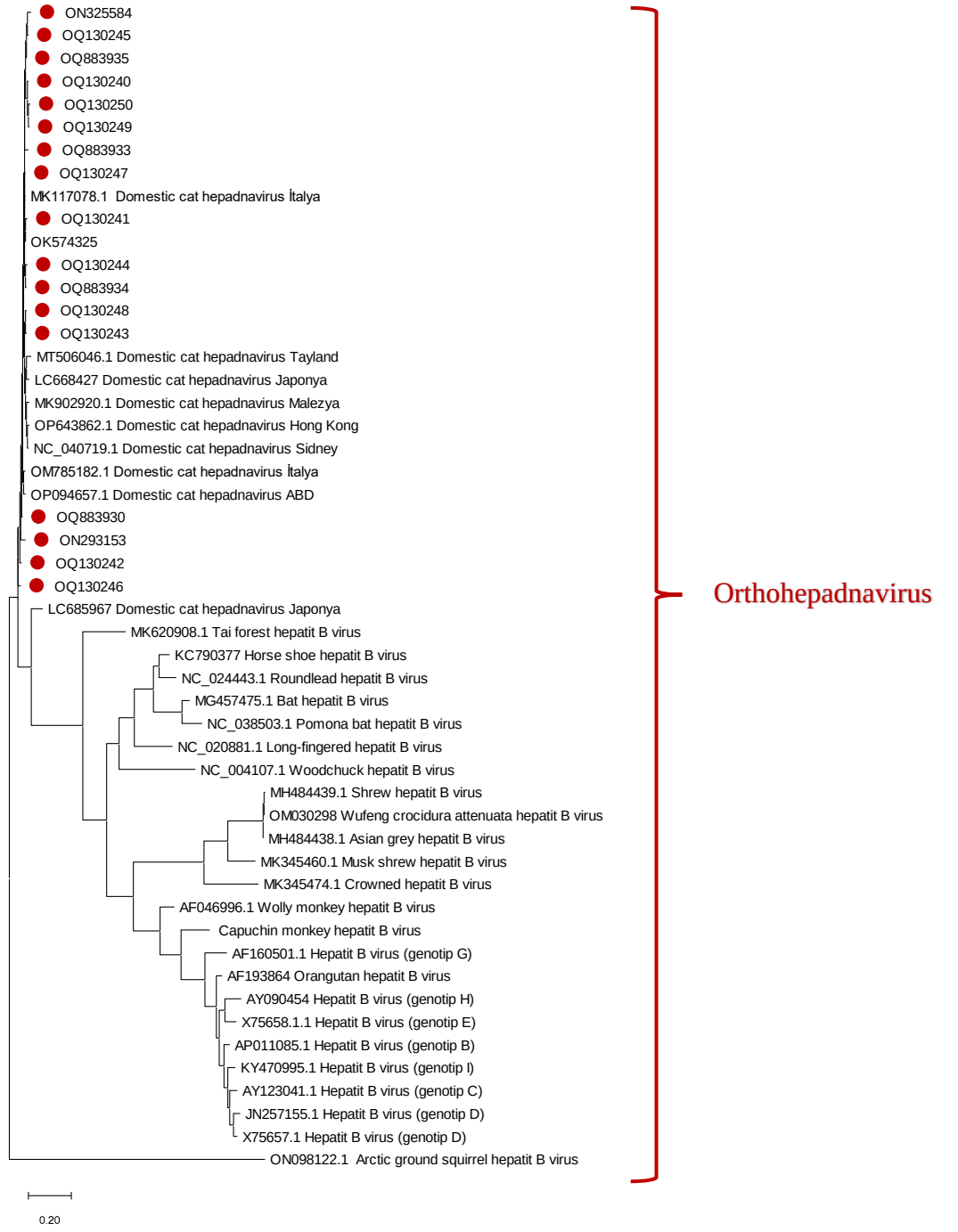
Şekil 3.3. Core gen bölgesine ait filogenetik analiz (n=21). Filogenetik analizde Maximum Likelihood istatistik metodu, Kimura-2 modeli ve 1000 bootstrap tekrarı tercih edilmiştir. Elde edilen sekanslar, dünyadaki hemcinsleri ile aynı genusta sınıflanmıştır. “●” şekli ile gösterilen suşlar bu çalışmada kazanılmıştır.



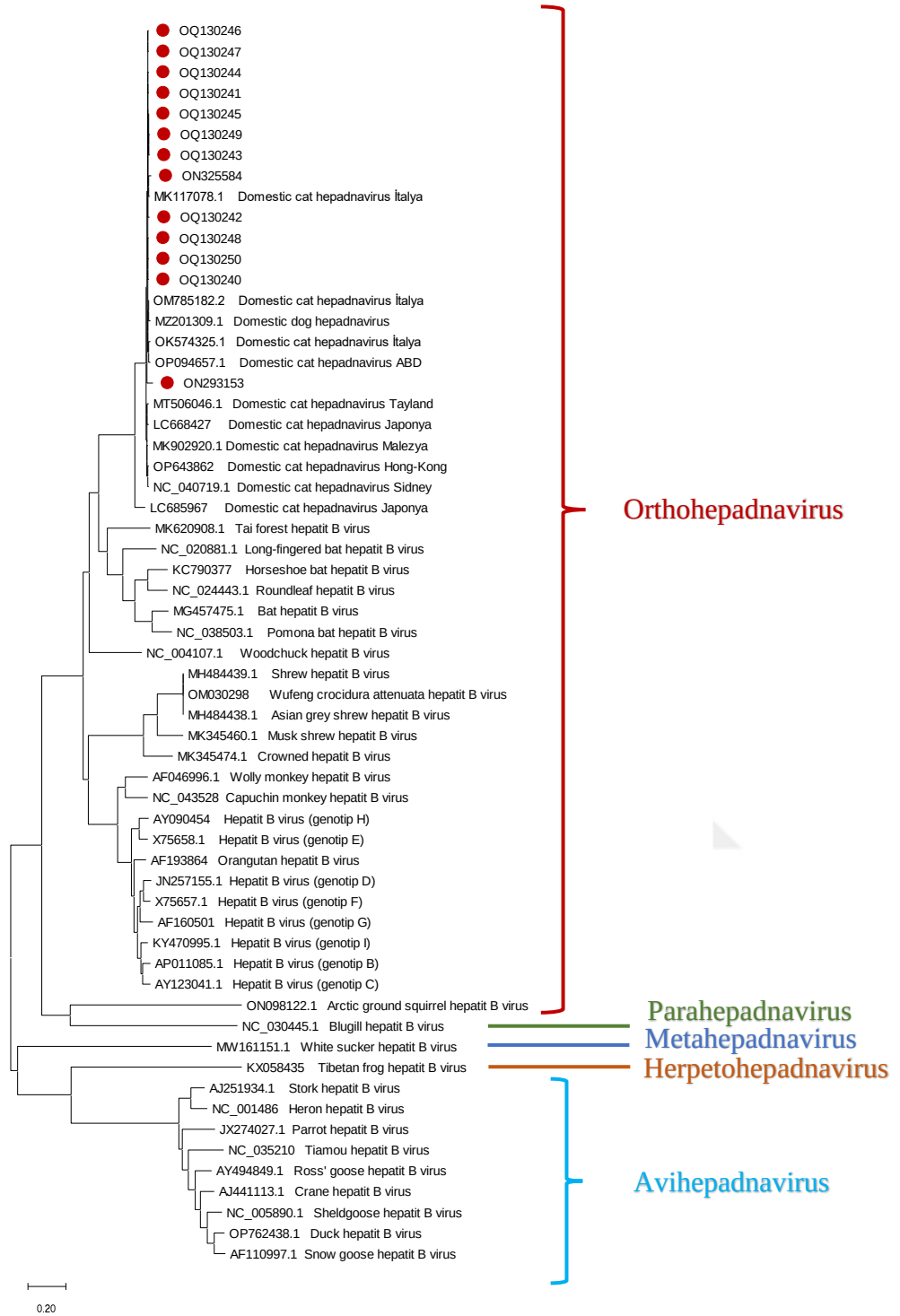
Şekil 3.4. Polimeraz gen bölgesine ait filogenetik analiz (n=17). Filogenetik analizde Maximum Likelihood istatistik metodu, Kimura-2 modeli ve 1000 bootstrap tekrarı tercih edilmiştir. Elde edilen sekanslar, Orthohepadnavirus genusunda dünyadaki hemcinsleri ile aynı genusta sınıflanmıştır. “●” şekli ile gösterilen suşlar bu çalışmada kazanılmıştır.



Şekil 3.5. Surface gen bölgesine ait filogenetik analiz (n=18). Filogenetik analizde Maximum Likelihood istatistik metodu, Kimura-2 modeli ve 1000 bootstrap tekrarı tercih edilmiştir. Elde edilen sekanslar, Orthohepadnavirus genusunda dünyadaki hemcinsleri ile aynı genusta sınıflanmıştır. “●” şekli ile gösterilen suşlar bu çalışmada kazanılmıştır.



Şekil 3.6. X gen bölgesine ait filogenetik analiz (n=17). Filogenetik analizde Maximum Likelihood istatistik metodu, Kimura-2 modeli ve 1000 bootstrap tekrarı tercih edilmiştir. Elde edilen sekanslar, Orthohepadnavirus genusunda dünyadaki hemcinsleri ile aynı genusta sınıflanmıştır. “●” şekli ile gösterilen suşlar bu çalışmada kazanılmıştır.



Şekil 3.7. Toplam 13 tüm genom dizini elde edilen Türkiye orijinli DCH örneğinin filogenetik analizi. Filogenetik analizde Maximum Likelihood istatistik metodu, Kimura-2 modeli ve 1000 bootstrap tekrarı tercih edilmiştir. “●” şekli ile gösterilen suşlar bu çalışmada kazanılan tüm genom dizileridir.

3.5. DCH Pozitif Numunelere Ait Aminoasit ve Nükleotid Benzerliklerinin Karşılaştırılması

BioEdit programı'nda tüm genomuna ulaşılan tüm örneklerin, GenBank veri tabanından alınan hemcinsleri ile karşılaştırılması yapıldı. MK117078.1 accession numaralı suş, referans alınarak aminoasit farklılıkları ve benzerlikleri tespit edilmiş olup, ilgili görsel Şekil 3.8.'de sunuldu.

Bu tez çalışmasında DCH enfeksiyonu yönünden pozitif olduğu tespit edilen örneklerin core, polimeraz ve X gen bölgelerine ait nükleotid benzerliklerinin oldukça yüksek olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlar, Çizelge 3.4.'de verilmiştir. Nükleotid benzerliklerine ait görseller Şekil 3.9., Şekil 3.10., Şekil 3.11., Şekil 3.12. ve Şekil 3.13.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.4. DCH pozitif örneklere ait nükleotid benzerlikleri.

Gen Bölgesi	Örnek Sayısı	Nükleotid Benzerliği
Core gen bölgesi	21	%85,9-97,9
Polimeraz gen bölgesi	17	%94,3-99,1
Surface gen bölgesi	18	%83,1-85,9
X gen bölgesi	17	%95,4-99,6
Tüm genom	13	%86,6-99,0



Şekil 3.8. DCH pozitif örneklere ait aminoasit farklılıkları.



Şekil 3.8. Devam. DCH pozitif örnekler için aminoasit farklılıkları.

TR-03-PEY		96,4	91,7	97,9	98,4	99	99	96,9	96,9	97,9	97,9	97,9	97,9	95,8	97,9	98,4	99	98,4	99,5	99	98,4	99	97,9	98,4	95,8	95,8	95,8	95,8	96,4	89,1
TR-07	95,8	88	95,3	94,8	95,3	96,4	95,3	94,8	95,3	95,3	95,3	95,3	93,2	96,4	95,8	96,4	95,8	96,9	96,4	96,4	96,9	96,4	96,4	93,2	93,2	93,2	93,2	93,8	86,5	
TR-27-02	90,1	87,5		89,6	90,1	90,6	90,6	88,5	88,5	89,6	89,6	89,6	90,1	87,5	89,6	90,1	90,6	90,1	91,1	90,6	90,1	90,6	89,6	90,1	87,5	87,5	87,5	87,5	88	82,3
TR-404	96,4	94,8	88		98,4	96,9	97,9	97,9	97,9	99	99	99	96,9	96,9	99	97,4	97,9	98,4	98,4	99	98,4	97,9	99	97,4	95,8	95,8	95,8	95,8	96,4	88,5
TR-744	97,4	94,8	89,1	97,4		97,4	97,4	97,4	97,4	98,4	98,4	98,4	96,4	96,4	98,4	96,9	97,4	96,9	97,9	98,4	96,9	97,4	98,4	97,4	95,3	95,3	95,3	95,3	95,8	88,5
TR-53	97,4	94,8	89,1	95,3	96,4		97,9	95,8	95,8	96,9	96,9	96,9	96,9	96,9	96,9	98,4	97,9	97,4	98,4	97,9	97,4	97,9	96,9	97,4	95,8	94,8	94,8	94,8	95,3	88
TR-55	97,4	95,8	89,1	96,4	96,4	96,4		96,9	96,9	97,9	97,9	97,9	97,9	95,8	97,9	98,4	99	99	99,5	99	98,4	99	97,9	97,9	95,8	96,4	95,8	96,4	96,4	89,1
TR-68	95,3	94,8	87	96,4	96,4	94,3	95,3		96,9	97,9	97,9	97,9	95,8	95,8	97,9	96,4	96,9	96,4	97,4	97,9	96,4	96,9	97,9	96,4	94,8	94,8	94,8	94,8	95,3	88
TR-288	95,3	94,3	87	96,4	96,4	94,3	95,3	95,3		97,9	97,9	97,9	95,8	95,8	97,9	96,4	96,9	96,4	97,4	97,9	96,4	96,9	97,9	96,4	94,8	94,8	94,8	94,8	95,3	87,5
TR-131	96,4	94,8	88	97,4	97,4	95,3	96,4	96,4	96,4		99	99	96,9	96,9	99	97,4	97,9	97,4	98,4	99	97,4	97,9	99	97,4	96,9	96,9	96,9	96,9	97,4	89,6
TR-185	96,4	94,8	88	97,4	97,4	95,3	96,4	96,4	96,4	97,4		100	97,9	96,9	99	97,4	97,9	97,4	98,4	99	97,4	97,9	99	97,4	96,4	96,4	96,4	96,4	96,9	89,1
TR-192	96,4	94,8	88	97,4	97,4	95,3	96,4	96,4	96,4	97,4	98,4		97,9	96,9	99	97,4	97,9	97,4	98,4	99	97,4	97,9	99	97,4	96,4	96,4	96,4	96,4	96,9	89,1
TR-275	96,4	94,8	88,5	95,3	95,3	95,3	96,4	94,3	94,3	95,3	96,4	96,4		94,8	96,9	97,4	97,9	97,4	98,4	97,9	97,4	97,9	96,9	96,9	96,4	96,4	96,4	96,4	96,9	88
TR-296	94,3	92,7	85,9	95,3	95,3	95,3	94,3	94,3	94,3	95,3	95,3	95,3	93,2		96,9	96,4	95,8	95,3	96,4	96,9	95,3	95,8	96,9	95,3	94,8	93,8	93,8	93,8	94,3	86,5
TR-ASC1	96,4	95,8	88	97,4	97,4	95,3	96,4	96,4	96,4	97,4	97,4	97,4	95,3	95,3		97,4	97,9	97,4	98,4	99	97,4	97,9	100	98,4	95,8	95,8	95,8	95,8	96,4	88,5
TR-428	96,9	95,3	88,5	95,8	95,8	96,9	96,9	94,8	94,8	95,8	95,8	95,8	95,8	94,8	95,8		98,4	97,9	99	98,4	97,9	98,4	97,4	97,4	95,3	95,3	95,3	95,3	95,8	88
TR-382	97,4	95,8	89,1	96,4	96,4	96,4	97,4	95,3	95,3	96,4	96,4	96,4	96,4	94,3	96,4	96,9		98,4	99,5	99	98,4	99	97,9	97,9	95,8	95,8	95,8	95,8	96,4	88,5
TR-453	96,9	95,3	88,5	96,9	95,8	95,8	97,4	94,8	94,8	95,8	95,8	95,8	95,8	93,8	95,8	96,4	96,9		99	98,4	99	98,4	97,4	97,4	95,3	96,4	95,3	96,4	95,8	89,1
TR-409	97,9	96,4	89,6	96,9	96,9	96,9	97,9	95,8	95,8	96,9	96,9	96,9	96,9	94,8	96,9	97,4	97,9	97,4		99,5	99	99,5	98,4	98,4	96,4	96,4	96,4	96,4	96,9	89,1
TR-SV15	97,4	95,8	89,1	97,4	97,4	96,4	97,4	96,4	96,4	97,4	97,4	97,4	96,4	95,3	97,4	96,9	97,4	96,9	97,9		98,4	99	99	98,4	96,9	96,9	96,9	96,9	97,4	89,6
TR-SV8	96,9	95,8	88,5	96,9	95,8	95,8	96,9	94,8	94,8	95,8	95,8	95,8	95,8	93,8	95,8	96,4	96,9	97,4	97,4	96,9		99,5	97,4	97,4	95,3	95,3	95,3	95,3	95,8	88
OK574325	97,4	96,4	89,1	96,4	96,4	96,4	97,4	95,3	95,3	96,4	96,4	96,4	96,4	94,3	96,4	96,9	97,4	96,9	97,9	97,4	97,9		97,9	97,9	95,8	95,8	95,8	95,8	96,4	88,5
MK117078.1/İtalya	96,4	95,8	88	97,4	97,4	95,3	96,4	96,4	96,4	97,4	97,4	97,4	95,3	95,3	98,4	95,8	96,4	95,8	96,9	97,4	95,8	96,4		98,4	95,8	95,8	95,8	95,8	96,4	88,5
OM785182	96,9	95,8	88,5	95,8	96,4	95,8	96,4	94,8	94,8	95,8	95,8	95,8	95,3	93,8	96,9	95,8	96,4	95,8	96,9	96,9	95,8	96,4	96,9		95,3	95,3	95,3	95,3	95,8	89,1
MK902920.1/Malezya	94,3	92,7	85,9	94,3	94,3	94,3	94,3	93,2	93,2	95,3	94,8	94,8	94,8	93,2	94,3	93,8	94,3	93,8	94,8	95,3	93,8	94,3	94,3	93,8		99	99	98,4	99,5	89,1
OP643862.1/Hong Kong	94,3	92,7	85,9	94,3	94,3	93,2	94,8	93,2	93,2	95,3	94,8	94,8	94,8	92,2	94,3	93,8	94,3	94,8	94,8	95,3	93,8	94,3	94,3	93,8	97,4		99	99,5	99,5	90,1
MT506046.1/Tayland	94,3	92,7	85,9	94,3	94,3	93,2	94,3	93,2	93,2	95,3	94,8	94,8	94,8	92,2	94,3	93,8	94,3	93,8	94,8	95,3	93,8	94,3	94,3	93,8	97,4	97,4		98,4	99,5	89,1
NC_040719.1/Sidney	94,3	92,7	85,9	94,3	94,3	93,2	94,8	93,2	93,2	95,3	94,8	94,8	94,8	92,2	94,3	93,8	94,3	94,8	94,8	95,3	93,8	94,3	94,3	93,8	96,9	97,9	96,9		99	90,1
LC668427/Japonya	94,8	93,2	86,5	94,8	94,8	93,8	94,8	93,8	93,8	95,8	95,3	95,3	95,3	92,7	94,8	94,3	94,8	94,3	95,3	95,8	94,3	94,8	94,8	94,3	97,9	97,9	97,9	97,4		89,6
LC685967.1/Japonya	87,5	85,9	80,7	87	87,5	86,5	87,5	86,5	85,9	88	87,5	87,5	86,5	84,9	87	86,5	87	87,5	87,5	88	86,5	87	87	87,5	87,5	88,5	87,5	88,5	88	
OP094657.1/ABD	97,4	97,4	89,1	96,4	96,4	96,4	97,4	95,3	95,3	96,4	96,4	96,4	96,4	94,3	96,9	96,9	97,4	96,9	97,9	97,4	97,4	96,9	96,9	96,9	94,3	94,3	94,3	94,3	94,8	87

Şekil 3.9. Core gen bölgesine yönelik nükleotid benzerliklerinin karşılaştırılması (MatGAT 2.01).

TR-744		98,7	98,8	98,6	98,5	98,8	98,9	98,7	98,1	98,9	98,5	95,7	98	98,6	98,2	98,1	97,4	97,3	97,3	97,2	97,2	89,1
TR-503	98,7		98,8	98,7	98,6	98,9	98,8	98,7	98,3	98,8	98,9	95,9	98	98,6	98,3	98,3	97,4	97,5	97,3	97,5	97,3	89,2
TR-404	98,8	98,8		99	98,9	99,2	99,6	99,1	98,4	98,8	99,3	96,1	98,7	98,8	98,4	98,2	97,5	97,5	97,3	97,4	97,4	89
TR-409	98,6	98,7	99		99,1	99,1	98,8	99,1	98,4	98,7	98,6	96,1	98	98,9	98,4	98,2	97,5	97,5	97,2	97,4	97,3	89,2
TR-428	98,5	98,6	98,9	99,1		99	98,7	98,9	98,3	98,6	98,4	95,8	97,9	98,8	98,2	98,1	97,5	97,5	97,2	97,4	97,3	88,9
TR-382	98,8	98,9	99,2	99,1	99		99	99,3	98,5	98,9	98,8	96,2	98,2	98,9	98,7	98,3	97,7	97,6	97,4	97,6	97,5	89,3
TR-55	98,9	98,8	99,6	98,8	98,7	99		99	98,4	98,9	99,3	96	98,5	98,8	98,3	98,1	97,4	97,5	97,4	97,4	97,3	89
TR-07	98,7	98,7	99,1	99,1	98,9	99,3	99		98,4	98,8	98,7	96,1	98,2	98,8	98,5	98,4	97,7	97,7	97,4	97,6	97,6	89,2
TR-275	98,1	98,3	98,4	98,4	98,3	98,5	98,4	98,4		98,4	98,4	95,9	97,7	98,5	98,1	97,9	97,3	97,3	96,9	97,1	97,1	89,2
TR-03-PEY	98,9	98,8	98,8	98,7	98,6	98,9	98,9	98,8	98,4		98,6	96	98,1	98,8	98,5	98,1	97,6	97,6	97,4	97,5	97,5	89,2
TR-296	98,5	98,9	99,3	98,6	98,4	98,8	99,3	98,7	98,4	98,6		96	98,3	98,5	98,4	98,2	97,3	97,4	97,1	97,3	97,2	89
TR-SV15	95,7	95,9	96,1	96,1	95,8	96,2	96	96,1	95,9	96	96		95,4	96,2	95,8	95,7	95,8	95,5	95,5	95,3	95,4	87,4
TR-SV8	98	98	98,7	98	97,9	98,2	98,5	98,2	97,7	98,1	98,3	95,4		98,5	97,6	97,5	96,7	96,8	96,5	96,6	96,6	88,9
MK117078.1/İtalya	98,6	98,6	98,8	98,9	98,8	98,9	98,8	98,8	98,5	98,8	98,5	96,2	98,5		98,3	98,1	97,5	97,4	97,1	97,3	97,3	89,4
OM785182.2/İtalya	98,2	98,3	98,4	98,4	98,2	98,7	98,3	98,5	98,1	98,5	98,4	95,8	97,6	98,3		98,2	97,3	97,4	97	97,2	97,2	89,2
OK574325.1/İtalya	98,1	98,3	98,2	98,2	98,1	98,3	98,1	98,4	97,9	98,1	98,2	95,7	97,5	98,1	98,2		97,2	97,2	97	97,1	97	89,3
MK902920.1/Malezya	97,4	97,4	97,5	97,5	97,5	97,7	97,4	97,7	97,3	97,6	97,3	95,8	96,7	97,5	97,3	97,2		98,6	98,2	98,3	98,3	89
OP643862.1/Hong Kong	97,3	97,5	97,5	97,5	97,5	97,6	97,5	97,7	97,3	97,6	97,4	95,5	96,8	97,4	97,4	97,2	98,6		98,1	98,8	98,4	89,1
MT506046.1/Tayland	97,3	97,3	97,3	97,2	97,2	97,4	97,4	97,4	96,9	97,4	97,1	95,5	96,5	97,1	97	97	98,2	98,1		98	98,1	88,8
NC_040719.1/Sidney	97,2	97,5	97,4	97,4	97,4	97,6	97,4	97,6	97,1	97,5	97,3	95,4	96,6	97,3	97,2	97,1	98,3	98,8	98		98	89
LC668427/Japonya	97,2	97,3	97,4	97,3	97,3	97,5	97,3	97,6	97,1	97,5	97,2	95,4	96,6	97,3	97,2	97	98,3	98,4	98,1	98		89
LC685967.1/Japonya	89,2	89,2	89	89,2	88,9	89,4	89	89,2	89,2	89,2	89	87,4	88,9	89,4	89,3	89,3	89	89,1	88,8	89	89	
OP094657.1/ABD	93,2	93,4	93,4	93,5	93,4	93,5	93,3	93,6	93,2	93,4	93,4	90,9	92,6	93,3	93,4	93,8	92,4	92,5	92,1	92,3	92,3	84,5

Şekil 3.10. Tüm genomu aydınlatılan DCH pozitif örneklerin nükleotid benzerliklerinin karşılaştırılması (MatGAT 2.01).

MK117078.1/İtalya		99	99,2	97,7	97,2	97,2	98,2	97,7	88,9	98,5	97,7	98,2	98,5	97,2	99,5	98,2	98,2	98,2	98	98	98,5	98	98,7	99,2	99	97
OM785182.2/İtalya	98,5		98,2	97	96,5	96,2	97,5	97	88,1	98,5	96,7	97,7	97,5	97,2	98,5	98,2	97,2	97,7	97,5	97,5	98,5	97	98,2	98,7	98	96
OK574325.1/İtalya	98,7	97,7		97,5	97	97	98	98	88,6	98,7	97	98	98,2	97	99,2	98	98	99	97,7	97,7	98,2	97,7	98,5	99	98,7	97,2
MK902920.1/Malezya	97,2	96,5	97		97,2	96,2	98,2	97	88,4	97	96	97,2	96,7	95,7	97,7	96,5	96,7	96,5	97	96,7	97,5	96,7	97,2	97,5	97,2	95,2
OP643862.1/Hong Kong	96,7	96	96,5	96,7		95,5	98,5	97	87,6	96,5	95,2	96,7	96,2	95,2	97,2	96	96	96	96,7	96	97	96	96,7	97	96,7	94,7
MT506046.1/Tayland	96,7	95,7	96,5	95,7	94,9		96,5	96,7	87,1	96,2	97	97	96,7	94,9	97,2	96	97,2	96	95,7	96,5	96,7	96,5	96,5	97	96,7	94,7
NC_040719.1/Sidney	97,7	97	97,5	97,7	98	96		97,5	88,1	97,5	96,2	97,7	97,2	96,2	98,2	97	97	97	97,2	97	98	97	97,7	98	97,7	95,7
LC668427/Japonya	97,2	96,5	97,5	96,5	96,5	96,2	97		87,4	97,5	96,7	97,5	97,2	95,7	97,7	96,7	97,2	97	97	97,2	97,7	96,5	97,5	97,5	97,5	95,5
LC685967.1/Japonya	88,4	87,6	88,1	87,9	87,1	86,6	87,6	86,9		88,1	87,1	87,9	87,4	88,4	88,4	87,6	87,9	87,9	88,6	86,9	88,1	87,6	87,9	88,4	87,9	86,9
OP094657.1/ABD	98	98	98,2	96,5	96	95,7	97	97	87,6		96,2	97,7	97,5	96,7	98,5	97,7	97,2	97,7	97,7	97,5	98	97	98,5	98,2	98	96
TR-744	97,2	96,2	96,5	95,5	94,7	96,5	95,7	96,2	86,6	95,7		97,7	97,7	94,9	97,2	97	98,5	96,5	95,7	98,2	97	97	97	97	97,7	95,7
TR-503	98	97,5	97,7	97	96,5	96,7	97,5	97,2	87,6	97,5	97,5		98,2	96,5	98,2	98,5	98	97,5	97,2	98,7	98,7	97,2	98,5	98	98,7	96,7
TR-404	98	97	97,7	96,2	95,7	96,2	96,7	96,7	86,9	97	97,2	98		96,2	98,5	98,2	97,7	97,7	97	98	98	97	98,2	98,2	99,5	98
TR-409	96,7	96,7	96,5	95,2	94,7	94,4	95,7	95,2	87,9	96,2	94,4	96,2	95,7		97,7	96,5	96	96,5	97,2	96,2	97,2	96	97	97,5	96,7	94,9
TR-428	99	98	98,7	97,2	96,7	96,7	97,7	97,2	87,9	98	96,7	98	98	97,2		98,2	98,2	98,2	98	98	98,5	98	98,7	99,2	99	97,2
TR-382	98	98	97,7	96,2	95,7	95,7	96,7	96,5	87,4	97,5	96,7	98,2	98	96,2	98		97,5	98	97	98,2	98,2	96,7	98,2	98,5	98,7	96,7
TR-55	97,7	96,7	97,5	96,2	95,5	96,7	96,5	96,7	87,4	96,7	98	97,7	97,2	95,5	97,7	97,2		97	96,7	98,7	97,7	97,5	98	98	98,2	96,2
TR-07	97,7	97,2	98,5	96	95,5	95,5	96,5	96,5	87,4	97,2	96	97,2	97,2	96	97,7	97,7	96,5		96,7	97,2	97,7	96,7	98	99	98,2	96,7
TR-275	97,5	97	97,2	96,5	96,2	95,2	96,7	96,5	88,1	97,2	95,2	97	96,5	96,7	97,5	96,7	96,2	96,2		97	97,5	96,7	98,2	97,7	97,5	95,5
TR-03-PEY	97,7	97,2	97,5	96,5	95,7	96,2	96,7	97	86,6	97,2	98	98,5	97,7	96	97,7	98	98,5	97	96,7		98	97	98,2	97,7	98,5	96,5
TR-296	98	98	97,7	97	96,5	96,2	97,5	97,2	87,6	97,5	96,5	98,5	97,5	96,7	98	98	97,2	97,2	97	97,7		97,2	98,7	98,7	98,5	97
TR-192	97,5	96,5	97,2	96,2	95,5	96	96,5	96	87,1	96,5	96,5	97	96,5	95,5	97,5	96,5	97	96,2	96,2	96,7	96,7		97,2	97,7	97,5	95,5
TR-131	98,2	97,7	98	96,7	96,2	96	97,2	97	87,4	98	96,5	98,2	97,7	96,5	98,2	98	97,5	97,5	97,7	98	98,2	96,7		99	98,7	96,7
TR-288	98,7	98,2	98,5	97	96,5	96,5	97,5	97	87,9	97,7	96,5	97,7	97,7	97	98,7	98,2	97,5	98,5	97,2	97,5	98,2	97,2	98,5		98,7	96,7
TR-453	98,5	97,5	98,2	96,7	96,2	96,2	97,2	97	87,4	97,5	97,2	98,5	99	96,2	98,5	98,5	97,7	97,7	97	98,2	98	97	98,2	98,2		98
TR-SV8	96,7	95,7	97	94,9	94,4	94,4	95,5	95,2	86,6	95,7	95,5	96,7	97,7	94,7	97	96,7	96	96,5	95,2	96,5	96,7	95,2	96,5	96,5	97,7	
TR-SV15	96,5	96,5	96,2	94,9	94,4	94,7	95,5	94,9	86,6	96,2	94,2	96	96	95,7	96,5	96,2	95,2	95,7	96,5	95,7	96,5	95,2	96,7	96,7	96,5	94,7

Şekil 3.11. X gen bölgesine yönelik nükleotid benzerliklerinin karşılaştırılması (MatGAT 2.01).

TR-61		99,1	98,7	98,7	97,8	99,1	98,7	97,8	97,4	99,1	99,1	98,7	98,7	96,9	96,1	96,1	98,7	98,7	98,7	97,8	96,5	98,2	98,7	98,2	97,8	90,8
TR-SV15	98,2		99,6	99,6	98,7	100	99,6	98,7	98,2	100	100	99,6	99,6	97,8	96,9	96,9	99,6	99,6	99,6	98,7	97,4	99,1	99,6	99,1	98,7	91,7
TR-SV8	98,2	99,1		99,1	98,2	99,6	99,1	98,2	97,8	99,6	99,6	99,1	99,1	97,4	96,5	96,5	99,1	99,1	99,1	98,2	96,9	98,7	99,1	98,7	98,2	91,2
TR-192	97,8	98,7	98,7		98,2	99,6	99,1	99,1	98,7	99,6	99,6	99,1	99,1	97,4	96,5	96,5	99,1	99,1	99,1	98,2	96,9	98,7	99,1	98,7	98,2	92,1
TR-185	96,9	97,8	97,8	97,4		98,7	98,2	97,8	96,9	98,7	98,7	98,2	98,2	96,5	95,6	96,1	98,2	98,2	98,2	97,4	96,1	97,8	98,2	97,8	97,4	91,7
TR-453	98,2	99,1	99,1	98,7	97,8		99,6	98,7	98,2	100	100	99,6	99,6	97,8	96,9	96,9	99,6	99,6	99,6	98,7	97,4	99,1	99,6	99,1	98,7	91,7
TR-409	97,8	98,7	98,7	98,2	97,4	98,7		99,1	97,8	99,6	99,6	99,1	99,1	97,4	96,5	97,4	100	99,1	99,1	98,2	96,9	98,7	99,1	98,7	98,2	91,2
TR-428	96,9	97,8	97,8	98,2	96,9	97,8	97,8		97,8	98,7	98,7	98,2	98,2	96,5	95,6	97,4	99,1	98,2	98,2	97,4	96,1	97,8	98,2	97,8	97,4	91,7
TR-07	96,5	97,4	97,4	97,8	96,1	97,4	96,9	96,9		98,2	98,2	97,8	97,8	96,1	95,2	95,2	97,8	98,7	97,8	96,9	96,5	98,2	97,8	97,4	96,9	91,7
TR-131	98,2	99,1	99,1	98,7	97,8	99,1	98,7	97,8	97,4		100	99,6	99,6	97,8	96,9	96,9	99,6	99,6	99,6	98,7	97,4	99,1	99,6	99,1	98,7	91,7
TR-404	98,2	99,1	99,1	98,7	97,8	99,1	98,7	97,8	97,4	99,1		99,6	99,6	97,8	96,9	96,9	99,6	99,6	99,6	98,7	97,4	99,1	99,6	99,1	98,7	91,7
TR-503	97,8	98,7	98,7	98,2	97,4	98,7	98,2	97,4	96,9	98,7	98,7		99,1	97,4	96,5	96,5	99,1	99,1	99,1	99,1	96,9	98,7	99,1	98,7	98,2	92,1
TR-177	97,8	98,7	98,7	98,2	97,4	98,7	98,2	97,4	96,9	98,7	98,7	98,2		97,4	96,5	96,5	99,1	99,1	99,1	98,2	96,9	98,7	99,1	98,7	98,2	91,2
TR-44	96,1	96,9	96,9	96,5	95,6	96,9	96,5	95,6	95,2	96,9	96,9	96,5	96,5		99,1	97,4	97,4	97,4	97,4	96,5	95,2	96,9	97,4	96,9	96,5	89,9
TR-55	95,6	96,5	96,5	96,1	95,2	96,5	96,1	95,2	94,7	96,5	96,5	96,1	96,1	98,7		96,5	96,5	96,5	96,5	95,6	94,3	96,1	96,5	96,1	95,6	89
TR-288	95,2	96,1	96,1	95,6	95,2	96,1	96,1	96,1	94,3	96,1	96,1	95,6	95,6	96,5	96,1		97,4	96,5	96,5	95,6	94,3	96,1	96,5	96,1	95,6	89,5
TR-2702	97,8	98,7	98,7	98,2	97,4	98,7	98,7	97,8	96,9	98,7	98,7	98,2	98,2	96,5	96,1	96,1		99,1	99,1	98,2	96,9	98,7	99,1	98,7	98,2	91,2
MK117078.1/İtalya	97,8	98,7	98,7	98,2	97,4	98,7	98,2	97,4	97,8	98,7	98,7	98,2	98,2	96,5	96,1	95,6	98,2		99,1	98,2	96,9	98,7	99,1	98,7	98,2	91,2
OM785182.2/İtalya	97,8	98,7	98,7	98,2	97,4	98,7	98,2	97,4	96,9	98,7	98,7	98,2	98,2	96,5	96,1	95,6	98,2	98,2		98,2	96,9	98,7	99,1	98,7	98,2	92,1
OK574325.1/İtalya	96,9	97,8	97,8	97,4	96,5	97,8	97,4	96,5	96,1	97,8	97,8	98,2	97,4	95,6	95,2	94,7	97,4	97,4	97,4		96,1	97,8	98,2	97,8	97,4	91,7
MK902920.1/Malezya	95,6	96,5	96,5	96,1	95,2	96,5	96,1	95,2	95,6	96,5	96,5	96,1	96,1	94,3	93,9	93,4	96,1	96,1	96,1	95,2		98,2	97,8	97,4	96,9	89
OP643862.1/Hong Kong	97,4	98,2	98,2	97,8	96,9	98,2	97,8	96,9	97,4	98,2	98,2	97,8	97,8	96,1	95,6	95,2	97,8	97,8	97,8	96,9	97,4		99,6	99,1	98,7	90,8
MT506046.1/Tayland	97,8	98,7	98,7	98,2	97,4	98,7	98,2	97,4	96,9	98,7	98,7	98,2	98,2	96,5	96,1	95,6	98,2	98,2	98,2	97,4	96,9	98,7		99,6	99,1	91,2
NC_040719.1/Sidney	97,4	98,2	98,2	97,8	96,9	98,2	97,8	96,9	96,5	98,2	98,2	97,8	97,8	96,1	95,6	95,2	97,8	97,8	97,8	96,9	96,5	98,2	98,7		98,7	90,8
LC668427/Japonya	96,9	97,8	97,8	97,4	96,5	97,8	97,4	96,5	96,1	97,8	97,8	97,4	97,4	95,6	95,2	94,7	97,4	97,4	97,4	96,5	96,1	97,8	98,2	97,8		91,2
LC685967.1/Japonya	89,9	90,8	90,8	91,2	90,8	90,8	90,4	90,8	90,8	90,8	90,8	91,2	90,4	89	88,6	88,6	90,4	90,4	91,2	90,8	88,2	89,9	90,4	89,9	90,4	
OP094657.1/ABD	97,8	98,7	98,7	99,1	97,4	98,7	98,2	98,2	97,8	98,7	98,7	98,2	98,2	96,5	96,1	95,6	98,2	98,2	98,2	97,4	96,1	97,8	98,2	97,8	97,4	91,2

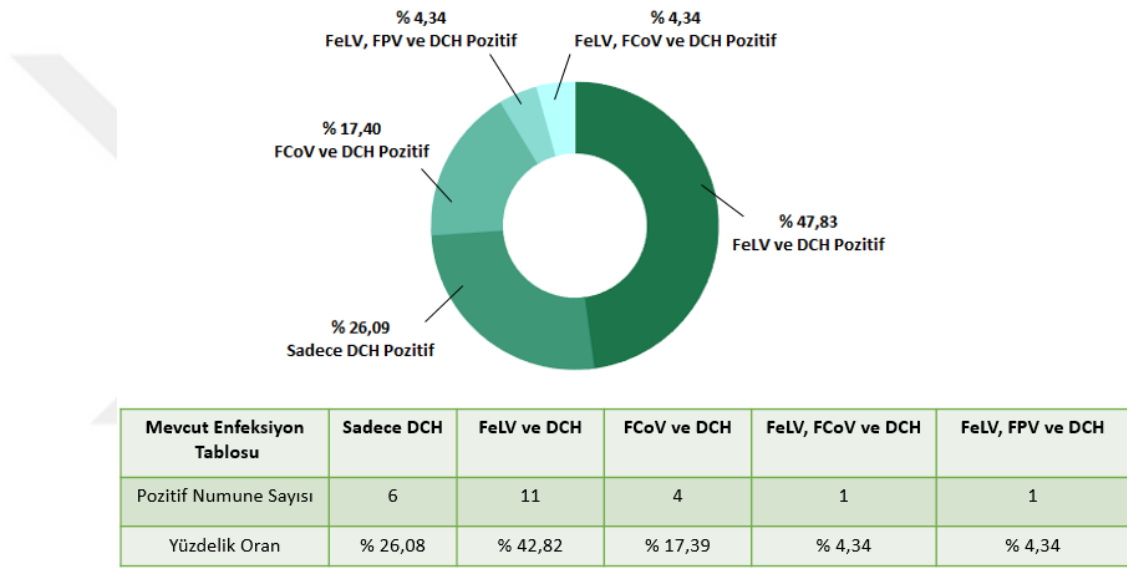
Şekil 3.12. Polimeraz gen bölgesine yönelik nükleotid benzerliklerinin karşılaştırılması (MatGAT 2.01).

TR-404		97,9	98,3	98,1	98,6	98,6	100	100	98,6	98,6	99,6	98,3	99,2	98,8	99	99	99,6	98,3	98,8	98,6	98,4	97,5	98,3	96,9	97,5	97,5	87,6		
TR-428	83,7		97,7	97,1	98,6	97,3	97,9	97,9	97,7	97,9	97,9	97,7	98,3	98,6	98,1	98,1	97,9	97,3	99	97,7	97,5	96,9	97,7	96,3	96,9	97,3	87		
TR-03-PEY	84,1	83,5		97,5	98,1	98,1	98,3	98,3	98,1	98,1	98,3	98,1	98,6	98,3	98,4	98,4	98,3	98,3	98,6	98,4	97,9	97,7	98,3	96,9	97,5	97,5	87,6		
TR-53	83,9	82,9	83,3		97,9	97,9	98,1	98,1	98,3	97,9	98,1	98,6	98,4	98,1	98,3	98,3	98,1	97,9	98,1	97,9	98,1	96,7	97,5	96,5	97,1	96,7	87,6		
TR-409	84,5	84,5	83,9	83,7		98,1	98,6	98,6	98,4	98,4	98,6	98,1	99	99,4	98,8	98,8	98,6	98,1	99,4	98,4	98,3	97,3	98,1	96,7	97,3	97,7	86,8		
TR-744	84,5	83,1	83,9	83,7	83,9		98,6	98,6	98,1	98,1	98,6	98,1	98,6	98,3	98,4	98,4	98,6	98,8	98,3	98,1	98,6	97,3	97,7	96,3	96,9	96,9	87,8		
TR-55	85,9	83,7	84,1	83,9	84,5	84,5		100	98,6	98,6	99,6	98,3	99,2	98,8	99	99	99,6	98,3	98,8	98,6	98,4	97,5	98,3	96,9	97,5	97,5	87,6		
TR-296	85,9	83,7	84,1	83,9	84,5	84,5	85,9		98,6	98,6	99,6	98,3	99,2	98,8	99	99	99,6	98,3	98,8	98,6	98,4	97,5	98,3	96,9	97,5	97,5	87,6		
TR-382	84,5	83,5	83,9	84,1	84,3	83,9	84,5	84,5		98,4	98,6	98,1	99	98,8	98,8	99	98,6	98,1	98,6	98,8	98,3	97,5	98,3	96,9	97,5	97,5	88,2		
TR-275	84,5	83,7	83,9	83,7	84,3	83,9	84,5	84,5	84,3		98,6	98,1	99,4	98,6	98,8	99,2	98,6	98,1	98,6	98,4	98,3	97,5	98,3	96,9	97,5	97,5	87,4		
TR-27-02	85,5	83,7	84,1	83,9	84,5	84,5	85,5	84,5	84,5	84,5		98,3	99,2	98,8	99	99	99,6	98,3	98,8	98,6	98,4	97,5	98,3	96,9	97,5	97,5	87,6		
TR-68	84,1	83,5	83,9	84,5	83,9	83,9	84,1	84,1	83,9	83,9	84,1		98,6	98,3	98,4	98,4	98,3	98,1	98,6	98,1	98,3	96,9	97,7	96,3	97,3	96,9	87,2		
TR-288	85,1	84,1	84,5	84,3	84,9	84,5	85,1	85,1	84,9	85,3	85,1	84,5		99,2	99,4	99,8	99,2	98,6	99,2	99	98,8	97,9	98,6	97,3	97,9	97,9	87,8		
TR-131	84,7	84,5	84,1	83,9	85,3	84,1	84,7	84,7	84,7	84,5	84,7	84,1	85,1		99	99,4	98,8	98,3	99,6	98,8	98,4	97,9	98,6	97,3	97,9	98,3	87,4		
TR-07	84,9	83,9	84,3	84,1	84,7	84,3	84,9	84,9	84,7	84,7	84,9	84,3	85,3	84,9		99,2	99	98,4	99	98,8	98,6	97,7	98,4	97,1	97,7	97,7	87,2		
TR-SV15	84,9	83,9	84,3	84,1	84,7	84,3	84,9	84,9	84,9	85,1	84,9	84,3	85,7	85,3	85,1		99	98,4	99	99	98,6	98,1	98,8	97,5	98,1	98,1	88		
TR-SV8	85,5	83,7	84,1	83,9	84,5	84,5	85,5	85,5	84,5	84,5	85,5	84,1	85,1	84,7	84,9	84,9		98,3	98,8	98,6	98,4	97,5	98,3	96,9	97,5	97,5	87,8		
TR-192	84,1	83,1	84,1	83,7	83,9	84,7	84,1	84,1	83,9	83,9	84,1	83,9	84,5	84,1	84,3	84,3	84,1		98,3	98,1	98,6	97,1	97,9	96,5	97,1	97,1	87,8		
MK117078.1/İtalya	84,7	84,9	84,5	83,9	85,3	84,1	84,7	84,7	84,5	84,5	84,7	84,5	85,1	85,5	84,9	84,9	84,7	84,1		98,6	98,4	97,5	98,3	96,9	97,5	97,9	87		
OM785182.2/İtalya	84,5	83,5	84,3	83,7	84,3	83,9	84,5	84,5	84,7	84,3	84,5	83,9	84,9	84,7	84,7	84,9	84,5	83,9	84,5		98,6	97,9	98,6	97,3	97,9	97,9	88		
OK574325.1/İtalya	84,3	83,3	83,7	83,9	84,1	84,5	84,3	84,3	84,1	84,1	84,3	84,1	84,7	84,3	84,5	84,5	84,3	84,5	84,3	84,5	84,3	84,5		97,1	97,9	96,5	97,1	97,1	87,6
MK902920.1/Malezya	83,3	82,8	83,5	82,6	83,1	83,1	83,3	83,3	83,3	83,3	83,3	82,8	83,7	83,7	83,5	83,9	83,3	82,9	83,3	83,7	82,9		99	97,7	98,3	98,3	87,2		
OP643862.1/Hong Kong	84,1	83,5	84,1	83,3	83,9	83,5	84,1	84,1	84,1	84,1	84,1	83,5	84,5	84,5	84,3	84,7	84,1	83,7	84,1	84,5	83,7	84,9		98,6	99,2	99,2	87,8		
MT506046.1/Tayland	82,8	82,2	82,8	82,4	82,6	82,2	82,8	82,8	82,8	82,8	82,2	83,1	83,1	82,9	83,3	82,8	82,4	82,8	83,1	82,4	83,5	84,5		97,9	98,1	87,2			
NC_040719.1/Sidney	83,9	83,3	83,9	83,5	83,7	83,3	83,9	83,9	83,9	83,9	83,9	83,7	84,3	84,3	84,1	84,5	83,9	83,5	83,9	84,3	83,5	84,7	85,7	84,3		98,4	87,4		
LC668427/Japonya	83,3	83,1	83,3	82,6	83,5	82,8	83,3	83,3	83,3	83,3	83,3	82,8	83,7	84,1	83,5	83,9	83,3	82,9	83,7	83,7	82,9	84,1	85,1	83,9	84,9		87,8		
LC685967.1/Japonya	73,4	72,9	73,4	73,4	72,7	74	73,4	73,4	74,4	73,3	73,4	73,1	73,6	73,3	73,1	73,8	73,6	74	72,9	74,2	73,8	73,1	73,6	73,1	73,8	73,6			
OP094657.1/ABD	84,3	83,3	83,7	83,9	84,1	84,1	84,3	84,3	84,1	84,1	84,3	84,1	84,7	84,3	84,5	84,5	84,3	84,1	84,3	84,5	85,1	83,3	84,1	82,8	83,9	83,3	73,4		

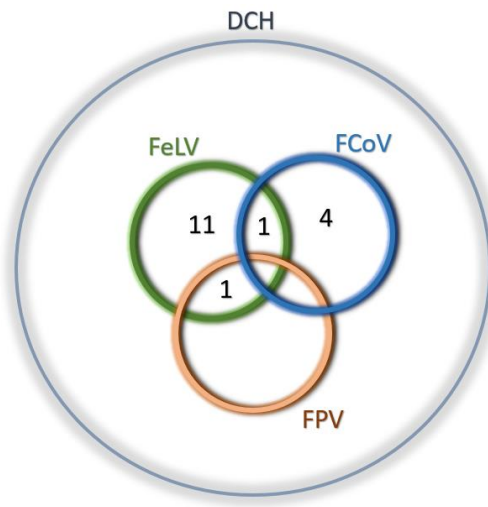
Şekil 3.13. Surface gen bölgesine yönelik nükleotid benzerliklerinin karşılaştırılması (MatGAT 2.01).

3.6. DCH Pozitif Örneklerde Ko-Enfeksiyon ve Hemogram Bulguları

Hepadnavirus pozitifliği belirlenen kediler, bazı kedi viral enfeksiyonları (FeLV, FIV, FPV, FCoV) yönünden de araştırılmış, tekli (n=6) enfeksiyon varlığı yanısıra, özellikle FeLV (n=13) enfeksiyonu başta olmak üzere, FCoV (n=5) ve FPV (n=1) enfeksiyonlarının birlikte varlıkları tespit edilmiştir. FIV yönünden herhangi pozitiflik bulunmamıştır. Tekli veya çoklu enfeksiyon sonuçları, Şekil 3.14. ve Şekil 3.15.'de görselleştirilmiştir.



Şekil 3.14. Ko-enfeksiyonların değerlendirilmesine yönelik grafik.



Şekil 3.15. Ko-enfeksiyon sonuçlarına ait grafik.

Bu doktora tez çalışması kapsamında, DCH enfekte kedilerde tekli enfeksiyon seyrinin yanı sıra, çoklu enfeksiyonların da varlığı gösterilmiştir. *Feline* Retroviruslarla olan ko-enfeksiyon sıklığı, araştırılan diğer enfeksiyonlara (FCoV, FIV ve FPV) göre oldukça yüksek bulunmuştur. Bu bağlamda, bu tez çalışmasında pozitiflik saptanan viral enfeksiyonların sıklığı, FeLV (%56,5) > FCoV (%21,7) > FPV (%4,3) olarak belirlenmiş olup, FIV enfeksiyonu yönünden pozitifliğe rastlanmamıştır.

DCH nükleik asiti yönünden pozitif olduğu tespit edilen 23 adet kedi örneği için istatistiksel frekans (sıklık) analizi hazırlanmış olup, analiz sonuçları Çizelge 3.5.'de sunulmuştur.

DCH pozitif kedilerin bazılarının (n=13) hemogram değerlerine ulaşılmış olup, 7 kedinin ALT değerlerinin referans aralığın üstünde olduğu, 6 kedinin AST değerinin yüksek olduğu kaydedilmiştir. 3 kedide ALP değerinin referans aralığın üstünde olduğu ve 8 kedide trombositopeni tablosunun bulunduğu kaydedilmiştir (Ek-2).

Çizelge 3.5. DCH pozitif kedilere ait frekans (sıklık) analiz çizelgesi.

Yaş				
	Sıklık	Yüzde	Yüzde	Kümülatif Yüzde
2 yaş ve altı	16	69,6	69,6	69,6
2 yaş üzeri	7	30,4	30,4	100,0
Toplam	23	100,0	100,0	
Cinsiyet				
	Sıklık	Yüzde	Yüzde	Kümülatif Yüzde
Erkek	13	56,5	56,5	56,5
Dişi	10	43,5	43,5	100,0
Toplam	23	100,0	100,0	
İrk				
	Sıklık	Yüzde	Yüzde	Kümülatif Yüzde
Tekir	18	78,3	78,3	78,3
Sarman	3	13,0	13,0	91,3
Van	2	8,7	8,7	100,0
Toplam	23	100,0	100,0	
Yaşam Şekli				
	Sıklık	Yüzde	Yüzde	Kümülatif Yüzde
Evde bakım	17	73,9	73,9	73,9
Sokak Kedisi	6	26,1	26,1	100,0
Toplam	23	100,0	100,0	
Enfeksiyon varlığı/yokluğu				
	Sıklık	Yüzde	Yüzde	Kümülatif Yüzde
FCoV	5	21,7	21,7	21,7
FeLV	13	56,5	56,5	77,9
FPV	1	4,3	4,3	0,4
Tekli enfeksiyon	6	26,1	26,1	
Toplam	23			100
Örnek Türü				
	Sıklık	Yüzde	Yüzde	Kümülatif Yüzde
Organ	2	8,7	8,7	8,7
Tam Kan	18	78,3	78,3	87,0
Serum	2	8,7	8,7	95,7
Asites sıvısı	1	4,3	4,3	100,0
Toplam	23	100,0	100,0	

4. TARTIŞMA

Besin zincirlerinde bulunan kemirgen gibi tahıl zararlılarını avlamaları vesilesiyle Milattan Önce Antik Mısırlılar tarafından evcilleştirilen kediler, günümüzde de insanla aynı habitatı paylaşabilir hale gelmiştir (Nilson ve ark., 2022). Pet hayvancılığının dikkate değer oranda artışı ile klinik Veteriner Hekimliğin odağı olması da bu birlikteliğin doğal bir sonucudur. Ülkemizde devam eden kimliklendirme faaliyetleri ile yaklaşık 900.000 evcil kedinin kayıt altına alınması, kedilerin hayatımızdaki yerini ve önemini de ortaya koymaktadır (T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Erişim tarihi: 01/12/2022).

İnsanlarla birlikte aynı yaşam alanını paylaşan *felidae* türünü etkileyen viral enfeksiyonlar, giderek artan oranda bilimsel araştırmaların konusunu oluşturmaktadır. Bu viral enfeksiyonlara 2018 yılında eklenen novel DCH enfeksiyonu (Aghazadeh ve ark., 2018), dünyanın farklı bölgelerinde rapor edilmiş ve yaygınlığı ile Veteriner Viroloji alanında dikkat çekmiştir.

Bu tez çalışmasının ilk hedefi, ülkemizdeki kedilerde DCH enfeksiyonunun mevcut olup olmadığının araştırılması olup, 550 kediye ait toplam 654 örnekten (tam kan/serum/organ/asites) 23'ü Hepadnavirus nükleik asiti yönünden pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada tespit edilen DCH pozitiflik oranı %4,18 olup, 13 pozitif örneğin tam genomik (3184 bp) karakterizasyonları yapılmıştır. Geri kalan pozitif örneklerin de kısmi gen dizinleri elde edilmiş olup, tüm dizinler için GenBank'tan accession numaraları alınmıştır. Ayrıca, pozitiflik saptanan kedilere ait anamnez bilgileri ışığında DCH enfeksiyonunun ülkemizdeki (Ankara, İzmir, Balıkesir, Elazığ, Çankırı, Kastamonu, Erzurum ve İstanbul illeri) kedilerde yaş, ırk, cinsiyet, klinik bulgular, bazı diğer viral enfeksiyonların varlığı/yokluğu gibi parametreler yönünden istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapılmıştır. Elde edilen dizinler, dünyadaki hemcinsleri ile karşılaştırılmış olup, filogenetik analiz sonucunda tüm pozitif örneklerin *Orthohepadnavirus* genusundaki hem cinsleri ile aynı kümede lokalize oldukları tespit edilmiştir. Aminoasit düzeyinde farklılık/benzerlik oranları

analiz edilen Türkiye orijinli örneklerin bazılarının, Avrupa suşları ile yakın ilişkili oldukları tespit edilmiştir. Ülkemizdeki kedilerde DCH enfeksiyonunun varlığı ve bu enfeksiyona neden olan virusların moleküler karakterizasyonuna ait çalışmanın yürütüldüğü zaman diliminde herhangi literatür veriye rastlanmamış olması nedeniyle özgün sonuçları içeren bu doktora tezi kapsamında elde edilen bulgular, literatür eşliğinde aşağıda tartışılmıştır.

Dünyanın farklı bölgelerinde DCH ile ilgili yapılan çalışmalar, genellikle tam kan ve serum örneklerinde rapor edilmiş olup, enfeksiyon prevalansının %0,20 ila %12,4 arasında değiştiği bildirilmiştir (Aghazadeh ve ark., 2018; Anpuanandam ve ark., 2021; Capozza ve ark., 2023; Fruci ve ark., 2022; Jeanes ve ark., 2021; Lanave ve ark., 2019; Piewbang ve ark., 2020; Scavone ve ark., 2022; Stone ve ark., 2022; Takahashi ve ark., 2022). DCH enfeksiyonunun organ örneklerinde araştırıldığı 3 çalışmadan dört farklı ülke (Yeni Zelanda, Avustralya, UK, ABD) orijinli örneklerin kullanıldığı bir çalışmada, kronik hepatitli kedilerde %43 ve karaciğer karsinomlu kedilerde %28 pozitiflik saptanmıştır (Pesavento ve ark., 2019). Malezya ve Tayland'da yapılan iki çalışmada, karaciğer örneklerindeki DCH prevalansı sırasıyla %14,9 ve %20 olarak rapor edilmiştir (Anpuanandam ve ark., 2021; Piewbang ve ark., 2020). Literatür bilgide, asites sıvısında DCH nükleik asitinin tespit edildiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu doktora tezi kapsamında dört farklı örnek çeşidi kullanılarak laboratuvar tanı gerçekleştirilmiş olup, 498 tam kan ve 104 kan serumu örneği kullanılmıştır. Tam kan örneklerinin 18'inde DCH nükleik asiti pozitifliği tespit edilirken, kan serumu örneklerinde 2 pozitiflik bulunmuştur. Hem serum ve hem de tam kan örneklerinde aynı anda pozitiflik belirlenmemiş olup, araştırılan kan örneklerinin toplam 20 adedinin DCH nükleik asidini içerdiği tespit edilmiştir. Laboratuvar tanıda, tam kan ve serum örneklerinin kullanımının önemini bu çalışmada değerlendirmek mümkün olamasa da canlı hayvanlardan alınacak laboratuvar tanı materyali olarak kan örneklerinin kullanılabileceği literatür bilgiyle (Jeanes ve ark., 2021; Stone ve ark., 2022; Takahashi ve ark., 2022) uyumlu bulunmuştur. Serum örneğinin tek başına tanıda kullanılmasının yetersiz kalabileceği, serum örneği yanısıra tam kan örneğinin de seçilmesinin, DCH enfeksiyonunun tanısında önem arz ettiği kanaatine varılmıştır. DCH virusunun

intrase  ller olgunlaşması ile ilgili bir çalışmada (Piewbang ve ark., 2020) karaciğerdeki virus y  k nden daha fazla bir viral y  k n akciğer ve böbrekte olduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasında sistemik bir organ  rne i alınması mümkün olamamıştır. Alınan organ örnekleri, tek bir numune kabında g nderildi inden dolayı, DCH nükleik asit tanısı organ kokteyli yapılarak gerçekleştirilmiştir. Organ  rne i alınan 50 kediden 2'sinde DCH nükleik asiti pozitifliği belirlenmiştir. Asites klinik bulgulu 2 kediden, sadece asites sıvısı gönderilmiş ve kan  rne i alınamamıştır. Gönderilen sıvılardan birinde DCH nükleik asiti varlığı belirlenmiştir.  rnek çeşidine göre bir değerlendirme yapmaya imkân sağlayacak sayıda materyal olmamasına rağmen, organ ve asites sıvısındaki pozitiflikler dikkate alındığında, laboratuvar tanıda kullanılacak tanı materyali seçiminin önemli olduğu kanaatine varılmıştır. Bu bağlamda, örnek çeşitliliğinin DCH laboratuvar tanısına etkisinin değerlendirilmesine yönelik çalışmaların yapılması önerilmektedir. Bu doktora tez çalışmasında, DCH enfeksiyonu tanısında tam kan  rne i  ne çıkmakla birlikte, klinik bulgu olarak asites varlığında asites sıvısından da DCH nükleik asitinin taranması önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

DCH enfeksiyonunun pozitiflik tespit edilen kedilerin yaşlarına göre dağılımı değerlendirildiğinde, bu çalışmada enfeksiyonun görülme sıklığının 2 yaş ve altındaki hayvanlarda yüksek olduğu (%65,2) belirlenmiştir. Enfeksiyon yönünden yaş faktörünün de erlendirildi i çeşitli   kelere ait çalışmalarda, DCH'nin 2 yaştan büyük hayvanlarda yüksek oranda görülebildiği (Anpuanandam ve ark., 2021), 4-7 aylık hayvanlarda sıklıkla bulunabildiği (Lanave ve ark., 2019) ve 1 yaşından k  k hayvanlarda görüldüğü (Fruci ve ark., 2021) ile ilgili raporlar bulunmaktadır. Sonuçlarımız, enfeksiyonun 2 yaş altındaki kedilerde daha yaygın olduğunu belirten bir  alışma (Jeanes ve ark., 2021) ile uyumlu bulunmuştur. Hepadnavirus enfeksiyonlarının anneden vertikal nakil yoluyla yavruya geçebileceği göz önüne alındığında, perinatal dönemde bulaş olasılığına dikkat çekmektedir. Bu durum, perinatal veya erken çocukluk döneminde HBV ile enfekte olmuş insanların yaklaşık %95'inde görülmektedir (Lavanchy ve ark., 2004; Liaw ve ark., 2009). Bu bağlamda, kedilerde de DCH yönünden erken yaşta pozitiflik görülme oranlarındaki sıklı ın,

prenatal ya da perinatal bulaş sonucu ortaya çıkabileceği ihtimali göz ardı edilmemelidir.

Enfeksiyon ile cinsiyet arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde, netlik kazanmamakla birlikte, erkek kedilerde daha yaygın gözleendiği sonucuna ulaşan raporlar (Anpuanandam ve ark., 2021; Lanave ve ark., 2019; Scavone ve ark., 2022) bulunmaktadır. Doktora tezinde, DCH enfeksiyonu yönünden pozitif bulunan örneklerin 13'ü (%56,5) erkek, 10'u (%43,5) dişi kedir. Erkek kedilerde daha yüksek pozitiflik saptanmış olmakla birlikte, tez kapsamında DCH enfeksiyonu yönünden az sayıda pozitiflik elde edilmiş olması ve cinsiyet açısından birbirine yakın örnek sayısı bulunması nedeniyle erkek kedilerde dişilere oranla enfeksiyonun görülme sıklığının fazla olabileceği açısından bir genelleme yapmanın mümkün olamayacağı kanaatine varılmıştır.

DCH enfeksiyonunda ırk yatkınlığına dair tek bir çalışma bulunmakta olup, Jeanes ve ark. (2021) tarafından yapılan bu çalışmada, enfeksiyona yakalanan iki kedinin de "Domestic shorthair" olarak adlandırılan kısa tüylü kediler olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışma kapsamında örneklenen, DCH virusu ile enfekte kedilerin ırk özellikleri değerlendirildiğinde, pozitif örneklerin çoğunluğunun (n=18) tekir kedilerden oluştuğu (%78,3) belirlenmiştir. Bu kedilerin, sokaktan sahiplenilmesi sonrası evde bakılmakta oldukları, başka kedilerle önceki yaşam habitatlarında temasta bulundukları gerçeğinden hareketle, ırksal bir yatkınlık konusunda kesin kanıya ulaşma ihtimalini ortadan kaldırmaktadır. DCH enfeksiyonunda kedi ırkları yönünden bir yatkınlık olup olmadığı hakkında fikir sahibi olunabilmesi için, farklı ırklardan kedilerin dahil edildiği çalışmalara ihtiyaç olduğu görüşüne varılmış olmakla birlikte, çalışmamızdaki tekir kedilerde gözlenen enfeksiyon sıklığının dikkat çekici olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada, DCH yönünden pozitif bulunan kedilerin çoğunluğu (%73,9) ev ortamında beslenen kedilerdir. Elde edilen bu sonuç, Anpuanandam ve ark. (2021) tarafından yapılan evde bakılan kedilerde, barınak kedilerine kıyasla daha yüksek DCH pozitifliği olduğu hipotezini ortaya koyan çalışma ile uyumludur. Ancak, bu

tez çalışmasında pozitiflik tespit edilen kedilerin çoğunluğunun hayatlarının bir aşamasında sokak geçmişi bulunmaktadır. Her ne kadar örnekleme döneminde evde beslenmekte olsalar da sokaktan sahiplenilmiş hayvan popülasyonunun yüksek oluşu nedeniyle bakım şartlarının DCH enfeksiyonuna olası etkisi hakkında daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır.

DCH pozitifliği belirlenen kedilerde bazı klinik bulgular bildirilmiştir. Üveitis, evcil kedi hepadnavirusu yönünden pozitif kedilerde rapor edilen semptomlardan biridir (Jeanes ve ark., 2021). Bu tez çalışmasında örneklenen kedilerin hiçbirinde üveitis semptomu bulunmamakla birlikte, DCH enfeksiyonu yönünden pozitif olduğu tespit edilen 3 kedide mikrooftalmi, gözün ekstirpasyonu ve göz lezyonları olduğu bilgileri kaydedilmiştir. Bu sonuçlar, rapor edilen çalışma (Jeanes ve ark., 2021) ile paralellik göstermekte olup, göz lezyonu bulunan kedilerde sıklıkla şüphelenilen diğer enfeksiyonlara (Herpesvirus, Retroviral enfeksiyonlar, vb.) ek olarak, DCH enfeksiyonu yönünden de taramaların yapılmasının eklenmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

Bu çalışma kapsamında kaydedilen klinik bulgulardan en dikkat çeken, inkoordinasyondur. Örneklenen kedilerden 2 tanesinde (TR-03-OQ130240 ve TR-07-OQ130241) gözlenen bu bulgu, sistemik enfeksiyonun bir kanıtı olarak da sunulan Hepadnavirusların ekstra hepatik dokuları enfekte edebileceğini kanıtlayan Piewbang ve ark. (2020)'nın enfekte kedilerin beyin hücrelerinde immunhistokimyasal olarak DCH tespiti yaptıkları çalışma ile uyumlu bulunmuştur. TR-03 nolu DCH pozitifliği saptanan kedinin hipertrofik kardiyomiyopati tanısı ve tromboz oluşumu sebebiyle kalp ameliyatı geçirdiği ve bir süre yaşadktan sonra öldüğü sahibi tarafından bildirilmiştir. TR-07 nolu DCH pozitif kedide de inkoordinasyona ek olarak göz lezyonları bulunduğu anamnez bulgusu olarak belirtilmiştir. İnsanlarda kronik Hepadnavirus enfeksiyonlarında subklinik seyir bilinmekte olup, enfekte bireylerde kronik asemptomatik yüzey antijeni taşıyıcılığının bulunduğu rapor edilmektedir (Wang ve ark., 2019). Bu tez çalışmasında elde edilen veriler ışığında, kedilerde DCH enfeksiyonunun kliniği yönünden farklı bir durumun söz konusu olabileceği, ekstrahepatik dokulara tropizm

konularının araştırılması ve veteriner klinisyenlerde farkındalık oluşturulması adına bu klinik bulguların not edilmesinin önemli olabileceği kanaatine varılmıştır.

Klinik bulgulu kedilere ek olarak, herhangi semptom göstermeyen, yalnızca rutin muayene ve aşılama amacıyla kan değerleri araştırılan veya cerrahi operasyon nedeniyle takip edilen kediler de bu tez çalışması kapsamında örneklemeye dahil edilmiş olup, herhangi klinik bulgu göstermeyen 3 kedide DCH nükleik asiti pozitif bulunmuştur. Bu bağlamda, insan Hepadnavirus enfeksiyonlarındaki asemptomatik seyir şeklinin, sağlıklı görünümlü kediler için de mümkün olabileceği sonucuna varılmıştır. Kan transfüzyonunda donör olarak kullanılacak kedilerin DCH enfeksiyonu yönünden taranması gerekliliğini ortaya koyan Lanave ve ark. (2019)'nın çalışmasına paralel olarak, ülkemizdeki kedilerde yapılacak kan transfüzyonu çalışmalarında da bu konunun dikkate alınması önerilmektedir.

Hepatotrop virüslardan olan Hepadnavirüsler, hepatitis aynısıra hepatosellüler karsinomaya sebep olmaktadır. Bu bağlamda, DCH pozitifliği saptanan kedilerde de karaciğer hastalıklarıyla ilişkilendirmeler yapılmış olup, immunhistokimyasal metotlar kullanılarak karaciğer tutulumu gösterilmiştir (Pesavento ve ark., 2019; Piewbang ve ark., 2020). Bu tez çalışması kapsamında, hepatik lipidoz tanısı konulmuş 6 yaşlı bir kedide ALT, kreatin kinaz, HGB ve HCT seviyelerinde yükseklik tespit edilmiştir. Bu kedi, hem DCH hem de FeLV enfeksiyonları yönünden pozitif bulunmuştur.

Bilindiği gibi klinik uygulamalarda hemogram tablosunda, referans aralığın dışındaki kan değerleri enfeksiyon tespitinde yol gösterici rol oynar. Hepatit enfeksiyonlarında, sıklıkla karaciğer fonksiyon testlerine tanı aşamasında başvurulmaktadır. Hepatosellüler hasar durumunda yükselen ALT, AST ve ALP seviyelerinin yüksekliği, DCH enfeksiyonu tespit edilen kedilerde de dikkat çekmektedir (Anpuanandam ve ark., 2021; Scanove ve ark., 2022). ALT değeri yüksek ve mast hücresi tümörü teşhisi konulan erkek bir kedinin DCH nükleik asiti yönünden pozitif olduğu rapor edilmiştir (Takahashi ve ark., 2022). Bu tez çalışması kapsamında örneklenen ve DCH pozitif olduğu tespit edilen 7 adet kedinin kan

değerleri incelendiğinde ALT seviyelerinin yüksek olduğu görüldü. Bu kedilerden 6 tanesinin AST seviyesinde de yükseklik olduğu kayıt altına alındı (Ek-2, Çizelge 4.1.). Ayrıca, 3 kedide ALP değerinin referans aralığının üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Trombositopeni tablosu hepadnavirusla enfekte kedilerde daha önce rapor edilmemiş olmakla birlikte, bu tez kapsamında 8 kedinin düşük trombosit değerlerine sahip olması dikkat çekici bulunmuştur. Genellikle kalp, beyin ve iskelet kasındaki hasarların belirlenmesine yardımcı olan yüksek CK seviyelerinin (Kaste ve ark., 1981; Roberts ve ark., 1975) 5 kedide tespiti de önemli bulunmuştur. Bu 5 kedinin anamnezleri incelendiğinde kas hasarına sebebiyet verecek bir durum olmadığı görülmüştür. Hepadnavirus enfeksiyonlarının kalbe ve beyne olan olası etkileri merak uyandırmakta olup, hemogram tablosunun ve anılan parametrelerin değerlendirilmesinin klinisyenlerde DCH enfeksiyonu laboratuvar tanısı talebi yönünden farkındalık yaratması açısından önemli olduğu kanaatine varılmıştır.

Asites sıvısı, genellikle FCoV enfeksiyonunu akla getiren bir klinik bulgu olup, DCH tanısı amacıyla asites sıvısının kullanıldığı bir literatür veriye rastlanmamıştır. Bu çalışma kapsamında örneklenen 2 kediye ait asites sıvısından yapılan tanıda örneklerden biri DCH nükleik asiti yönünden pozitif bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşılabilmesi için daha fazla sayıda asites sıvısı DCH test sonucuna ihtiyaç olmakla birlikte, veteriner kliniklerinde FCoV enfeksiyonu şüpheli olgularda, asites sıvısının DCH yönünden de değerlendirilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

Hepatit B enfeksiyonlarında immunsupresyon sonucu, enfeksiyonun sekonder etkenlerle komplikasyon ihtimalinin arttığı ve klinik bulguların ortaya çıkmasında rol oynayan önemli bir faktör olduğu rapor edilmiştir (Lok ve ark., 2009). Özellikle ko-enfeksiyonun gözlemlendiği komplike vakalarda, FIV ve FeLV gibi immun sistemi baskılayan Retroviruslar klinik tabloyu ağırlaştırarak, DCH prevalansının yükselmesine aracılık ettiği bildirilmiştir (Anpuanandam ve ark., 2021). Benzer bir tablo, bu çalışma kapsamında DCH pozitifliği belirlenen kedilerde de görülmüştür. DCH pozitif 13 kedinin, aynı zamanda FeLV ile enfekte olduğu tespit edilmiştir. DCH pozitif kedilerdeki FeLV ile yüksek orandaki (%56,52) pozitiflik dikkat çekici

bulunmuştur. Hepadnavirus enfeksiyonunu taşıyan kedilerde sıklıkla rapor edilen FIV enfeksiyonu (Aghazadeh ve ark., 2018; Anpuanandam ve ark., 2021; Lanave ve ark., 2019; Piewbang ve ark., 2020), bu tez çalışması kapsamındaki DCH pozitif kedilerde tespit edilmemiştir. Elde edilen bu sonucun, FIV enfeksiyonunun ülkemizdeki kedilerde görülme sıklığının az oluşuyla (Koç ve Oğuzoğlu, 2020; Oğuzoğlu ve ark., 2013) ve aşılama programlarında yer almayan bir enfeksiyon oluşuyla ilişkili olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

DCH ile ko-enfeksiyon durumunda Feline Coronavirus'un (FCoV) rolünü sorgulayan Jeanes ve ark. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, DCH enfekte kedilerde FCoV pozitifliğine de rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında, DCH pozitifliği tespit edilen 23 kedi örneğinin 5'inde (%21,7) eş zamanlı FCoV pozitifliği bulunmuş olup, başka hastalıklar için tanımlanan klinik bulguların varlığında ko-enfeksiyonlar arasında DCH'nin de araştırılmasının hem veteriner hekimlere hem de literatüre katkı sağlayacağı kanaatine varılmıştır. Her ne kadar Retrovirus ko-enfeksiyonlarına oranla DCH enfekte kedilerde FCoV enfeksiyonu düşük oranda bulunmuş olsa da immunsupressif önemli bir ajan olan CoV'ların da çoklu enfeksiyon yönünden göz ardı edilememesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

DCH nükleik asiti yönünden pozitif bulunan 8 kedide, kusma, iştah kaybı ve halsizlik semptomları (%34,78) kayıt altına alındı. Bahsedilen genel klinik semptomların kliniğe getirilen kedilerde gözlenmesi durumunda, veteriner klinisyenlere farkındalık oluşturulmasının önemli olabileceği düşünülmüştür.

Bu doktora tezi kapsamında elde edilen 23 DCH pozitif örneğin tümü, filogenetik analizler sonucunda *Orthohepadnavirus* genusundaki hem cinsleri ile aynı kümede yer almıştır. DCH viral genomunun 4 gen bölgesine (polimeraz, surface, X, core) yönelik gerçekleştirilen analizler sonucunda, ülkemiz orijinli DCH suşlarının birbirlerine göre nükleotid farklılıklarının en yoğun surface (%83,1-85,9) gen bölgesinde olduğu, bu bölgeyi core gen bölgesi (%85,9-97,9), pol (%93,3-99,1) ve X (%95,4-99,6) gen bölgelerinin takip ettiği tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında pozitif bulunan ülkemiz orijinli DCH suşlarının tüm genom (n=13) karşılaştırmasında Avrupa ve ABD orijinli örneklerle daha yakın ilişkide oldukları gözlenmiştir.

Ülkemiz orijinli DCH pozitifliklerin filogenetik analizlerinde Core gen bölgesi yönünden 21 adet, Surface gen bölgesi yönünden 18 adet, Pol ve X gen bölgeleri yönünden 17 adet örnek karşılaştırılmıştır. Polimeraz, Surface ve X gen bölgelerinin filogenetik analizlerinde, örneklerimizin İtalya, Avustralya ve ABD orijinli örneklerin yanı sıra Asya orijinli örneklerle de benzer olduğu belirlenmiştir. Core gen bölgesindeki farklılıkların daha az olduğu ve filogenetik analizlerde bu bölgedeki çeşitliliğin daha kısıtlı kaldığı dikkati çekmiştir.

Tüm genoma yönelik aminoasit tablosuna bakıldığında (Şekil 3.8.), özellikle Surface ve Polimeraz gen bölgelerinde yoğun olmak üzere TR-SV-15 örneğinde farklılıklar gözlenmiştir. Ayrıca ON293153 accession numaralı TR-SV-15 örneğinin, diğer tüm genomlardan da daha uzun olduğu (3195 bp) belirlenmiştir (Çizelge 3.3.). TR-SV-15 nolu örneğin, nükleotid homolojileri Hepadnavirusların 4 farklı gen bölgesi yönünden de ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Bu çalışmada tüm genomlar arası farklılıkların en az olduğu X gen bölgesinde bile, TR-SV-15 nolu örnekle diğer Türkiye orijinli DCH pozitif örnekler arasında %86,6-96,7 değişen oranlarda nükleotid benzerliği olduğu tespit edilmiştir. Capozza ve ark. (2023) DCH etkenlerini iki farklı genotipte (A ve B) ve Genotip A DCH etkenlerini de 2 farklı sınıfta (Clade A1 ve A2) inceledikleri çalışmalarında, %8 oranındaki nükleotid farklılığının bazı suşların patogenezisinde değişim meydana getirebileceğini rapor etmiştir. Ayrıca, bu durumun, bu hastalıkla ilgili tedavi seçeneği sunmak adına yeni terapötiklerin kullanımı açısından da dikkate alınması gerektiği de vurgulanmaktadır. Capozza ve ark.'nın (2023) çalışmasında 12 tüm genom kullanılmış olup, ülkemiz orijinli DCH viruslarının bu şekilde genogruplandırılması için; farklı ülkelerden, daha fazla sayıda tüm genomik karakterizasyona gereksinim duyulduğu kanaatine varılmıştır. Takahashi ve ark. (2022), Japonya'ya özgü olarak tanımladıkları bir suşun (KT/116/2021), diğer ülkelerden daha önce tanımlanan DCH suşlarından genetik olarak farklı olduğunu rapor etmektedirler. Bu sonuçlar ışığında, TR-SV-15

gibi farklı suşların patogeneiz mekanizmalarının da incelenmesi gerektiği, insan Hepatit B viruslarında olduğu gibi karaciğer hasarını minimize etmek için, ilaç kullanımlı tedavi seçeneği sunmak amacıyla değerlendirmeye alınması önerilmektedir. Ayrıca homolog rekombinasyon olgusu nedeniyle evrimsel geçmişin de araştırılmasının ve kedilerde kronik hepatit olgularında DCH enfeksiyonunun etkisinin sorgulanmasının da faydalı olacağı kanaatine varılmıştır.

Orthohepadnavirus genusunda yer alan canine Hepadnaviruslarının (Diakoudi ve ark., 2022), DCH suşları ile %98'e varan benzerlik oranına sahip oldukları rapor edilmiş olup, bu tez çalışması kapsamında DCH pozitif bulunan örnekler de köpek hepadnavirusu ile aynı kümede yer almıştır. Sonuçlarımız bu çalışma ile uyumlu bulunmuş olup, köpeklerde hepatosellüler dokuya yönelik hastalık şüphesinde canine orijinli Hepadnavirusların da araştırılması önerilmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Evcil Kedilerdeki Hepadnavirus (DCH) enfeksiyonunun yakın zamandaki tespiti ile yaşam habitatımızı paylaştığımız kedilerdeki bu viral enfeksiyonun araştırılmasına yönelik çalışmaların artışı, ülkemizdeki kedilerde DCH enfeksiyonunun varlığının ve yaygınlığının araştırılmasına basamak teşkil etmiştir. Bu tez çalışması kapsamında, ülkemizde kedilerde DCH enfeksiyonunun varlığı ilk kez belirlenmiş olup, enfeksiyonun yaygınlığı, hastalığa neden olan enfeksiyöz ajanın moleküler karakterizasyonu, dünyadaki hem cinsleriyle benzerlik ve farklılıklarının araştırılması, hastalığın epidemiyolojik statüsünün belirlenmesi gibi konulara temel oluşturacak verilerin eldesine imkân sağlamıştır.

- Mevcut bilgiler ışığında, DCH enfeksiyonuna yönelik ülkemizde yapılmış herhangi bir araştırma bulunmamakta olup, Türkiye’de kedilerde DCH virusunun varlığı ilk kez bu doktora tezi kapsamında tanımlanmıştır. İncelenen 550 kediye ait örneklerden 23’ü pozitif bulunmuş ve ülkemizde enfeksiyonun görülme sıklığı %4,18 olarak belirlenmiştir.

- Tespit edilen 23 pozitifliğin numune bazında dağılımına bakıldığında, 18’i tam kan, 2’si serum, 2’si organ ve 1’i asites sıvısıdır. Bu çalışma sonuçlarına göre, tanısal önemi açısından laboratuvara gönderilecek araştırma materyali olarak tam kan örnekleri önerilmekte olup, tek başına serum örneklerinin DCH tanısında yetersiz kalabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, kedilerde farklı viral enfeksiyonların patognomik klinik bulgusu olarak tanımlanan asites sıvısının da DCH yönünden araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

- Klinisyen Veteriner Hekimler açısından yeni tanınmaya başlayan bu enfeksiyonun, özellikle rutin tarama panellerine entegre edilmesinin, gerek aşılama/operasyon öncesi, gerek kan transfüzyonu gereksiniminde asemptomatik taşıyıcıların ortaya çıkarılması adına faydaları olabileceği kanaatine varılmıştır.

- Bu çalışma bulgularına göre, DCH pozitifliği saptanan kedilerin 13'ünde (%56,52) FeLV ile ko-enfeksiyon tespit edilmiştir. İmmunsupressif feline Retroviruslarla birlikte de bulunabilen DCH enfeksiyonunun, FCoV (%21,74) ve FPV (%4,3) enfeksiyonları ile de birlikteliğinin araştırılması, miks enfeksiyon durumunda ağır klinik tablo olgularında bu enfeksiyonun da göz önünde bulundurulması gerekliliği öngörümüzdür.

- Çalışma kapsamında elde edilen verilerin hastalığın oluşum mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik araştırmalara temel teşkil edebileceği kanısına varılmıştır.

- Ülkemiz orijinli *Orthohepadnavirus* genusunda yer aldığı belirlenen DCH suşlarının genomik farklılıkların Hepadnavirus genomu yönünden incelenmesinde, en yoğun farklılık gözlenen gen bölgesinden başlamak üzere Surface>Core>Pol>X olarak sıralandığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda, DCH viruslarının patogeneiz mekanizmalarının incelenmesine yönelik ileride yapılacak çalışmalarda, suşlar arasındaki genomik farklılıkların dikkate alınmasının önemli olduğu kanaatine varılmıştır.

- Çalışmamız kapsamında sentezlenen ve tüm genomun aydınlatılmasına yönelik dizayn edilen yeni primer çiftlerinin, DCH enfeksiyonunun laboratuvar tanısı ve moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılması önerilmektedir. Böylelikle, elde edilecek sonuçların DCH enfeksiyonunun evrimsel geçmişinin aydınlatılmasına yardımcı olabilecek veriler olabileceğini düşünmekteyiz.

ÖZET

Kedilerde Onkojenik Etkili Hepadnavirus Enfeksiyonlarının Epidemiyolojik Statüsünün Moleküler Metotlarla Araştırılması

Her geçen gün artan pet hayvanı besleme eğilimi, kedilerde görülen enfeksiyonların öneminin giderek artmasına sebep olmuştur. Bu bağlamda; hem insanları hem de farklı hayvan türlerini enfekte edebilme potansiyeline sahip viral etkenler öne çıkmaktadır. Bu duruma örnek oluşturan Hepadnaviridae ailesindeki etkenlerin ülkemizdeki evcil kedilerde varlığı ve yaygınlığının araştırılmasını konu alan bu doktora tezinde, nükleik asit temelli teknikler kullanılarak 550 kediden alınan örneklerden (tam kan, serum, organ, asites sıvısı) 23'ü pozitif (%4,18) bulunmuştur. Pozitiflik tespit edilen 13 örneğin tüm genomik, geri kalan 10 örneğin de parsiyel karakterizasyonu tamamlanarak, Orthohepadnavirus genusunda yer aldıkları belirlenmiştir.

Ülkemiz orijinli evcil kedi Hepadnaviruslarının dünyadaki hemcinsleri ile genetik olarak yakın oldukları ve 2 yaş altındaki kedilerde sıklıkla görülebildikleri belirlenmiştir. Erkek kedilerde dişilere oranla daha yüksek pozitiflik elde edilmiş olup, tekir ırk kedilerde enfeksiyonun görülme oranının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Hepadnavirus pozitifliği saptanan örneklerde, araştırılan viral enfeksiyonlar yönünden FeLV pozitifliğinin öne çıktığı görülmüş olup, çoklu enfeksiyon olarak FCoV enfeksiyonlarının da birlikteliği dikkat çekici bulunmuştur.

Doktora tezi kapsamında yeni dizayn edilen primerlerin, hem tanı hem de tüm genomik analizlerde değerlendirilebileceği kanaatine varılmıştır. Ülkemiz orijinli kedi Hepadnaviruslarının genomik analizinde surface proteini başta olmak üzere, sırasıyla core, pol ve x gen bölgelerinde hemcinslerine oranla farklı oldukları belirlenmiştir.

Bu çalışma, Hepadnavirus enfeksiyonlarının ülkemizdeki kedilerde varlığının ilk tespiti olup, klinisyen Veteriner Hekimler açısından farkındalık yaratılması ve atipik karaciğer hastalıklarında tanı panellerinde yer alması gereken bir enfeksiyon olarak değerlendirilmesi önerilmektedir.

Anahtar Sözcükler: Hepadnavirus, Kedi, Moleküler Karakterizasyon, Türkiye

SUMMARY

Investigation of the Epidemiological Status of Oncogenic Hepadnavirus Infections in Cats by Molecular Methods

The tendency to feed pets, which is increasing day after day, has led to the increasing importance of infections in cats. In this context; viral agents that have the potential to infect both to humans and different animal species come to the fore. In this doctoral thesis, which focuses on investigating the presence and prevalence of *Hepadnaviridae* family agents in domestic cats in our country, 23 of the samples (whole blood, serum, organ, ascites fluid) taken from 550 cats using nucleic acid-based techniques were found positive (4.18%). The whole genomic characterization of 13 positive samples and partial characterization of the remaining 10 samples were completed and they were determined to be in the genus of *Orthohepadnavirus*.

It has been determined that domestic cat Hepadnaviruses originating in our country are genetically close to their fellows in the world and can be seen frequently in cats under 2 years old. Higher positivity was obtained in male cats compared to females, and it was determined that the rate of infection was higher in tabby breed cats. It was observed that FeLV positivity stood out in terms of viral infections investigated in positive samples with Hepadnavirus. Additionally, the togetherness of FCoV infections as multiple infections was also remarkable.

It has been concluded that the newly designed primers within the scope of the doctoral dissertation can be evaluated in both diagnosis and all genomic analyzes of DCH. In the genomic analysis of the cat hepadnaviruses of our country origin, it was determined that they were different especially in the particular Surface gene region. The differentiations of surface gene region is followed by Core, Pol and X gene regions, respectively.

This study is the first detection of the presence of Hepadnavirus infections in cats in our country, and it is recommended to raise awareness for clinicians and veterinarians and to evaluate it as an infection that should be included in the diagnostic panels in atypical liver diseases.

Keywords: Cat, Hepadnavirus, Molecular Characterization, Türkiye

KAYNAKLAR

- AGHAZADEH M, SHI M, BARRS VR, MCLUCKIE AJ, LINDSAY SA, JAMESON B, BRONTE HAMPSON, HOLMES EC, BEATTY JA (2018). A Novel Hepadnavirus Identified in an Immunocompromised Domestic Cat in Australia. *Viruses*, **10**(5): 269-274.
- ANPUANANDAM K, SELVARAJA, GT, CHOY MMK, NG SW, KUMA K, ALI RM, RAJENDRAN SK, HO KL, TAN WS (2021). Molecular detection and characterisation of Domestic Cat Hepadnavirus (DCH) from blood and liver tissues of cats in Malaysia. *BMC Veterinary Research*, **17**(1): 9.
- BARTHOLOMEUSZ A, TEHAN BG, CHALMERS DK (2004) Comparisons of the HBV and HIV polymerase, and antiviral resistance mutations. *Antiviral Therapy*, **9**(2): 149-160.
- BERTING A, HAHNEN J, KROGER M, GERLICH WH (1995). Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein. *Intervirology*, **38**: 8-15.
- BOCK CT, SCHRANZ P, SCHRODER CH, ZENTGRAF H (1994) Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus genes*, **8**(3): 215-229.
- BOCK CT, SCHWINN S, LOCARNINI S, FYFE J, MANNS MP, TRAUTWEIN C, ZENTGRAF H (2001). Structural Organization of the Hepatitis B Virus Minichromosome. *Journal of Molecular Biology*, **307**(1): 183-196.
- BRUSS V (2007). Hepatitis B virus morphogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, **13**(1): 65-73.
- CAMACHO C, COULOURIS G, AVAGYAN V, MA N, PAPADOPOULOS J, BEALER K, MADDEN TL (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, **10**(1): 421.
- CAMPANELLA JJ, BITINCKA L, SMALLEY J (2003). MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics*, **4**:29.
- CAO L, WU C, SHI H, GONG Z, ZHANG E, WANG H, ZHAO K, LIU S, LI S, GAO X, WANG Y, PEI R, LU M, CHEN X (2014). Coexistence of Hepatitis B Virus Quasispecies Enhances Viral Replication and the Ability To Induce Host Antibody and Cellular Immune Responses, *Journal of Virology*, **88**(15): 8656-8666.
- CAPOZZA P, CARRAI M, CHOI YR, TU T, NEKOU EI O, LANAVE G, MARTELLA V, BEATTY JA, BARRS VR (2023). Domestic Cat Hepadnavirus: Molecular Epidemiology and Phylogeny in Cats in Hong Kong. *Viruses*, **15**(1).
- CHAI N, CHANG HE, NICOLAS E, HAN Z, JARNIK M, TAYLOR J (2008). Properties of Subviral Particles of Hepatitis B Virus. *Journal of Virology*, **82**(16): 7812-7817.

- CHISARI FV (2000). Viruses, immunity, and cancer: lessons from hepatitis B. *The American Journal of Pathology*, **156**(4): 1117-1132.
- CLARK DN, HU J (2015) Unveiling the roles of HBV polymerase for new antiviral strategies. *Future Virology*, **10**(3): 283-295.
- DETER RL, De DUVE C (1967). Influence of glucagon, an inducer of cellularautophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *Jornal of Cell Biology*, **33**(2): 437-449.
- DIAKOUDI G, CAPOZZA P, LANAVE G, PELLEGRINI F, DI MARTINO B, ELIA G, DECARO N, CAMERO M, GHERGO P, STASI F, CAVALLI A, TEMPESTA M, BARRS VR, BEATTY J, BÁNYAI K, CATELLA C, LUCENTE MS, BUONAVOGLIA A, FUSCO G, MARTELLA V (2022). A novel hepadnavirus in domestic dogs. *Scientifc Reports*, **12**: 2864.
- DREXLER JF, CORMAN VM, WEGNER T, TATENO AF, ZERBINATI RM, GLOZARAUSCH F, SEEBENS A, MULLER MA, DROSTEN C (2011) Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerging Infectious Diseases*, **17**(3): 449-456.
- FRUCI P, DI PROFIO F, PALOMBIERI A, MASSIRIO I, LANAVE G, DIAKOUDI G, PELLEGRINI F, MARSILIO F, MARTELLA V, DI MARTINO B (2022). Detection of antibodies against domestic cat hepadnavirus using baculovirus-expressed core protein. *Transboundary and Emerging Disease*, **69**(5): 2980-2986.
- GANEM D, SCHNEIDER RJ (2001). Hepadnaviridae: the viruses and their replication. In D.M Knipe & P.M. Howley (Eds.), *Fields Virology*, 2923-2969. Lippincott Williams: Wilkins, Philadelphia, USA.
- GAO W, HU J (2007) Formation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: removal of genomelinked protein. *Journal of Virology*, **81**(12): 6164-6174.
- GILBERT C, FESCHOTTE C (2010). Genomic Fossils Calibrate the Long-Term Evolution of Hepadnaviruses. *PLoS Biology*, **8**(9): e1000495.
- GLEBE D, URBAN S (2007). Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry *World Journal of Gastroenterology*, **13**(1): 22-38.
- GRIPON P, LE SEYECS J, RUMIN S, GUGUEN-GUILLOUZO C (1995). Myristylation of the Hepatitis B Virus Large Surface Protein Is Essential for Viral Infectivity. *Virology*, **213**(2): 292-299.
- HAO Z, ZHENG L, KLUWE L, HUANG W (2012). Ferritin light chain and squamous cell carcinoma antigen 1 are coreceptors for cellular attachment and entry of hepatitis B virus. *International Journal of Nanomedicine*, **7**: 827-834.
- HARTMANN K (2015). Efficacy of antiviral chemotherapy for retrovirus-infected cats: What does the current literature tell us? *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **17**: 925-939.
- HOLLINGER FB, LIANG TJ (2001) Hepatitis B Virus. In: Knipe DM *Fields Virology*, 4th ed. Philadelphia, Lippincolt Williams & Wilkins, 2971-3036.

- HU J, LIU K (2017). Complete and incomplete hepatitis B virus particles: Formation, function, and application. *Viruses*, 9(3): 56.
- HU J, SEEGER C (2015). Hepadnavirus genome replication and persistence. *Cold Spring Harbor. Perspectives in Medicine*, 5(7): a021386.
- HU Q, ZHANG F, DUAN L, WANG B, YE Y, LI P, LI D, YANG S, ZHOU L, CHEN W (2020). E-cadherin Plays a Role in Hepatitis B Virus Entry Through Affecting Glycosylated Sodium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide Distribution. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10: 74.
- INTERNATIONAL COMMITTEE OF VIRUS TAXONOMY (ICTV) (2017). 9th Report (2011, updated in 2017). Family: Hepadnaviridae. Erişim Tarihi: 30/12/2022.
- IWAMOTO M, SASO W, SUGIYAMA R, ISHII K, OHKI M, NAGAMORI S, SUZUKI R, AIZAKI H, RYO A, YUN JH, PARK SY, OHTANI N, MURAMATSU M, IWAMI S, TANAKA Y, SUREAU C, WAKITA T, WATASHI K (2019). Epidermal growth factor receptor is a host-entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(17): 8487-8492.
- JEANES EC, WEGG ML, MITCHELL JA, PRIESTNALL SL, FLEMING L, DAWSON C (2021). Comparison of the prevalence of Domestic Cat Hepadnavirus in a population of cats with uveitis and in a healthy blood donor cat population in the United Kingdom. *Veterinary Ophthalmology*, 25(2): 165-172.
- JONES SA, CLARK DN, CAO F, TAVIS JE, HU J (2014) Comparative analysis of hepatitis B virus polymerase sequences required for viral RNA binding, RNA packaging, and protein priming. *Journal of Virology*, 88(3): 564-1572.
- KASTE M, HERNESNIEMI J, SOMER H, HILLBOM M, KONTTINEN A (1981). Creatine kinase isoenzymes in acute brain injury. *Journal of Neurosurgery*, 55(4): 511-515.
- KEKULÉ A (1994). Hepatitis B virus transactivator proteins: the “trans” hypothesis of liver carcinogenesis. In C. Bre’chot, Primary liver cancer: etiological and progression factors, 191-210.
- KOÇ BT, OĞUZOĞLU TC (2020). A Phylogenetic Study of Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Among Domestic Cats in Turkey. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 73:101544.
- KONIGER C, WINGERT I, MARSMANN M, ROSLER C, BECK J, NASSAL M (2014). Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 4244-4253.
- LANAVE G, CAPOZZA P, DIAKOUDİ G, CATELLA C, CATUCCI L, GHERGO P, STASI F, BARRS V, BEATTY J, DECARO N, BUONAVOGLIA C, MARTELLA V, CAMERO M (2019). Identification of hepadnavirus in the sera of cats. *Scientific Reports*, 9(1): 10668.

- LAUBER C, SEITZ S, MATTEI S, SUH A, BECK J, HERSTEIN J, BOROLD J, SALZBURGER W, KADERALI L, BRIGGS JAG, BARTENSCHLAGER R (2017). Deciphering the origin and evolution of hepatitis B viruses by means of a family of non-enveloped fish viruses. *Cell Host and Microbe*, **22**: 387-399.
- LAVANCHY D (2004). Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *Journal of Viral Hepatitis*, **11**(2): 97-107.
- LEVRERO M, POLLICINO T, PETERSEN J, BELLONI L, RAIMONDO G, DANDRI M (2009) Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*, **51**(3): 581-592.
- LI J, LIU Y, WANG Z, LIU K, WANG Y, LIU J, DING H, YUAN Z (2011). Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment. *Journal of Virology*, **85**(13): 6319-6333.
- LIAW YF, CHU CM (2009). Hepatitis B virus infection. *The Lancet*, **14**(373): 582-592.
- LIU W, PAN S, YANG H, BAI W, SHEN Z, LIU J, XIE Y (2012). The First Full-Length Endogenous Hepadnaviruses: Identification and Analysis, *Journal of Virology*, **86**(17): 9510-9513.
- LOK A, MCMAHON BJ (2009). Chronic hepatitis B: *Hepatology*, **50**(3): 661-662.
- LUANGSAY S, ZOULIM F (2014). Structure and molecular virology. Howard C. Thomas, Anna S.F. Lok, Stephen A. Locarnini & Arie J. Zuckerman (Eds.). *Viral Hepatitis*, 65-80.
- MACOVEI A, RADULESCU C, LAZAR C, PETRESCU S, DURANTEL D, DWEK RA, ZITZMANN N, BRANZA NICHITA N (2010) Hepatitis B virus requires intact caveolin-1 function for productive infection in HepaRG cells. *Journal of Virology*, **84**(1): 243-253.
- MADALINSKI K, BURCZYNSKA B, HEERMANN KH, UY A, GERLICH WH (1991) Analysis of viral proteins in circulating immune complexes from chronic carriers of hepatitis B virus. *Clinical and Experimental Immunology*, **84**(3): 493-500.
- MAGNIUS L, MASON WS, TAYLOR J, KANN M, GLEBE D, DÉNY P, SUREAU C, NORDER H, ICTV Report Consortium (2020). ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepadnaviridae, *Journal of General Virology*, **101**(6): 571-572.
- MATHET VL, FELD M, ESPINOLA L, SÁNCHEZ DO, RUIZ V, MANDÓ O, CARBALLAL G, QUARLERI JF, D'MELLO F, HOWARD CR, OUBIÑA JR (2003). Hepatitis B virus S gene mutants in a patient with chronic active hepatitis with circulating Anti-HBs antibodies. *Journal of Medical Virology*, **69**(1): 18-26.
- MEIER A, MEHRLE S, WEISS TS, MIER W, URBAN S (2013). Myristoylated PreS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes. *Hepatology*, **58**(1): 31-42.
- MILLER RH, ROBINSON WS (1986). Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **83**(8): 2531-2535.

- MUHLEMANN B, JONES TC, DE BARROS DAMGAARD P, ALLENTOF ME, SHEVNINA I, LOGVIN A, USMANOVA E, PANYUSHKINA IP, BOLDGIV B, BAZARTSEREN T, TASHBAEVA K, MERZ V, LAU N, SMRČKA V, VOYAKIN D, KITOV E, EPIMAKHOV A, POKUTTA D, VICZE M, PRICE TD, MOISEYEV V, HANSEN AJ, ORLANDO L, RASMUSSEN S, SIKORA M, VINNER L, OSTERHAUS ADME, SMITH DJ, GLEBE D, FOUCHIER RAM, DROSTEN C, SJIGREN K, KRISTIANSEN K, WILLERSLEV E (2018). Ancient hepatitis B viruses from the Bronze age to the Medieval period. *Nature*, **557**: 418-423.
- NASSAL M (1999). Hepatitis B virus replication: novel roles for virus host interactions. *Intervirology*, **42**: 100-116.
- NEUVEUT C, WEI Y, BUENDIA MA (2010). Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *Journal of Hepatology*, **52**(4): 594-604.
- NILSON SM, GANDOLFI B, GRAHN RA, KURUSHIMA JD, LIPINSKI MJ, RANDI E, WALY NE, DRISCOLL C, MURUA ESCOBAR H, SCHUSTER RK, MARUYAMA S, LABARTHE N, CHOMEL BB, KUMAR GHOSH S, OZPINAR H, RAH HC, MILLÁN J, MENDES-DE-ALMEIDA F, LEVY JK, HEITZ E, SCHERK MA, ALVES PC, DECKER JE, LYONS LA (2022). Genetics of randomly bred cats support the cradle of cat domestication being in the Near East. *The Genetic Society*, **129**(6): 346-355.
- OĞUZOĞLU TÇ, MUZ D, TIMURKAN MO, MARAL N, GURCAN IS (2013). Prevalences Of Feline Coronavirus (FCoV), Feline Leukaemia Virus (FeLV), Feline Immunodeficiency Virus (FIV) And Feline Parvovirus (FPV) Among Domestic Cats in Ankara, Turkey. *Revue de Medecine Veterinaire*, **164**(11): 511-516.
- PATERLINI-BRECHOT P, SAIGO K, MURAKAMI Y, CHAMI M, GOZUACIK D, MUGNIER C, LAGORCE D, BRÉCHOT C (2003). Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene*, **22**(25): 3911-3916.
- PESAVENTO PA, JACKSON K, SCASE T, TSE T, HAMPSON B, MUNDAY JS, BARRS VR, BEATTY JA (2019). A Novel Hepadnavirus is Associated with Chronic Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma in Cats. *Viruses*, **11**(10): 969.
- PIEWBANG C, WARDHANI SW, CHAIYASAK S, YOSTAWONKUL J, CHAI-IN P, BOONRUNGSIMAN S, KASANTIKUL T, TECHANGAMSUWAN S (2020). Insights into the genetic diversity, recombination, and systemic infections with evidence of intracellular maturation of hepadnavirus in cats. *PLoS One*, **15**(10): e0241212.
- PUTRI WA, YANO Y, YAMANI LN, LIANG Y, MARDIAN Y, UTSUMI T, SOETJIPTO S, LUSIDA MI, HAYASHI Y (2019). Association between quasispecies variants of hepatitis B virus, as detected by high-throughput sequencing, and progression of advanced liver disease in Indonesian patients. *Molecular Medicine Reports*, **20**(1):16-24.
- RALL LB, STANDRING DN, LAUB O, RUTTER WJ (1983). Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II. *Molecular and Cellular Biology*, **3**(10):1766-1773.

- ROBERTS R, GOWDA KS, LUDBROOK PA, SOBEL BE (1975). Specificity of elevated serum MB creatine phosphokinase activity in the diagnosis of acute myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology*, **36**(4): 433-437.
- SALPINI R, BATTISTI A, COLAGROSSI L, DI CARLO D, FABENI L, PIERMATTEO L, CERVA C, LICHTNER M, MASTROIANNI C, MARIGNANI M, MAYLIN S, DELAUGERRE C, MORISCO F, COPPOLA N, MARRONE A, ANGELICO M, SARMATI L, ANDREONI M, PERNO CF, CECCHERINI-SILBERSTEIN F, SVICHER V (2019). A snapshot of virological presentation and outcome of immunosuppression-driven HBV reactivation from real clinical practice: evidence of a relevant risk of death and evolution from silent to chronic infection. *Journal of Viral Hepatitis*, **26**: 846-855.
- SAMBROOK J, RUSSELL DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SCAVONE D, LAUZI S, STRANIERI A, TRAMONTANO G, RATTI G, PALTRNIERI S (2022). Evaluating the presence of domestic cat hepadnavirus viraemia in cats with biochemical alterations suggestive of liver disease. *Veterinary Record*, **191**(4): e1626.
- SCHUTZ T, KAIRAT A, SCHRODER CH (1996). DNA Sequence Requirements for the Activation of a CATAAA Polyadenylation Signal within the Hepatitis B Virus X Reading Frame: Rapid Detection of Truncated Transcripts. *Virology*, **223**(2): 401-405.
- SEEGER C, ZOULIM F, MASON WS (2013). In *Fields Virology* (eds Knipe, D. M. & Howley, P. M.) 2185-2221 (Lippincott Williams & Wilkins, 2013).
- SHIN GC, KANG HS, LEE AR, KIM KH (2016). Hepatitis B virus-triggered autophagy targets TNFRSF10B/death receptor 5 for degradation to limit TNFSF10/TRAIL response. *Autophagy*, **12**(12): 2451-2466.
- SHIN YC, PARK S, RYU WS (2011). A conserved arginine residue in the terminal protein domain of hepatitis B virus polymerase is critical for RNA pre-genome encapsidation. *Journal of General Virology*, **92**(8): 1809-1816.
- SHOFA M, OHKAWA A, KANEKO Y, SAITO A (2023). Conserved use of the sodium/bile acid cotransporter (NTCP) as an entry receptor by hepatitis B virus and domestic cat hepadnavirus. *BioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2023.02.04.527117>.
- STONE C, PETCH R, GAGNE RB, NEHRING M, TU T, BEATTY JA, VANDEWOUDE S (2022). Prevalence and Genomic Sequence Analysis of Domestic Cat Hepadnavirus in the United States, *Viruses*, **14**(10): 2091.
- STUYVER LJ, LOCARNINI SA, LOK A, RICHMAN DD, CARMAN WF, DIENSTAG JL, SCHINAZI RF (2001). Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology*, **33**(3): 751-757.
- TAKAHASHI K, KANEKO Y, SHIBANAI A, YAMAMOTO S, KATAGIRI A, OSUGA T, INOUE Y, KURODA K, TANABE M, OKABAYASHI T, NAGANOBU K, MINOBE I, SAITO A (2022). Identification of domestic cat hepadnavirus from a cat blood sample in Japan. *Virology*, **84**(5): 648-652.

- TANG H, DA L, MAO Y, LI Y, LI D, XU Z, LI F, WANG Y, TIOLLAIS P, LI T, ZHAO M (2009). Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via up-regulation of beclin 1 expression. *Hepatology*, **49**(1): 60-71.
- TAVIS J, GANEM D (1996). Evidence for activation of the hepatitis B virus polymerase by binding of its RNA template. *Journal of Virology*, **70**(9): 5741-5750.
- T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI (2022). Erişim Adresi: [<https://www.tarimorman.gov.tr/Sayfalar/Arsiv.aspx?Liste=Haber>]. Erişim Tarihi: 1/12/2022.
- TU T, BUDZINSKA MA, SHACKEL NA, URBAN S (2017). HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Viruses*, **9**(4): 75.
- TUTTLEMAN JS, POURCEL C, SUMMERS J (1986). Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell*, **47**(3): 451-460.
- URBAN S, SCHULZE A, DANDRI M, PETERSEN J (2010). The replication cycle of hepatitis B virüs. *Journal of Hepatology*, **52**(2): 282-284.
- VALAYDON ZS, LOCARNINI SA (2017). The virological aspects of hepatitis B. *Best Practice&Research Clinical Gastroenterology*, **31**(3): 257-264.
- VANLANDSCHOOT P, LEROUX-ROELS G (2003). Viral apoptotic mimicry: an immune evasion strategy developed by the hepatitis B virus? *Trends Immunology*, **24**(3): 144-147.
- WANG B, YANG XL, LI W, ZHU Y, GE XY, ZHANG LB, ZHANG YZ, BOCK CT, SHI ZL (2017). Detection and genome characterization of four novel bat hepadnaviruses and a hepevirus in china. *Virology Journal*, **14**(1): 40.
- WANG T, CUI D, CHEN S, XU X, SUN C, DAI Y, CHENG J (2019). Analysis of clinical characteristics and S gene sequences in chronic asymptomatic HBV carriers with low-level HBsAg. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, **43**(2): 179-189.
- WOODDELL CI, YUEN MF, CHAN HL, GISH RG, LOCARNINI SA, CHAVEZ D, FERRARI C, GIVEN BD, HAMILTON J, KANNER SB, I CL, LAU JYN, SCHLUEP T, XU Z, LANFORD R, LEWIS DL (2017). RNAi-based treatment of chronically infected patients and chimpanzees reveals that integrated hepatitis B virus DNA is a source of HBsAg. *Science Translational Medicine*, **9**(409): eaan0241.
- XU Z, BRUSS V, YEN TS (1997). Formation of intracellular particles by hepatitis B virus large surface protein. *Journal Virology*, **71**(7): 5487-5494.
- ZHAO XL, YANG J, LIN SZ, MA H, GUO F, YANG RF, ZHANG HH, HAN JC, WEI L, PAN XB (2015). Serum viral duplex-linear DNA proportion increases with the progression of liver disease in patients infected with HBV. *Gut*, **65**: 502-511.

EKLER

Ek-1 Etik kurul raporu

ANKARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ : 22/07/2020
TOPLANTI NO : 2020-13
DOSYA NO : 2020-90
KARAR NO : 2020-13-111

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Tuba Çiğdem OĞUZÖĞLU'nun yaptığı; araştırmacı olarak Ece ADIGÜZEL'in katıldığı "Kedilerde Onkojenik Etkili Hepadnavirus Enfeksiyonlarının Epidemiyolojik Statüsünün Moleküler Metodlarla Araştırılması" başlıklı çalışma Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğin "2 (2) b" maddesi kapsamında değerlendirilmiş ve söz konusu çalışmanın Etik Kurul iznine tabi olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Geçerlilik Süresi : 01/10/2020-01/10/2022

Prof.Dr.M.Taner KARAÖĞLU
A.Ü. HADYEK Başkanı

Ek-2.

Çizelge. DCH pozitif bulunan bazı örneklere ait hemogram çizelgesi.

Örnek Adı	ALT (0-50,0)	AST (0-40,0)	ALP (0-70,0)	Üre (41,80-64,20)	CK (0,00-130,0)	GGT (6,0-28,0)	HGB (8,0-15,0)	HCT (25,0-45,0)	MCH (12,50-17,50)	MCHC (31,0-38,50)	PLT (200,0-500,0)	RDW _a (20,0-35,0)
TR-07	97,00	65,00	-	-	258,00	10,0	4,0	12,6	-	-	14,0	-
TR-61	1236,00	491,00	448,00	19,60	-	1,00	18,20	45,90	18,10	39,60	96,00	23,60
TR-131	-	1140,42		133,50	>2000,0	-	-	-	17,40	37,80	61,00	23,30
TR-192	-	-	-	-	227,00	-	-	-	-	-	-	-
TR-296	221,51	24,00	37,76	46,60	195,00	0,42	15,80	47,10	17,10	33,70	172,00	25,30
TR-382	-	-	-	-	-	-	16,30	47,50	14,30	34,30	91,00	14,20
TR-404	44,00		88,00	51,00	182,0	-	-	-	38,40	16,80	-	17,60
TR-409	53,00	77,00	72,00	-	-	-	15,20	-	18,30	38,30	29,00	25,00
TR-428	-	-	-	-	151,0	-	-	23,30	14,50	34,90	39,00	20,70
TR-453	56,50	32,00	15,00	48,00	252,00	0,23	-	-	-	-	-	-
TR-503	176,60	40,40	57,00	33,00	-	1,0	13,40	38,10	14,30	35,10	275,00	20,40
TR-744	-	-	-	-	-	-	-	31,00	14,00	33,20	-	-
TR-27-02	138	126	-	-	-	-	-	34,4	15,1	41,7	165	-

Ek-3.

Çizelge. DCH pozitif örneklerin ekstraktlarındaki DNA miktarı.

<u>Örnek No</u>	<u>DNA miktarı</u>
TR-SV8	398,7
TR-SV15	372,4
TR-03-PEY	254,2
TR-07	245,9
TR-55	198,8
TR-61	196,8
TR-68	369,5
TR-131	354,8
TR-177	192,8
TR-185	221,8
TR-192	226,9
TR-275	169,8
TR-288	199,8
TR-296	274,9
TR-382	206,4
TR-404	324,3
TR-409	211,6
TR-428	236,7
TR-453	321,1
TR-503	314,8
TR-744	159,8
TR-27-02	288,7
TR-ASC1	205,8

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: Ece

Soyadı: ADIGÜZEL

İletişim Adresi ve Telefonu: T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Atkaracalar
İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü

II. Eğitimi

2013-2018: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (Ankara)

2009-2013: Yahya Kemal Beyatlı Anadolu Lisesi (Ankara)

2001-2009: Refika Aksoy İlköğretim Okulu (Ankara)

Yabancı Dili: İngilizce

III. Ünvanları

2018: Veteriner Hekim

IV. Mesleki Deneyimi

2020-halen: Çankırı Atkaracalar İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü

V. Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları

- Detection and characterisation of sheep-associated malignant catarrhal fever infection from ruminants by using tegument and gB gene sequences of OvHV-2 (2020) *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **87**:1
- How do viruses use oxidative stress? (2022) *Journal of Istanbul Veterinary Sciences* **6**: 90-97.

Bildirileri

- Diagnosis and Characterization Feline Panleukopenia Virus Associated with Feline Bocavirus in Ankara- 6th International Congress on Advances In Veterinary Sciences & Technics (Poster sunumu) (2021)
- Molecular characterization of endogenous feline leukemia virus infection from clinical specimens in Ankara- 6th International Congress on Advances in Veterinary Sciences & Technics (Poster sunumu) (2021)
- Türkiye’deki Evcil Köpeklerde Canine Distemper Virus (CDV) Asia-1 Genetik Lineajının Tespiti- International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Poster Sunumu) (2022)

VI. Bilimsel Etkinlikleri

Projeler

- Kedilerde Onkojenik Etkili Hepadnavirus Enfeksiyonlarının Epidemiyolojik Statüsünün Moleküler Metotlarla Araştırılması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri. Proje No: 21L0239016 (ULUSAL)

Doktora seminerleri

- Viral Enfeksiyonlarda Oksidatif Stres
- Onkojenik Hepadnaviruslar ve Persistens Mekanizmaları

VII. Diğer Bilgiler

Katıldığı Eğitim Seminerleri

1. Ev Hayvanlarında Anksiyete Bozuklukları (2014)
2. Bedeniniz Konuşuyor – Beden Dili (2014)
3. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Tarih ve Kültür Topluluğu Kariyer Günleri (2014)

4. Sürü Sağlığı, Üretim Yönetiminde Gelişmeler ve İyi Süt Hayvancılığı Uygulamaları(2014)
5. Certificate of Attendance / Romanian Language (beginner level, 2015)
6. Uygulamalı Veteriner Temel Stomatoloji – Diş Hekimliği (2016)
7. Radyoloji Sertifikası (2018)
8. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (2019)
9. Amatör Denizcilik Belgesi (2020)
10. Amatör Balıkçılık Belgesi (2021)
11. Kısa Mesafe Telsiz Operatörü Yeterlik Belgesi (2020)
12. Suni Tohumlama Sertifikası (2021)
13. Sığırlarda Dış Görünüş Değerlendirme (Tip Değerlendirmesi) ve Pedigri Okuma Eğitimi (2021)
14. Anthrax Hastalığının Teşhisi ve Koruyucu Önlemlerin Alınması (2022)
15. İhbarı Mecburi Kanatlı Hastalıklarında Numune Alma ve Gönderme Eğitimi (2022)
16. Introductin to Rift Valley Fever Organized by the EUFMD (2022)
17. Avrupa Şap Hastalığı Kontrol Komisyonu (EuFMD) tarafından Kasım-Aralık 2022’de 6. Düzenlenen Çevrimiçi Şap Hastalığı Eğitim Kursu (2022)

Başarılar

- 2018 Yılı Mezunu Dönem Beşinciliği (Mezuniyet notu: 4’lük sistemde 3.36)
- 6th International Congress on Advances InVeterinary Sciences & Technics, En iyi Poster Sunumu Üçüncülüğü

