



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**PESTE DES PETITS RUMINANTS VİRUS (PPRV)
ENFEKSİYONUNUN EPİDEMİYOLOJİSİNİN N VE F
GENLERİNE DAYALI FARKLI PCR TEKNİKLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

Ahmet SAİT

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP**

2013-ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PESTE DES PETITS RUMINANTS VİRUS (PPRV)
ENFEKSİYONUNUN EPİDEMİYOLOJİSİNİN N VE F
GENLERİNE DAYALI FARKLI PCR TEKNİKLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

Ahmet SAİT

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP**

Bu tez, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından
TAPGEM/HSYGAD/12/A07/P02/07 ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
tarafından BAP-10B3338012 proje numaraları ile desteklenmiştir.

2013-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Viroloji Doktora Programı

çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

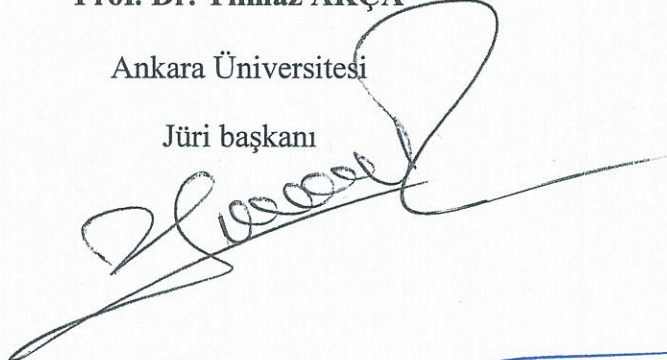
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18 / 07 / 2013

Prof. Dr. Yılmaz AKÇA

Ankara Üniversitesi

Jüri başkanı



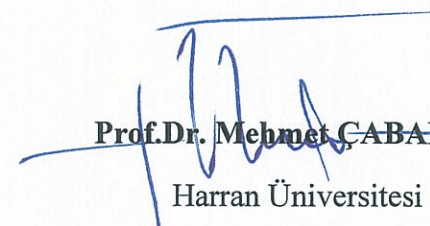
Prof. Dr. Hakan YARDIMCI

Ankara Üniversitesi



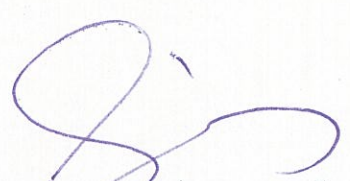
Prof.Dr. Mehmet ÇABALAR

Harran Üniversitesi



Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP

Ankara Üniversitesi



Doç.Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU

Ankara Üniversitesi



İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
İçindekiler	III
Önsöz	VI
Simgeler ve Kısaltmalar	VIII
Şekiller	IX
Çizelgeler	XI
1. GİRİŞ	1
1.1. Etiyoloji	2
1.1.1. Virusun fiziksel ve kimyasal dirençliliği	6
1.1.2. Virusun yapısı ve genom organizasyonu	7
1.1.2.1. Nükleokapsit (N) proteini	10
1.1.2.2. P, V ve C proteinleri	13
1.1.2.3. Matriks (M) proteini	14
1.1.2.4. Füzyon (F) proteini	15
1.1.2.5. Hemagglütinin (H) proteini	17
1.1.2.6. Large (L) protein (polimeraz protein)	18
1.1.3. Viral replikasyon	18
1.2. Epizootiyoloji	21
1.2.1. Konak aralığı	21
1.2.1.1. Bulaşma ve yayılım	23
1.2.2. Coğrafik dağılım	24
1.2.3. Klinik belirtiler	26
1.3. Patogenez	28
1.3.1. Teşhis	29
1.3.1.1. Örneklerin toplanması	29
1.3.1.2. Virusun identifikasyonu	30
1.3.1.2.1. Viral antijen tespiti	30
1.3.1.2.2. Virus izolasyonu	30
1.3.1.2.3. Nükleik asit tespiti	31
1.3.1.2.4. Serolojik testler	32

1.3.2. Ayırıcı teşhis	32
1.3.3. İmmunoloji	33
1.4. Koruma ve kontrol	34
1.5. Türkiye’de PPRV enfeksiyonunun durumu	36
1.6. Amaç	39
2. GEREÇ VE YÖNTEM	40
2.1. Gereç	40
2.1.1. Tanısal örnekler	40
2.1.2. Virus	43
2.1.3 Kimyasal maddeler	43
2.1.4. Ticari kitler	43
2.1.5. Cihazlar	44
2.2. Yöntem	45
2.2.1. Virolojik kontrol amacıyla alınan örneklerin hazırlanması	45
2.2.1.1.Kan örneklerinin hazırlanması	45
2.2.1.2. Doku ve nasal swap örneklerinin hazırlanması	45
2.2.2. Viral RNA ekstraksiyonu	45
2.2.3. Konvansiyonel RT-PCR	46
2.2.4. Real-Time RT-PCR	47
2.2.5. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	48
2.2.6. PCR ürünlerinin saflaştırılması	49
2.2.7. Dizin analizi	50
2.2.7.1. BigDye® Terminator v3.1 için reaksiyon karışımının hazırlanması	50
2.2.7.2. Receiver Spin Column saflaştırılması için Sephadex hazırlanması	51
2.2.7.3. Receiver kolonun hazırlanması	51
2.2.8. Dizin analizi sonuçlarının değerlendirilmesi ve filogenetik analiz	52
3. BULGULAR	53
3.1. PCR sonuçları	53
3.1.1. Konvansiyonel RT-PCR sonuçları	53
3.1.2. Real-Time RT-PCR tekniğinin sensitivitesi	53
3.1.3. Standart eğrinin oluşturulması	54
3.1.4. Standart eğriye ait verilerin istatistiksel analizi	55

3.1.5. Real-Time RT-PCR tekniğinin spesifitesi	57
3.1.6. RT-PCR tekniklerinin performanslarının karşılaştırılması	58
3.1.7. Saha örneklerinin RT-PCR sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi	59
3.2. Dizin analizi sonuçlarının değerlendirilmesi ve filogenetik analiz	61
3.2.1. PPRV F gen bölgesi dizin analizi sonuçlarının değerlendirilmesi ve filogenetik analiz	64
3.2.2. PPRV N gen bölgesi dizin analizi sonuçlarının değerlendirilmesi ve filogenetik analiz	82
4. TARTIŞMA	100
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	116
ÖZET	119
SUMMARY	121
KAYNAKLAR	123
EK-1 Etik kurul kararı	135
EK-2 Standart Genetik Kodlar	138
EK-3 Aminoasitler ve Sembolleri	138
ÖZGEÇMİŞ	139

ÖNSÖZ

Küçük ruminantların vebası (Peste des Petits Ruminants, PPR), koyun ve keçilerde yüksek oranda ölüme neden olan viral bir hastalıktır. Hastalık, özellikle ekonomisi hayvancılık temeline dayanan ülkelerde, önemli kayıplara neden olmaktadır. İlk olarak 1942 yılında Batı Afrika'da tanımlanan hastalık, buradan subtropikal Afrika'ya, Arap Yarımadası'na, Ortadoğu ve Güneydoğu Asya'ya yayılmıştır. Ulaştığı her coğrafyada oluşturduğu salgınlar sonucu ülkelerin hayvan varlığına ve hayvansal üretimine ciddi ölçüde zararlar vermiştir. Türkiye'de PPR enfeksiyonunun varlığı resmi olarak ilk kez 1999 yılında açıklansa da, ülkede virus varlığı daha önceki yıllarda rapor edilmiştir. Moleküler epidemiyolojik çalışmalar sonunda, komşu ülkelerde aktif olarak sirküle olan PPR virus (PPRV) enfeksiyonunun sınır geçişine dair önemli bilgilere ulaşılmıştır. Bu çalışmalar sonunda tespit edilen PPR viruslarının IV. genetik hata ait olduğu, bu grubun Güney Asya, Arabistan yarımadası ve Ortadoğu'dan köken alan virusları kapsadığı görülmüştür.

Türkiye'de PPRV enfeksiyonun ilk tespitinden bu yana enfeksiyonun varlığı/yaygınlığının araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde ülkemizde PPRV enfeksiyonunun hızla yayıldığı, enfeksiyonun kontrol ve eradikasyonuna dair alınan tedbirlerin yeterli olmadığı düşüncesine ulaşılmıştır. Kontrol/eradikasyon metotlarının ilk basamağını ise duyarlı, spesifik tanı tekniklerinin belirlenmesi konusu oluşturmaktadır.

Bu noktadan hareketle planlanan bu çalışmada, Türkiye'nin değişik bölgelerinde yetiştirilen koyun ve keçilerde PPRV enfeksiyonunun prevalansının belirlenmesi, PPRV enfeksiyonu ile ilgili olarak güncel verilere ulaşılması, enfeksiyonun rutin tanısında kullanılan Fusion (F) gene dayalı RT-PCR tekniği ile Nükleoprotein (N) gen bölgesini hedef alarak yapılacak konvansiyonel ve Real-Time RT-PCR tekniklerinin karşılaştırılması ve enfeksiyonun tanısında hızlı, spesifik ve duyarlı tanı tekniklerinin ortaya konulması ile enfeksiyonun kontrol/eradikasyonunda alınması gerekli tedbirlerin uygulanmasına katkıda bulunulabilecektir. Ayrıca

araştırma kapsamında elde edilen virusların her iki gen bölgesi hedef alınarak yapılacak moleküler karakterizasyon çalışması, Türkiye’de sirküle olan viruslar ve genetik yakınlıklarının ortaya konulabilmesi açısından önemli olabilecektir.

Bu çalışma süresince özveri, sabır ve yapıcı eleştirilerinden dolayı, Danışman Hocam Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP’e, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı’nın tüm olanaklarından faydalanmamı sağlayan Prof. Dr. İbrahim BURGU ve Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yılmaz AKÇA’ya; yardım ve desteklerini esirgemeyen, Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Feray ALKAN, Prof. Dr. Aykut ÖZKUL, Doç. Dr. M. Taner KARAOĞLU ve Doç. Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU ile tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. Hakan YARDIMCI’ya, tez çalışmam sırasında büyük katkıları olan Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Viral Teşhis Laboratuvarı Şefi Uzm. Vet. Hekim Dr. Aysel ÜNSAL BACA’ya, doktora programım boyunca birlikte çalıştığım doktora öğrencisi ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma, numune toplamamda yardımcı olan meslektaşlarıma, her zaman destek ve anlayışları için aileme ve eşim Fatma SAİT’e en içten teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGID	Agar Gel Immunodiffusion
Bp	Base Pair (Baz çifti)
BLAST	Basic Local Aligment Search Tool
cDNA	Komplementer DNA
C-ELISA	Competitive Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay
dNTP	Deoksi Nükleotid Tri Phosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
H	Hemaglütinin
HN	Hemaglütinin Nöyroaminidaz
ICE	Immunocapture ELISA
Kb	Kilo Baz
Kd	Kilo Dalton
MDBK	Madine Darby Bovine Kidney
µl	Mikrolitre
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NCBI	National Center Biotechnology Information
ORF	Açık Okuma Çerçevesi (Open Reading Frame)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PPR	Peste des Petits Ruminants
PPRV	Peste des Petits Ruminants Virus
RNAi	RNA Interference
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
	Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain
rRT-PCR	Reaction
RDRP	RNA'ya bağlı RNA polimeraz
RNA	Ribonucleic Acid
RNP	Ribonükleoprotein
RP	Rinderpest
RPV	Rinderpest Virus
siRNAs	Small Interfering RNAs

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	<i>Mononegavirales</i> takımı	3
Şekil 1.2.	<i>Paramyxovirinae</i> alt ailesi	4
Şekil 1.3.	PPRV ve diğer morbillivirusların filogenetik ilişkisi	6
Şekil 1.4.	Morbillivirus partikülü ve genom organizasyonu	8
Şekil 1.5.	PPRV ve diğer morbillivirusların N gene dayalı filogenetik ilişkisi	12
Şekil 1.6.	Morbillivirusların replikasyonu	20
Şekil 1.7.	PPR Virusunun 4 farklı genetik hattının coğrafik dağılımı	25
Şekil 1.8.	Turkey2000 izolatının F gene dayalı filogenetik ilişkisi	38
Şekil 2.1.	PPRV enfeksiyonu şüpheli hayvanların örneklendiği iller	40
Şekil 3.1.	PPRV F ve N gen bölgesi yönünden yapılan RT-PCR görüntüsü	53
Şekil 3.2.	Real Time RT-PCR tekniğinin sensitivitesi	54
Şekil:3.3.	Real Time RT-PCR tekniğinin standart eğrisi	55
Şekil 3.4.	Real Time RT-PCR tekniğinin spesifitesi	57
Şekil 3.5.	Real Time RT-PCR tekniğinin sensitivitesi	58
Şekil 3.6.	Konvansiyonel N ve F gen RT-PCR tekniklerinin sensitivitesi	59
Şekil 3.7.	Türkiye’de 1996-2012 yılları arasında saptanan virusların F gen kısmi dizinlerinin nükleotid düzeyinde karşılaştırılması	65
Şekil 3.8.	F gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Nigeria/75/1dizini ile nükleotid düzeyinde karşılaştırılması	72
Şekil 3.9.	F gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Nigeria/75/1dizini ile aminoasit düzeyinde karşılaştırılması	77
Şekil 3.10.	F gen kısmi dizinlerinin filogenetik ilişkisi	79
Şekil 3.11.	F gen kısmi dizinler ile komşu ülke dizinleri arasındaki filogenetik ilişki	80
Şekil 3.12.	F gen kısmi dizinlerinin network analizi	81
Şekil 3.13.	N gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Turkey2000 dizini ile nükleotid düzeyinde karşılaştırılması	83

Şekil 3.14.	N gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Turkey2000 dizini ile aminoasit düzeyinde karşılaştırılması	88
Şekil 3.15.	N gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Nigeria/75/1 dizini ile nükleotid düzeyinde karşılaştırılması	91
Şekil 3.16.	N gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Nigeria/75/1 dizini ile aminoasit düzeyinde karşılaştırılması	95
Şekil 3.17.	N gen kısmi dizinlerinin filogenetik ilişkisi	97
Şekil 3.18.	N gen kısmi dizinlerinin komşu ülke dizinleri ile olan filogenetik ilişkisi	98
Şekil 3.19.	N gen kısmi dizinlerinin network analizi	99

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	PPRV enfeksiyonu şüpheli örneklerin yıl ve tür bazında dağılımları	41
Çizelge 2.2.	PPRV enfeksiyonu şüpheli örneklerin yıl ve çeşit bazında dağılımları	41
Çizelge 2.3.	PPRV enfeksiyonu şüpheli örneklerin illere göre dağılımı	42
Çizelge 2.4.	Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	43
Çizelge 2.5.	Çalışmada kullanılan ticari kitler	44
Çizelge 2.6.	Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları	44
Çizelge 2.7.	Konvansiyonel RT-PCR tekniğinde kullanılan primer setleri	47
Çizelge 2.8.	Konvansiyonel RT-PCR tekniğinde kullanılan PCR karışımı ve ısı protokolü	47
Çizelge 2.9.	Real Time RT-PCR tekniğinde kullanılan PCR karışımı ve ısı protokolü	48
Çizelge 2.10.	Real Time RT-PCR tekniğinde kullanılan primer ve prob seti	48
Çizelge 2.11.	Dizin analizinde kullanılan reaksiyon bileşenleri ve program	50
Çizelge 3.1.	Real- Time PCR’da sulandırılmalarda reaksiyona giren cDNA sayısı ve reaksiyon sonucunda elde edilen crossing point değerleri	55
Çizelge 3.2.	EKK yöntemi ile standart eğri verilerine ait parametre tahminleri ve önem testleri	56
Çizelge 3.3.	Standart eğriye ait varyans analiz tablosu	56
Çizelge 3.4.	İllere göre RT-PCR sonuçları	60
Çizelge 3.5.	Yıl ve tür bazında RT-PCR sonuçları	61
Çizelge 3.6.	Örnek çeşidine göre RT-PCR sonuçları	61
Çizelge 3.7.	F gen kısmi dizinlerinin gen bankasında yer alacak son nomenklatöre göre yapılmış isimlendirmeleri ve ulaşım numaraları	62

Çizelge 3.8.	N gen kısmi dizinlerinin gen bankasında yer alacak son nomenklatöre göre yapılmış isimlendirmeleri ve ulaşım numaraları	63
Çizelge 3.9.	Türkiye’de 1996-2012 yılları arasında saptanan virusların F gen dizinlerinin nükleotid düzeyinde yüzde benzerlik oranları	67
Çizelge 3.10.	Türkiye’de 1996-2012 yılları arasında saptanan virusların F gen dizinlerinin aminoasit düzeyinde yüzde benzerlik oranları	68
Çizelge 3.11.	F gen kısmi dizinlerinde Nigeria/75/1 dizinine göre meydana gelen nükleotid değişimlerinin genomdaki pozisyonu	71
Çizelge 3.12.	F gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Nigeria/75/1 dizini ile nükleotid düzeyinde yüzde benzerlik oranları	76
Çizelge 3.13.	F gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Nigeria/75/1 dizini ile aminoasit düzeyinde yüzde benzerlik oranları	78
Çizelge 3.14.	N gen kısmi dizinlerinde Turkey2000 dizinine göre meydana gelen nükleotid ve aminoasit değişimlerinin tam genomdaki pozisyonu	82
Çizelge 3.15.	N gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Türkiye2000 dizini arası nükleotid düzeyinde yüzde benzerlik oranları	85
Çizelge 3.16.	N gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Türkiye2000 dizini arası aminoasit yüzde benzerlik oranları	87
Çizelge 3.17.	N gen kısmi dizinlerinde Nigeria/75/1 dizinine göre meydana gelen nükleotid değişimlerinin tam genomdaki pozisyonu	88
Çizelge 3.18.	N gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Nigeria/75/1 dizini arası nükleotid yüzde benzerlik oranları	94
Çizelge 3.19.	N gen kısmi dizinlerinde Nigeria/75/1 dizinine göre meydana gelen aminoasit değişimlerinin genomdaki pozisyonu	89
Çizelge 3.20.	N gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Nigeria/75/1 dizini arası aminoasit yüzde benzerlik oranları	96

1. GİRİŞ

Morbillivirus enfeksiyonları yüzyıllardır insan ve hayvanlarda büyük kayıplara neden olmuştur. Peste des Petits Ruminants Virus (PPRV), Rinderpest Virus (RPV), Canine Distemper Virus (CDV), Newcastle Disease (ND), Kızamık (measles, MV) ve Kabakulak (mumps) bu alt aileye ait önemli viruslardandır. Yakın geçmişte deniz memelilerinde yeni morbillivirus enfeksiyonları tespit edilmiştir. Phocid distemper virus (PDV), foklarda; cetacean morbillivirus (CMV), yunus, balina ve ayı balığında enfeksiyonlara sebep olan viruslardır (Chauhan ve ark., 2009).

Peste des Petits Ruminants (PPR); evcil ve yabani küçük ruminantların bulaşıcı karakterde hızlı yayılım gösteren, ateş, başlangıçta seröz, ilerleyen dönemlerde mukopurulent burun ve gözyaşı akıntısı, ağız mukozasında hemoraji ve erozyonlar, ishal ve bronchopneumoni ile karakterize, mortalite ve morbidite oranı yüksek, akut veya subakut seyirli bir hastalıktır. PPRV enfeksiyonu pseudorinderpest, keçilerin enteritis ve erozyonlu stomatitisi, keçi katarhal ateşi, kata, keçi vebasası veya stomatitis pnömoenteritis kompleks gibi benzer isimlerle de tanımlanmıştır (Chauhan ve ark., 2009).

Dünya çapında çiftlik hayvanı yetiştiriciliği, tarımsal gelirin ortalama %40'nı oluşturmaktadır (Abubakar ve ark., 2011; Steinfeld ve ark., 2006). Afrika ve Asya'da birçok ülkede koyun ve keçi yetiştiriciliği, istihdamın ve tarımın devamlılığı için büyük öneme sahiptir. Bu coğrafyalarda PPR salgınlarının potansiyel ve gerçek ekonomik etkileri toplumun yoksul kesimleri için tahmin edilemeyecek boyuttadır (Singh ve ark., 2004). Örneğin 2004 yılında Hindistan'da çıkan salgının ekonomik büyüklüğünün 39 milyon dolar (Singh ve ark., 2004); Pakistan'da, ölüm ve değerli damızlıkların kaybına bağlı olarak yıllık kaybın 342,1 milyon dolar (Abubakar ve ark., 2011; Hussain ve ark., 2008); 2006-2008 yılları arasında Kenya'da çıkan ve 5

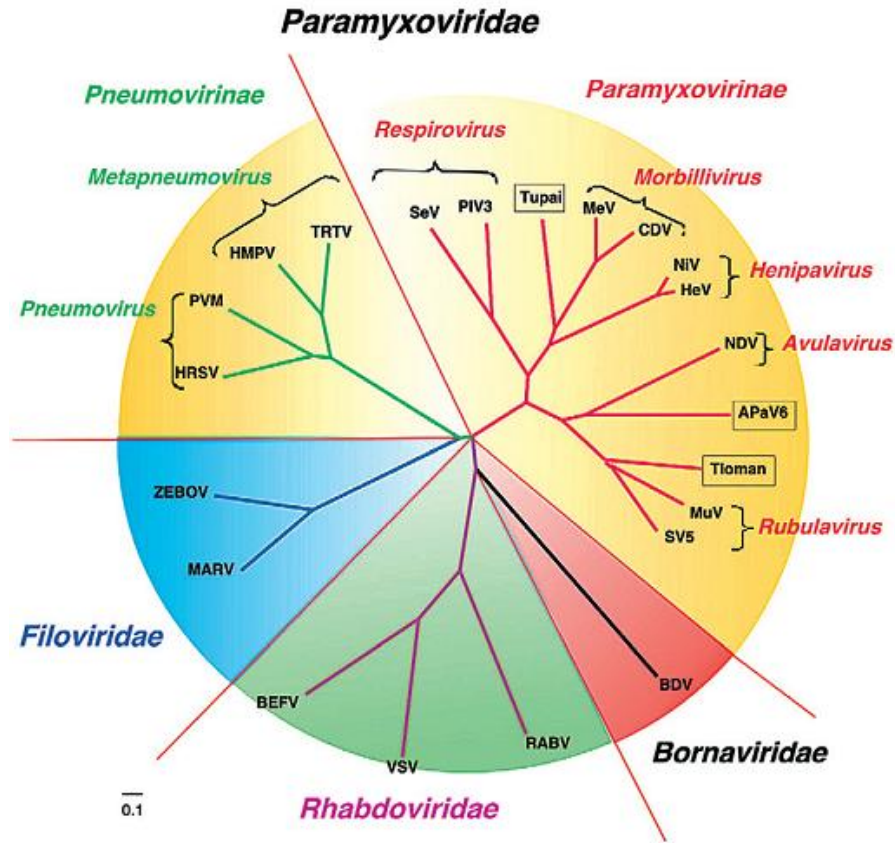
milyondan fazla hayvanın etkilendiği salgında oluşan ekonomik kaybın ise 15 milyon dolar olduğu tahmin edilmektedir (Baron ve ark., 2011).

Hastalık ilk defa 1942 yılında Batı Afrika'da Fildişi Sahilleri'nde (Gargadennec ve Lalanne, 1942) ve ardından Atlantik Okyanusu ile Kızıl Deniz arasında uzanan ülkelerin çoğunda tanımlanmıştır (Chauhan ve ark., 2009; Lefevre ve Diallo 1990). Günümüzde Afrika'nın tamamına yakın bir bölümü ile Güney ve Batı Asya'da hastalığın varlığı bilinmektedir. İkibin sekiz yılında Tunus ve Fas'ta çıkan salgınlar (OIE, 2008; FAO, 2009) ve Cezayir'de koyunlarda PPR virusuna karşı antikorların tespiti, enfeksiyonun Avrupa Birliği sınırlarına kadar geldiğini göstermektedir (Banyard ve ark., 2010).

Asya ve Afrika'da PPR olaylarındaki belirgin artış, hastalığın yakın bölgelere yayılma hızı konusundaki ciddiyeti göstermektedir. Türkiye'de PPR enfeksiyonunun varlığı resmi olarak ilk 1999 yılında açıklansa da (OIE, 1999), ülkede virus varlığı daha önceki yıllarda rapor edilmiştir (Alçıgır ve ark.,1996; Tatar, 1998). Moleküler epidemiyolojik çalışmalar sonunda komşu ülkelerde aktif olarak sirküle olan PPRV enfeksiyonunun sınır geçişine dair önemli bilgilere ulaşılmıştır. Bu çalışmalar sonunda tespit edilen PPR viruslarının IV. genetik hatta yer aldığı, bu grubun Güney Asya, Arabistan yarımadası ve Ortadoğu'dan köken alan virusları kapsadığı görülmüştür (Özkul ve ark., 2002).

1.1. Etiyoloji

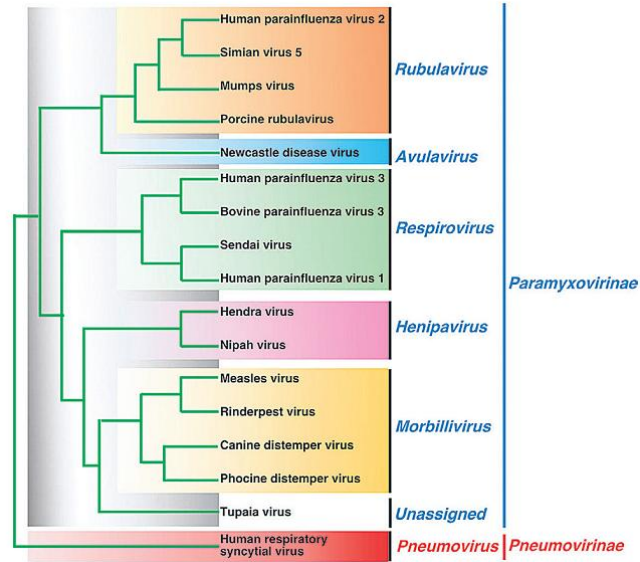
Paramyxoviridae ailesi *Rhabdoviridae*, *Filoviridae* ve *Bornaviridae* aileleri ile birlikte *Mononegavirales* takımına aittir. *Paramyxoviridae* ailesi *paramyxovirinae* ve *pneumovirinae* alt ailelerine ayrılır (MacLachlan ve Dubovi, 2011). *Mononegavirales* takımı şematik olarak Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Mononegavirales takımı (MacLachlan ve Dubovi, 2011).

Paramyxovirinae alt ailesi *Respirovirus*, *Avulovirus*, *Henipavirus*, *Morbillivirus* ve *Rubulavirus* genuslarını içerir (Murphy ve ark., 1999). Genusların tanımlanmasında etkili olan biyolojik özellikler, genus üyeleri arasındaki çapraz reaksiyon ilişkileri ile nöyroaminidaz ve hemagglütinin yüzey moleküllerinin pozisyon farklılıkları olarak bildirilmiştir (Gibbs ve ark., 1979).

Paramyxovirinae alt ailesi Şekil 1.2’de gösterilmiştir.



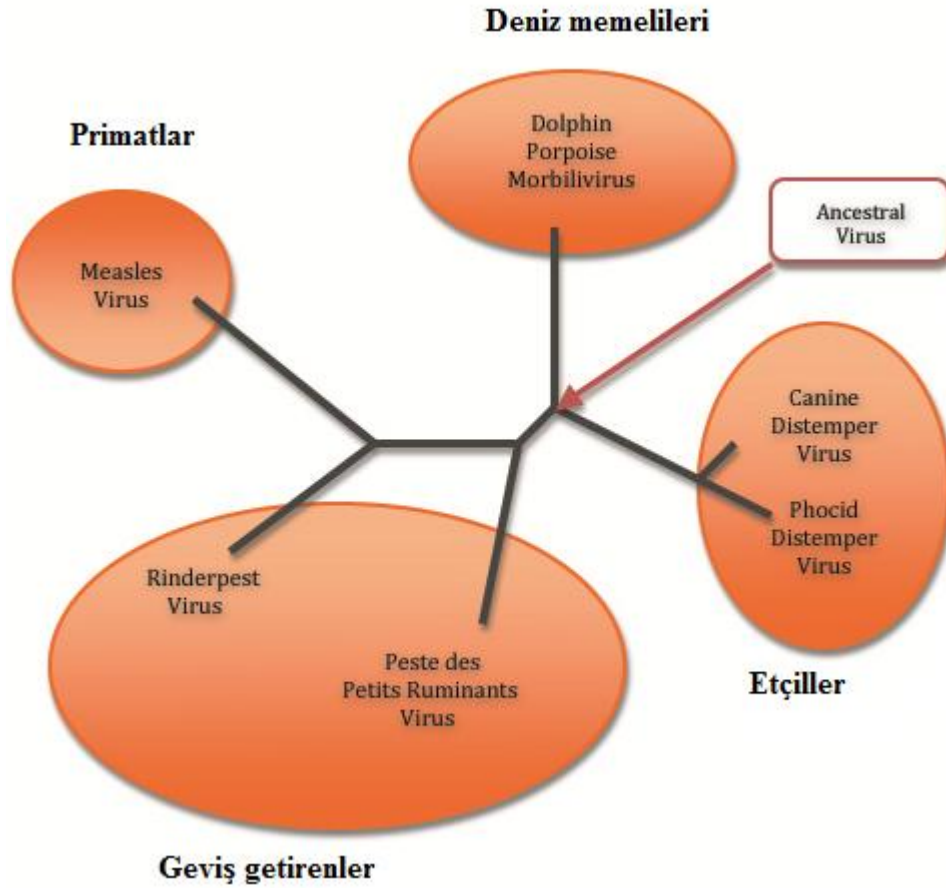
Şekil 1.2. *Paramyxovirinae* alt ailesi (MacLachlan ve Dubovi, 2011).

Paramyxovirinae alt ailesi yaban hayattaki konakçılarından yeni izole edilen ve henüz tam olarak klasifiye edilememiş viruslar (Örneğin; rodentlerden *J. paramyxovirus*, *Nariva virus* ve *Mossman virus*; kır farelerinden *Tupaia virus*; yarasalardan *Menangle virus* ve *Mapuera virus*) ile hızlı bir şekilde büyümeye devam etmektedir. Alt ailenin henüz klasifiye edilmemiş diğer üyeleri; reptillerin *Fer-de-Lance* ve *Ophidian paramyxovirusları*, atların *Salem virusu*, penguenlerin *Atlantik salmon paramyxoviruslarıdır*. *Paramyxovirinae* alt ailesi içindeki viruslara ait bu liste, vahşi yaşam türlerinin incelenmesi ile daha da uzayacak ve uzama sadece yeni virusları kapsamakla kalmayacak aynı zamanda yeni genusların da eklenmesini içerecektir (MacLachlan ve Dubovi, 2011).

PPRV, *Mononegavirales* takımının *Paramyxoviridae* ailesinin *Paramyxovirinae* alt ailesinin, *Morbillivirus* genusuna dahildir (Gibbs ve ark., 1979). PPRV enfeksiyonu, ilk tespit edildiği yıllarda, koyun ve keçilerle temas halinde bulunan sığırlara bulaşmaması nedeniyle RPV’nin küçük ruminantlara adapte olmuş bir formu olarak değerlendirilmiştir. Bundan yaklaşık 40 yıl sonra PPR virusunun

kros nötralizasyon ve elektron mikroskopik çalışmalarda fizikokimyasal özellikleri yönünden RP virusundan farklı bir virus olduğu, biyolojik ve antijenik özellikleri yönünden ise, RPV ve morbillivirus genusuna dahil diğer 5 virus (canine distemper virus, measles virus, dolphin distemper virus, phocine distemper virus ve porpoise morbillivirus virus) ile yakınlığı olduğu belirlenmiştir (Baron ve ark., 2011; Gibbs ve ark., 1979). Moleküler tekniklerin gelişmesi ve nükleik asit dizin analizi çalışmaları ile PPR virusun RP virusundan tamamen ayrı olduğu ispatlanmıştır (Gopilo, 2005). PPR virusunun uzun bir süredir ayrı bir virus olduğu fikri morbillivirus filogenetik analizleri tarafından da desteklenmektedir. Yapılan filogenetik analizde hem RP virusun, hem de PPR virusunun ortak ataları olan virustan benzer uzaklıkta olduğu görülmektedir (Baron ve ark., 2011). Bu bilgiler ışığında PPR virusunun, RPV gibi uzunca bir süredir sirküle olduğu anlaşılmaktadır (Baron ve ark., 2011). PPRV ve diğer morbillivirusların filogenetik ilişkisi Şekil 1.3’de gösterilmiştir.

Moleküler epidemiyolojik çalışmalar sonunda, PPRV, F gen dizin analizlerine göre dünya çapında 4 farklı genetik hatta ayrılmıştır. Coğrafik dağılımıyla uyumlu, ancak ayrı bir serotipini ya da suşunu ifade etmeyen bu 4 farklı genetik hatta ait PPRV suşlarının/izolatlarının arasında nükleotid değişimlerinin olduğu gözlenmiştir (Chard, 2008). Afrika’dan (Senegal, Sudan, Nijerya) izole edilen PPR virusları I. genetik hat içinde, Fildişi Sahilleri ve Yeni Gine’den izole edilenler II. genetik hat içinde, Doğu Afrika’dan (Umman ve Sudan) ve Hindistan’dan (India TN/92) izole edilenler III. genetik hat içinde (Shaila ve ark., 1996; Dhar ve ark., 2002) ve Asya’dan (Türkiye, İsrail, Suudi Arabistan, Pakistan, Nepal, Bengladeş, Irak, İran, Hindistan, Çin) (Shaila ve ark., 1996; Wang ve ark., 2009; Özkul ve ark., 2002) izole edilenler IV. genetik hat içinde gruplandırılmıştır. Buna göre hat I, II ve III Afrika’da, hat III ve IV Orta Doğu’da, hat IV Güney Asya’da tespit edilmiştir. Aşı suşları olan Nigeria/75/1 hat I içinde, Sungri/96 hat IV içinde yer almıştır (Shaila ve ark., 1996; Dhar ve ark., 2002; Muthuchelvan, 2006b).



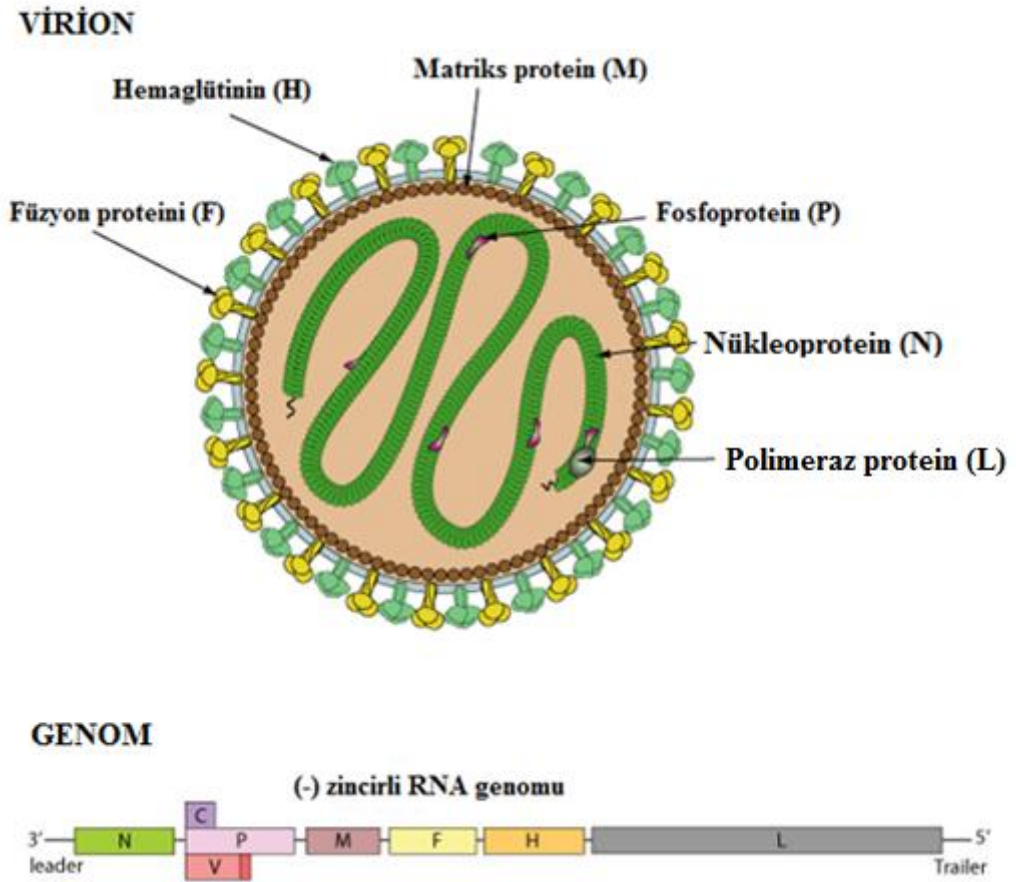
Şekil 1.3. PPRV ve diğer morbillivirusların filogenetik ilişkisi (Barrett, 1999).

1.1.1. Virusun fiziksel ve kimyasal dirençliliği

Paramyxoviridae ailesinin de içinde bulunduğu zarflı viruslar, fiziksel ve kimyasal ajanlara karşı diğer zarflı viruslara göre daha duyarlıdırlar (Murphy ve ark., 1999). PPR virusunun yarı ömrünün 56°C'de 22 dakika, 37°C'de 3.3 saat olduğu bildirilmiştir (Rossiter ve Taylor, 1994). Alkol, eter, fenol gibi yağ çözücüler ve %2-5'lik sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi (24 saat/litre/m²) dezenfektan olarak kullanılabilir. Virus, enfekte karkaslarda laktik asit oluşumunu engellediğinden, ölümden sonra karkastaki lenf yumrularında 40°C'de 8 gün enfeksiyözitesini korumaktadır (Gibbs ve ark., 1979; Scott, 1990).

1.1.2. Virusun yapısı ve genom organizasyonu

Paramyxovirusa ait virionlar, diğer negatif polariteli RNA viruslarında olduğu gibi iki yapısal üiteden meydana gelir. Virion tek zincirli RNA genomunu içeren nükleokapsit ve dışta pleomorfik lipoprotein yapıda zarfdan oluşmaktadır (Fields ve ark.,1990). Pleomorfik yapıdaki virusun büyüklüğü 150-350 nm arasında değişmektedir (MacLachlan ve Dubovi, 2011). Çift katlı ve konak hücreden köken alan lipid zarf, virusun hücreye girişine ve hücreden ayrılmasına aracılık eden F ve H glikoproteinleri olarak adlandırılan iki yüzey glikoproteini içerir (Coen ve Ramig, 2000). Negatif boyama metodu ile incelendiğinde, virusun yapışmasına ve hücreye girişine aracılık eden 8-12 nm uzunluğunda glikoprotein çıkıntılar zarf yüzeyine saçaklı bir görünüm verir (Fields ve ark., 1990; Coen ve Ramig, 2000). Nükleokapsit, ribonükleoprotein (RNP) kompleks içine sarılmış karakteristik “kılçık” (herring-bone) görünümüne sahiptir (Gopilo, 2005). RNP kompleks N proteini ve RNA’ya bağlı RNA polimeraz’dan (RDRP) oluşur. RDRP ise katalitik L proteini ve P kofaktör proteinini içerir. P proteini viral polimerazın en küçük alt ünitesi, L proteini ise en büyük alt ünitesidir (Fields ve ark., 1990). Morbillivirus partikülü ve genom organizasyonu Şekil 1.4’de gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Morbillivirus partikülü ve genom organizasyonu (Expasy.org).

Morbillivirus genomu negatif polariteli tek zincirli RNA içerir. Morbillivirus genusuna ait virusların tam gen dizinleri çıkartılmıştır. Genus içerisinde PPRV, 15948 nükleotid ile en uzun genoma sahiptir (Barrett ve ark., 2006). Birçok Paramyxovirusta olduğu gibi tüm morbillivirüslerde genom, “rule of six” kuralıyla uyumludur (Gebreeziabher, 2006). Bu kurala göre N protein her 6 nükleotidte bir genomik RNA’ya bağlanır. Etkin bir transkripsiyon ve replikasyon için genomik RNA’nın N protein ile enkapside edilmesi gereklidir. Morbillivirus genomunun fiziksel haritası/gen dizilimi, respirovirus ve henipavirus ile benzerlik gösterir (Gebreeziabher, 2006).

Genom; altı yapısal protein [nükleokapsit proteini (N), fosfoprotein (P), matrix protein (M), füzyon proteini (F), hemagglutinin proteini (H) ve RNA’ya bağlı RNA

polimeraz (L)] ve iki yapısal olmayan protein (C ve V proteinleri) kodlayan altı transkripsiyonel ünite içerir. Viral yapısal proteinlerin sentezlendiği ünitelerin dizilimi 3'-N-P-M-F-H-L-5' şeklindedir. Her bir ünite intergenik (IG) bölge olarak isimlendirilen 3 nükleotidlik (CTT) dizin ile birbirinden ayrılır. Bazı virus suşlarında H-L kavşağındaki dizinler CGT şeklindedir. Her bir transkripsiyonel ünite AGGA (F gen için AGGG) dizisi ile başlar ve en az 4 A dizisi ile sonlanır. Dörtlü A dizisi polimeraz tarafından mRNA'nın poliadenilasyonu için sinyal görevi yapar. Genomun 3' ve 5' ucunda sırasıyla 52 ve 37 nükleotidlik (CDV ve PDV için 38 nt.) kısa dizinler mevcuttur. 3' ucundaki dizin "leader", 5' ucundaki ise "trailer" olarak isimlendirilir. L gen bölgesi ile "trailer" kavşağındaki dizin RPV ve MV için CTT; PPRV için CTA; DMV, CDV ve PDV için CAA'dır. Morbilliviruslara özgü genom organizasyonunun temel özelliği M gen 3' ucunda ve F gen 5' ucunda uzun translate edilmeyen bölgelerin [untranslated region (UTR)] varlığıdır (Chauhan ve ark., 2009). Her iki bölge, intergenik bölgelerle birlikte yaklaşık 1 kb nükleotid uzunluğunda ve GC içeriği yüksek translate olmayan (UTR) bir fragment oluşturur. Bahsedilen bu UTR'lerin virusun replikasyonu için esansiyel olmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte virusun replikasyonunu arttırmak ve aynı zamanda sitopatojenitesini minimize etmek için modülatör olarak görev yaptıkları belirlenmiştir. Sitopatojenitenin azaltılmasının virusun doğada varlığını sürdürebilmesi için bir avantaj olduğu tahmin edilmektedir (Chauhan ve ark., 2009).

PPRV genomunun tam dizin analizinde nükleotid düzeyinde en çok RP virusuna benzediği görülmektedir. Protein düzeyinde ise 6 yapısal proteinden 5'i ve yapısal olmayan V protein dolphin morbillivirus (DMV) ile büyük benzerlik gösterirken, C ve L proteinler RPV ile yüksek bir benzerlik göstermektedir (Bailey ve ark., 2005). PPRV yapısal proteinleri MV, RPV, CDV ve DMV yapısal proteinleri ile karşılaştırıldığında N, M, F ve L'nin en fazla korunan bölgeler olduğu görülmektedir. PPRV aşısı suşunun M, F ve P proteinleri DMV'a ait aynı proteinler ile yakın ilişkilidir (Bailey ve ark., 2005).

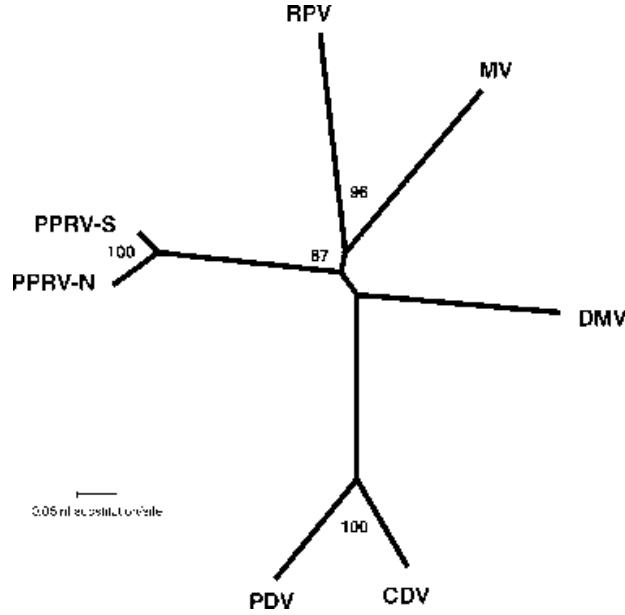
1.1.2.1. Nükleokapsit (N) proteini

Morbillivirusların majör yapısal proteini olan nükleokapsit (N) proteini, transkripsiyonel gradiente bağlı olarak PPRV genomunda ilk transkribe olan bölgedir (Ghosh ve ark., 1995). Açık okuma  er evesi [open reading frame (ORF)] 108. nükleotidde UAC ile ba lar ve 1685. nükleotidde AUU ile sonlanır. N gen bölgesi 1577 nükleotid uzunluğundadır ve 525 aminoasitlik N proteini sentezlenir (Bailey ve ark., 2005). Poliakrilamid jel üzerinde yürütüldüğünde moleküler ağırlığı 60 kDa (PPRV için)-68 kDa (RPV için) arasında değişmektedir (Diallo ve ark., 1989). Molekül ağırlığındaki bu değişkenlik proteinin post-translasyonel modifikasyondaki fosforilasyonuna atfedilmektedir. Bugüne kadar RRV N proteinindeki bu post-translasyonel modifikasyona herhangi bir biyolojik anlam/önem ithaf edilmemiştir. Ancak *Rhabdoviridae* ailesinin  yesi olan rabies virus (RV) için N proteinindeki bu post-translasyonel modifikasyon gerçekleşmediği takdirde, hem RNA transkripsiyonu hem de replikasyonunda azalmanın olduğu bildirilmiştir (Gebreeziabher, 2006). N protein bütün olarak viral RNA'yı enkapside eder ve genom elektron mikroskop altında 14-23 nm uzunluğunda balık kılçığı şeklinde (herringbone-like) görünür (Abubakar ve ark., 2011). Genomik RNA'yı içeren bu yapı, P ve L proteinleri ile birlikte minimal replikatif ünite olan ribon kleokapsid protein (RNP) kompleksini oluştururlar (Barrett ve ark., 2005).

N proteini, viral ve hücresel proteinler ile etkileşime girerek virusun yaşam döngüsünde çok önemli roller üstlenir. Bunlar; RNAase dirençli nükleokapsit oluşumu için RNA'nın enkapsidasyonu, replikasyon ve transkripsiyon boyunca P ve L proteinler ile birleşerek bir kompleks oluşturmak ve virus toplanması sırasında M proteini ile ilişki kurmaktır (Coen ve Ramig, 2000; Muthuchelvan ve ark., 2006b). Ayrıca morbillivirus N proteinin C ucu, ısı  oku proteini Hsp72 (Heat shock protein 72), interferon düzenleyici faktör IRF3 (interferon regulator factor 3) ve hücre yüzey reseptörleri gibi replikasyonda ve konakçı hücre tropizminde

önemli olan hücresel düzenleyici proteinler ile de etkileşim halindedir (Banyard ve ark., 2008).

Tüm morbillivirusların N proteinlerinin aminoasit (aa) dizinleri çıkartılmıştır. Buna göre RPV, MV ve PPRV N proteini 525 aa içerirken, CDV, PDV, DMV ve PMV 523 aa içermektedir (Diallo ve ark., 1994; Gebreeziabher, 2006). Morbillivirus N proteinleri aminoasit düzeyinde %67-74 oranında bir benzerliğe sahiptirler. Dizin analizleri, N proteininde farklı korunmuşlukta 4 bölgenin olduğunu göstermiştir. I. bölge; 1-120. aa.'ler arasında yer alan, iyi korunmuş ve grup içinde %75-83 oranında benzerliğe sahiptir. II. bölge; 122-145. aa.'ler arasında yer almakta ve %40 oranında benzerlik göstermektedir. III. bölge; 146-398. aa.'ler arası olup, %85-90 arasında benzerlikle çok iyi korunmuş bir bölgedir. IV. bölge; aynı zamanda proteinin C terminal ucu olup, 421-523/525. aa.'ler arasındaki bölgeyi kapsamaktadır; %17-30 benzerlik oranıyla proteinin en az korunmuş ve en değişken kısmıdır (Diallo ve ark., 1994). N proteininin karboksi ucundaki bu değişken yapı morbillivirusların farklı genetik hatlara ayrılmasına ve gruplandırılmasına imkan tanımaktadır (Kwiatek ve ark., 2007). Buna göre grup I: CDV ve PDV, grup II: DVM, grup III: MV ve RPV ve grup IV: PPR virusunu kapsamaktadır (Muthuchelvan ve ark., 2006b). N gen bölgesi hedef alınarak PPRV ve diğer morbillivirusların filogenetik ilişkisi Şekil 1.5'de gösterilmiştir.



Şekil 1.5. PPRV ve diğer morbillivirusların N gene dayalı filogenetik ilişkisi (Muthuchelvan ve ark. 2006b).

Memeli, insekt yada bakteriyel hücrelerde yeni sentezlenmiş N proteini hızla nükleokapsit içinde kümeleşme şeklinde birleşerek proteinin yoğun formunu oluşturur (Mitra-Kaushik et al., 2001). Bu N protein kümeleri enfekte edilmiş hücrenin hem nükleusunda, hem de stoplazmasında tespit edilmişlerdir. Nüklear transport için gerekli sinyal, CDV N gen dizininin 70-77 pozisyonlarındaki leucine/isoleucineden zengin motife (TGILISIL) atfedilmektedir (Gebreeziabher, 2006). Attenuated edilmiş Nigeria/75/1 suşunun N dizininin aynı pozisyonunda TGVMSML motifi bulunmaktadır. Nigeria/75/1 suşunda 3 leucine/isoleucine kalıntısının diğer aminoasitler ile değişmiş olması muhtemelen nüklear transport için gerekli sinyali değiştirdiğinden, PPRV N proteini nükleusta tespit edilememiştir (Gebreeziabher, 2006).

Morbillivirus genomunda N, P ve M gen bölgeleri, 3' transkripsiyonel gradiente bağlı olarak enfekte hücrede en fazla sentezlenen kısımlardır (Cattaneo ve ark., 1987; Diallo, 1990; Ghosh ve ark., 1995). Özellikle N proteini diğer PPRV proteinlerine göre hücre içinde daha fazla miktarda bulunması nedeniyle en

immunojenidir. Ancak bu durum virusa karşı konakçıda herhangi bir koruyucu immunité meydana getirmemektedir. Bu yüzden N proteini tanı kitlerinin geliştirilmesinde uygun bir hedeftir (Diallo ve ark., 2007; Chauhan ve ark., 2009). RT-PCR ile yapılacak teşhis için N gen bölgesi, F ve H gen bölgeleri ile karşılaştırıldığında, çok daha uygun olabilmektedir (Choundry ve ark., 2009). Bu sebeple, N gen bölgesi hedef alınarak PPRV enfeksiyonunun teşhisine yönelik denemeler olmuş ve umut verici sonuçlar alınmıştır (Couacy-Hymann ve ark., 2002; George, 2002, Maganga ve ark., 2013). N primerlerinin, F primerlerinden daha sensitif olması PPRV N gen transkriptlerinin, F gen transkriptlerinden daha fazla olmasına bağlanmaktadır (Ghosh ve ark., 1995).

1.1.2.2. P, V ve C proteinleri

PPRV genomunun ikinci transkripsiyonel ünitesi polisistronik P gen bölgesidir. Bu gen bölgesinden yapısal P proteini ile birlikte yapısal olmayan V ve C proteinleri sentezlenir (Gopilo, 2005; Bailey ve ark., 2005). P gen açık okuma çerçevesi 1807. nükleotidden başlar, 3336. nükleotide kadar uzanır. Sekseniki-86 Kd ağırlığında, 509 aminoasitlik P proteini üretilir (Diallo, 1990; Barrett, 1999; Mahapatra ve ark., 2003). P proteini proteolitik enzimlere karşı duyarlı olup, fosfoprotein yapısındadır. Morbillivirus P proteini, N ve L proteinleri ile birlikte viral polimerazı oluşturur. Bu yüzden viral replikasyon için esansiyel bir proteindir. P proteini, N proteinin spesifik olmayan RNA'lar ile etkileşimini engellediği gibi, L proteininin N-RNA kompleksine bağlanmasında yardımcı olur (Mahapatra ve ark., 2003).

Paramyxovirinae alt ailesine ait viruslarda mRNA'ya, RNA eklenme (RNA Editing) bölgesine, nükleotid bağlanması sonucu yeni bir translasyonel ORF oluşur ve böylece yeni bir protein sentezlenir; 1807. nükleotid aynı zamanda 297 aminoasitlik V proteininin açık okuma çerçevesidir. P geni içerisinde 2487-2498. nükleotidler arasındaki polimeraz eklenme bölgesinde mRNA'ya bir G

rezidüsünün eklenmesiyle yeni bir açık okuma çerçevesinin oluşmasına yol açar. Buradan N terminali P proteini ile aynı fakat sisteinden zengin farklı C terminaline sahip, 67 aa.'lık V proteini kodlanır (Bailey ve ark., 2005; Mahapatra ve ark., 2003). PPRV genomunda şekillenen bu alternatif C terminal ucu, yedi adet korunmuş sistein rezidüsüne sahiptir. Sistein rezidülerinin metal iyonları (özellikle çinko) bağlayan bir motif oluşturmak için etkileşime girdiği düşünülmektedir. Bu Sendaivirus-5(SV5) ve Measles Virus (MV) V proteinleri için deneysel olarak gösterilmiştir (Bailey ve ark., 2005).

P geni içinde 82.(1829.nt) nükleotidden başlayıp, 615.(2362). nükleotidde biten ve C proteinini kodlayan ikinci bir ORF vardır (Muthuchelvan ve ark., 2006c). C protein başlangıç kodonu, P ve V protein başlangıç kodonunun (1829. nt) 3'-5' yönünde 22. nükleotidinde lokalize olmuştur. C proteini 177 aa. içermektedir; P ve V proteinleri ile aminoasit benzerliği yoktur (Bailey ve ark., 2005). Paramyxovirus C ve V proteinleri yapısal olmayan protein olmalarına rağmen, enfeksiyonda kritik role sahiptirler. C-negatif mutantların in vitro büyüme defektleri göstermeleri, mRNA transkripsiyon seviyesinin azalması ile ilişkilendirilmiştir. Buna karşılık V-negatif mutantlar in vitro defektif değildirler fakat değiştirilmiş sitopatik etkiye ve arttırılmış genom/antigenom ürünlerine sahiptirler. Paramyxovirus C ve V proteinleri, enfeksiyona karşı hücrel immün yanıtı değiştirerek interferon antagonisti olarak etki ederler (Bailey ve ark., 2005).

1.1.2.3. Matriks (M) proteini

Paramyxovirus M proteini, viral zarfın altında yüzey glikoproteinleri ile RNP arasında köprü görevi görür. Bu yerleşime bağlı olarak virionun enfekte hücreden tomurcuklanması esnasında önemli bir rol oynar (Peeples, 1991). Açık okuma çerçevesi 3438-4445. nükleotidler arasında olup 335 aminoasit uzunluğunda ve 37,8 Kd ağırlığındadır (Bailey ve ark., 2005; Muthuchelvan ve ark., 2006a). M proteini, glikozlanmamış temel membran ilişkili proteindir (Bailey ve ark., 2005).

Yüzey glikoproteinlerinin stoplazmik uçlarıyla ve nükleokapsit ile ilişki halindedir. Konak hücre membranından virionun tomurcuklanması esnasında zarf formunun oluşmasından sorumludur (Gopilo, 2005). Paramyxovirus ailesi içinde yüksek korunmuşluğa sahip bir proteindir. Diğer morbillivirus M proteinleri ile karşılaştırıldığında PPRV M proteini, bu korunmuşluğu en güzel şekilde temsil eder. M proteinin bu korunmuşluğu viral morfogeneziste oynadığı önemli role atfedilmektedir. Antijenik olarak yüksek benzerliğe sahip üyelerden oluşan bir genusta böylesi önemli bir role sahip bu proteindeki bir değişiklik “tolare edilemez” olarak kabul edilmektedir (Bailey ve ark., 2005).

1.1.2.4. Füzyon (F) proteini

Paramyxoviridae ailesine ait virusların sahip olduğu iki integral ve yüzey proteinlerinden biri olup, virus-hücre ve hücre-hücre füzyonundan sorumludur (Seth ve Shaila, 2001). Virionun hücre yüzeyine tutunduktan sonra konak hücre lipoprotein yüzey membranı ile virion lipoprotein zarfın füzyonuna aracılık eder (Fields ve ark., 1990). Endozomal yolla hücreye giren viruslardan farklı olarak, Paramyxovirus F proteini düşük pH ortamına ihtiyaç duymaksızın membran füzyonunu başlatabilir (MacLachlan ve Dubovi, 2011). Enfekte hücre membranından salgılanan F proteini, hücreler arası füzyona da aracılık eder. Böylece virusun hücre dışına çıkmaksızın hücreler arası yayılımına imkân sağlar. Bu özelliği sinsitya ve dev hücre oluşumları ile kendini gösterir. Aynı zamanda F proteini viral replikasyon ve virulenste de önemlidir (Coen ve Ramig, 2000). Açık okuma çerçevesi 5526-7166. nükleotidler arasında lokalize olmuştur. Bu bölgeden, yüksek korunmuşluğa sahip 546 aminoasit uzunluğunda inaktif formda F₀ proteini sentezlenir. Virion içindeki inaktif F₀ proteini, tripsin benzeri hücresel enzimlerle post-translasyonel kesim ile aktif F₁ ve F₂ alt ünitelerine ayrılır. Hücresel enzimlerin kesim işlemi için gerekli bölge yüksek derecede korunmuştur (Lamb ve Kolakofsky, 2001). Virusun enfeksiyöz özelliğini kazanabilmesi için F₀ proteininin kesimi şarttır. Konakçı hücre post-translasyonel kesim için yeterli enzim içermiyorsa virus enfektif özelliğini kazanamaz (Murphy ve ark., 1999; Fields ve

ark., 1990). Bununla birlikte viral virulens, spesifik aminoasit proteaz tanıma motiflerinin varlığı veya yokluğu ile de ilişkilendirilir. Çünkü füzyon proteinleri viral enfektivite ve hücreden hücreye füzyon yoluyla yayılım için esastır ve Paramyxoviruslarda persiste enfeksiyonu da içine alan viral patogeneizde anahtar rol oynar. Çoğu Paramyxoviruslarda, hücre-hücre füzyonu için F proteinini ile birlikte homotipik H/HN proteinlerinin varlığı gereklidir (Seth ve Shaila, 2001). F₀ proteininin kesim işlemi ve karakteristiği değişik aileler içindeki viruslarda farklılık arz eder. Bu bakımdan Paramyxoviruslar kesim bölgesinde tek temel aminoasit ve çoklu temel aminoasit içerenler olmak üzere iki gruba ayrılır (MacLachlan ve Dubovi, 2011). Örneğin; Avian Paramyxovirus 1 (Newcastle hastalığı virusu) virulent suşu kesim bölgesinde çoklu temel aminoasit rezidüleri içerir. Bu durum F proteininin hücre içinde *trans*-Golgi ağında bir endopeptidaz olan furin tarafından kesilebilmesine imkân tanır. Bu enzimin tüm hücrelerde bulunuyor olması, Newcastle virusunun tüm hücrelerde enfeksiyon yapabilmesini sağlamaktadır. Newcastle virusunun avirulent formunun F₀ proteininin kesim bölgesinde ise tekli temel aminoasit rezidüleri bulunmaktadır. Bu yüzden virusun F₀ proteini ancak hücre dışı proteazlar ile uygun substrat tarafından ya da solunum ve gastrointestinal sistemin epitelial hücreleri içindeki tripsin benzeri enzimler tarafından aktive edilebilir. Bu sınırlı kesim işlemi virusun enfektivitesini birkaç kanatlı türüyle sınırlar ve patojenik potansiyelini azaltır (MacLachlan ve Dubovi, 2011). Kesim işlemi F₀'ın amino terminalinden 100 aminoasit uzaklıktadır. Kesim sonrası amino terminalinde kısa aminoasit dizini ve karboksi terminalinde uzun hidrofobik dizin olarak ikiye ayrılır. Daha büyük olan kesim ürünü F₁ alt ünitesi ve kısa olan F₂ alt ünitesidir (Fields ve ark., 1990). F₁ alt ünitesi füzyon domainidir ve iki önemli hidrofobik bölgeye sahiptir. Amino-terminal ucu endoplazmik retikulumda maturasyon ve golgi aparatına giriş için gerekli sinyalleri taşır. Karboksil terminali ise kesim işlemi için esansiyeldir. F proteinin C ucunu oluşturan F₂ alt ünitesi zarf ile bağlantıyı sağlayarak üç boyutlu yapıyı stabilize eder. F₁'in amino ucunun bir kısmı F₂ içine gömülüdür ancak füzyonu takiben konformasyonel değişikliklere uğradığından, amino ucunu hücre membranına geçirerek viral ve hücrel membranların birleşmesini sağlar (Coen ve Ramig, 2000).

Yüzey glikoproteini olan F ve H proteinleri konakta bağışıklığın devamını sağlayan nötralizan antikorların oluşmasından sorumludur (Diallo, 1990; Lefevre ve Diallo, 1990). H glikoproteinine karşı oluşmuş nötralizan antikorlar virusun hücre reseptörlerine bağlanmasını inhibe ederken, F proteinine karşı oluşmuş spesifik antikorlar viral enfektiviteyi engelleyebilme yeteneğine sahiptir (MacLachlan ve Dubovi, 2011). Bu özelliklerinden dolayı F ve H glikoproteinlerinin aşı üretiminde kullanılması mümkündür. F proteinine karşı oluşan antikorların, H proteinine göre daha yüksek düzeyde bağışıklık sağladığı öne sürülmektedir (Diallo, 1990; Lefevre ve Diallo, 1990).

1.1.2.5. Hemagglütinin (H) proteini

Virusun hücre zarında bulunan sialik asit reseptörlerine tutunmasından sorumlu olan yüzey glikoproteinidir. (Lamb ve Kolakofsky, 2001). Açık okuma çerçevesi 7326-9155. nükleotidler arasında lokalize olup, 609 aminoasit uzunluğunda ve 78 Kd ağırlığındadır (Lamb ve Kolakofsky, 2001). Paramyxovirus H glikoproteinleri yüksek değişkenliğe sahiptir (Blixenkrone-Moller ve ark., 1996). Aslında P proteini ile birlikte H glikoproteini en az korunmuş morbillivirus proteinlerindendir (Seth ve Shaila, 2001). H glikoproteini nöyroaminidaz ve hemagglütinasyon özelliklerine sahiptir (Seth ve Shaila, 2001). Bu biyolojik aktivite *Paramyxoviridae* ailesindeki virusların sınıflandırılmasında kullanılan kriterlerden biridir (Gopilo, 2005). Morbillivirus H glikoproteini sadece hemagglütinasyon aktivitesine sahipken, pneumovirusların H glikoproteini her iki aktiviteyi de göstermemektedir (Gopilo, 2005; Fields ve ark., 1990).

H glikoproteini tip II integral membran proteinidir. NH₂ domaini kuvvetli hidrofobiktir ve viral zarfın lipid tabakasının içine gömülmüştür. Hücre reseptörlerinin tanınması ve viral tutunmaya bağlı olarak, H glikoproteini Paramyxovirusların major antijenik determinantıdır (Seth ve Shaila, 2001).

1.1.2.6. Large (L) protein (polimeraz protein)

PPRV genomunun 9288-15839. nükleotidleri arasındaki gen bölgesinden 2183 aminoasit uzunluğunda Large (L) proteini- RNA'ya bağlı RNA polimeraz (RNA dependent RNA polimeraz; RDRP) sentezlenir. Bu bölge genomun en son ve en uzun açık okuma çerçevesidir. Bu sebeple en son ve en az transkribe olur. Tüm genomun kabaca %40'ını kapsar ve morbillivirusların en büyük proteinidir. 250 Kd ağırlığındadır (Coen ve Ramig, 2000; Diallo, 1990). L protein, transkriptaz ve replikazın enzimatik komponentidir. Multifonksiyonel özelliğe sahip olup, polimeraz aktivitesine ek olarak metilasyon, başlıklama ve poliadenilasyon aktivitelerini de yerine getirir (Lamb ve Kolakofsky, 2001). Polimeraz aktivitesi için L proteinin, RNP ve P proteini ile birlikte bir kompleks oluşturması gereklidir. Transkripsiyonel olarak aktif bir nükleokapsit, her bir L proteini için 5-10 P proteini içerir (Fields ve ark., 1990; Coen ve Ramig, 2000).

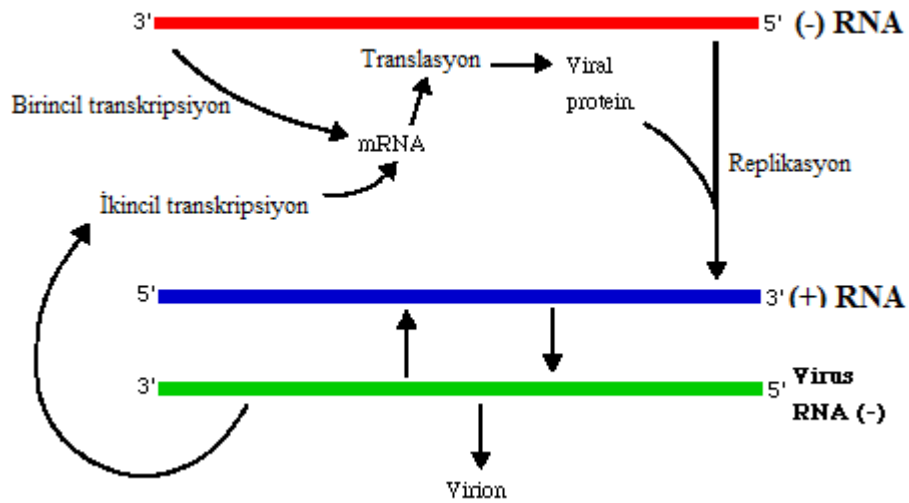
Morbilliviruslar içinde L proteini, büyük değişkenlik gösteren iki bölge ile A, B ve C olarak isimlendirilen yüksek korunmuşluğa sahip üç kısma ayrılır (McIlhatton ve ark., 1997). PPRV L proteininde de benzer bir yapılanma görülür. PPRV L proteini, B kısmında yani 771-775. aa.'ler arasında korunmuş pentapeptit (QGDNQ) motifine sahiptir. Motif içerisindeki D ve N'in korunmuşluğu, polimeraz aktivitesi için önemli olarak bildirilmiştir (Chattopadhyay ve ark, 2004).

1.1.3. Viral replikasyon

Paramyxovirusların replikasyonu sitoplazmada gerçekleşir. Replikasyonları actinomycin D varlığında ve çekirdeği alınmış hücrelerde devam edebilmektedir. Bu özellik hücre çekirdeğine ait fonksiyonlara replikasyon sırasında gereksinim duyulmadığını göstermektedir (MacLachlan ve Dubovi, 2011). Replikasyon,

virusun hemaglutinin glikoproteini ile hücre sialik asit reseptörlerine tutunmasıyla başlar (Murphy ve ark., 1999). Tutunmayı takiben F glikoproteini fizyolojik pH'da viral zarf ile plazma membranının füzyonunu gerçekleştirir (MacLachlan ve Dubovi, 2011). Nükleokapsitin konak hücre içine alınmasından sonra viral gen ekspresyonu için ilk basamak transkripsiyondur (Fields ve ark., 1990). RDRP tarafından genomik viral RNA'nın transkripsiyonunun başlatılması için hücre içine serbest bırakılmış nükleokapsitin N, P ve L proteinleri ile bir bütün olarak kalması gereklidir (MacLachlan ve Dubovi, 2011). Transkripsiyon genomun 3' ucundan başlar ve genler 3' ucundan 5' ucuna doğru sırayla kopya edilir. Gen birleşim bölgelerindeki intergenik bölgelerin varlığı, farklı bir transkripsiyon modelinin oluşmasına neden olur. Bu "Dur-Başla" modelidir. Her genin başında 10 nükleotitlik gen başlama dizinleri vardır. Buna göre bir önceki genin transkripsiyonu bitmeden, bir sonraki genin transkripsiyonu başlamaz. Gen sonlanmasını belirten dur sinyali (tetranükleotidlik bitiş dizini ve takiben çoklu U bölgesi) ve başlama sinyalleri, viral polimeraza (RDRP) poli U kuyruğunu sentezlemesi, sonlandırma ve sonraki genin transkripsiyonu için gerekli sinyalleri verir (Kawaoka, 2004). Bu sinyallerden sonra genin transkripsiyonu biter ve bir sonraki gene geçilir. İntergenik dizinler, (aynı zamanda morbilliviruslar içinde korunmuş dizinlerdir) transkripsiyon sırasında RDRP aktivitesini düzenler ve bu şekilde birbirinden bağımsız mRNA'lar sentezlenir (Coen ve Ramig, 2000). Dur-Başla modeli ile mRNA sentezi kesintili bir şekilde gerçekleştirilir. Dur-Başla komutları mRNA sentezini ve miktarını kontrol eder. Genomun 3' ucundan uzaklaştıkça sentezlenen mRNA miktarı düşer (MacLachlan ve Dubovi, 2011). Bunun nedeni, her gen kavşağında polimeraz attenüasyonu meydana gelmesi ve RDRP'nin bağlanma etkinliğinin her bağlanmada giderek azalmasıdır. Buna göre, N proteini en fazla, L proteini ise en az sentezlenen proteinlerdir. Genom tek bir promotordan 6 farklı mRNA şeklinde transkribe olur (Murphy ve ark., 1999). Yeni sentezlenmiş mRNA'lar başlıklama ve poliadenilasyon işlemine tabi tutulurlar (MacLachlan ve Dubovi, 2011). Yeni sentezlenen mRNA'ların translasyonları konak ribozomlarında gerçekleşir (Coen ve Ramig, 2000). Translasyondan ve ürünlerin birikmesinden sonra replikasyon işlemine geçilir. Birbirini takip eden transkripsiyon ve replikasyon işlemleri arasındaki denge N protein konsantrasyonu

ile ilişkilendirilmektedir. N proteinin, RDRP aktivitesini düzenlediği ve iki işlem arasındaki dengeyi sağladığı düşünülmektedir (Kawaoka, 2004). N protein konsantrasyonu kritik seviyeye ulaştığında genomik RNA'nın 3' ucundaki promotor dizin transkribe edilir ve N protein yeni oluşan RNA zincirine bağlanır. Bu durum polimerazın mesaj sonlandırma sinyallerini görmemesi yönünde değişmesine sebep olur ve böylece pozitif polariteli bütün antijenom ipliği sentezlenir. Sentezlenen bu antijenom ipliği N protein ile kompleks oluşturur ve negatif polariteli genomik RNA üretimi için kalıp olarak görev yapar. Yeni sentezlenen genomik RNA'lardan mRNA sentezinin ikinci fazı başlar ve böylece viral protein sentezi hızlı bir şekilde gerçekleştirilir (MacLachlan ve Dubovi, 2011). Morbillivirusların replikasyonu Şekil 1.6'da gösterilmiştir.



Şekil 1.6. Morbillivirusların replikasyonu (Kawaoka, 2004).

Replikasyonu takiben viral birleşme başlar. Nükleokapsit birleşmesi ilk olarak N proteinin viral genomik RNA ile birleşmesi ve takiben yardımcı nükleokapsit proteinlerinin eklenmesi ile gerçekleşir (Coen ve Ramig, 2000). Viral birleşme plazma membranında gerçekleşir ve aynı bölgeden tomurcuklanma ile enfektif partiküller serbest kalır. Virion olgunlaşması, konak hücre membranında viral glikoproteinlerin birleşmesi, matriks proteini ve diğer nonglikolize proteinlerin bu değişen konak hücre membranı ile birleşmesi, nükleokapsitin M proteini altına

sıralanması ve olgun virionun oluşup tomurcuklanması ile hücreden çıkışını kapsar (Murphy ve ark., 1999).

1.2. Epizootiyoloji

1.2.1. Konak aralığı

PPR küçük ruminantların önemli bir patojeni olup, çoğunlukla koyun ve keçilerde enfeksiyona sebep olur. Ancak sığırlarda da PPR virusuna karşı çapraz korumanın şekillendiği subklinik enfeksiyonların olduğu bildirilmiştir (Diop ve ark., 2005). Hastalık keçilerde, koyunlara göre daha şiddetli seyreder. Koyunlarda bazen herhangi bir klinik bulgu tespit edilmezken, keçilerde enfeksiyona bağlı klinik bulgu ve ölümler bildirilmiştir (Gopilo, 2005). Taylor (1984) koyunların PPRV enfeksiyonuna karşı kalıtsal olarak dirençli olmalarına rağmen, bazen saha suşları tarafından genetik direncin aşıl原因 yüksek mortaliteye neden olan salgınlara yol açabileceği hipotezini ileri sürmüştür. Yeşilbağ ve ark. (2005) Bursa ve çevresinde yaptıkları çalışmada, PPR enfeksiyonundan keçilere oranla koyunların daha çok etkilendiğini bildirmişlerdir. Bu durumu bölgede koyun yetiştiriciliğinin daha yaygın olmasına bağlamışlardır. Sığır, manda, deve ve domuzlar PPRV ile enfekte olabilirler, ancak genellikle subklinik enfeksiyon seyri gösterirler (Chauhan ve ark., 2009). Sığırların PPRV ile subklinik olarak enfekte edildiği kabul edilir. Ancak kondisyonu düşük olan sığırlarda enfeksiyonu takiben RP'ye benzer klinik belirtiler gözlenmiştir. Deneysel olarak PPRV ile enfekte edilen buzağılarda klinik hastalık ve takiben ölüm şekillendiği de bildirilmiştir (OIE, 2012).

Etiyopya'da 1995 yılında develerde, RP benzeri yüksek bulaşıcılığa sahip hastalık tablosu ile karakterize bir salgın sonrasında PPR virusa karşı antikor varlığı tespit edilmiştir (Roger ve ark., 2001).

Hindistan’da klinik olarak 385 mandanın %13’ünün etkilendiği, konjunktival konjesyon, yoğun salya akıntısı ve depresyon belirtileriyle karakterize RP benzeri bir salgından PPRV izole edildiği bildirilmiştir (Govindarajan ve ark., 1997; Chauhan ve ark., 2009).

PPRV, hem doğal yaşam ortamında hem de deneysel olarak yabancı hayvanlarda enfeksiyon oluşturmaktadır. Antilop ve diğer küçük yabancı ruminantlar hastalıktan şiddetli olarak etkilenmektedir (Abu Elzein ve ark., 2004). Ceylan (*Gazella dorcas*), yaban keçisi (*Capra ibex nubiana*), Güney Afrika ceylanı (*Oryx ceylan*) ve Laristan koyunlarındaki (*Ovis oryantal laristanica*) ölümlere bağlı olarak klinik hastalık bildirimi yapılmıştır. Amerikan beyaz kuyruklu geyiklerin (*Odocoileus virginianus*) deneysel olarak enfekte edildikleri rapor edilmiştir. (Hamdy ve Dardiri, 1976; Wohlsein ve Saliki, 2006). Gür ve Albayrak (2010) Şanlıurfa’daki bir hayvancılık işletmesinde bulunan siyah kuyruklu ceylanlardan [Goitered Gazelle (*Gazella subgutturosa subgutturosa*)] aldıkları 82 adet serum örneğinin 10 adedini cELISA ve VNT ile PPRV spesifik antikorları yönünden pozitif bulmuşlar ve hastalığın ceylanlardaki varlığını Türkiye’de ilk defa göstermişlerdir.

Balamurugan ve ark. (2012), Asya aslanına (*Panthera leo persica*) ait donmuş dokuda tespit ettikleri virusun N, F ve M genlerinin kısmi dizin analizlerine göre IV. genetik hata ait PPRV olduğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda bu rapor Asya aslanlarında PPRV izolasyonu ile ilgili ilk bildirim olmuştur.

PPRV enfeksiyonuna yakalanmış hayvanlarla temasta olan insanlar hastalık yönünden herhangi bir risk taşımamaktadır. Şimdiye kadar henüz PPRV ile ilgili insanlarda bir enfeksiyon bildirimi olmamıştır (OIE, 2012).

1.2.1.1. Bulaşma ve yayılım

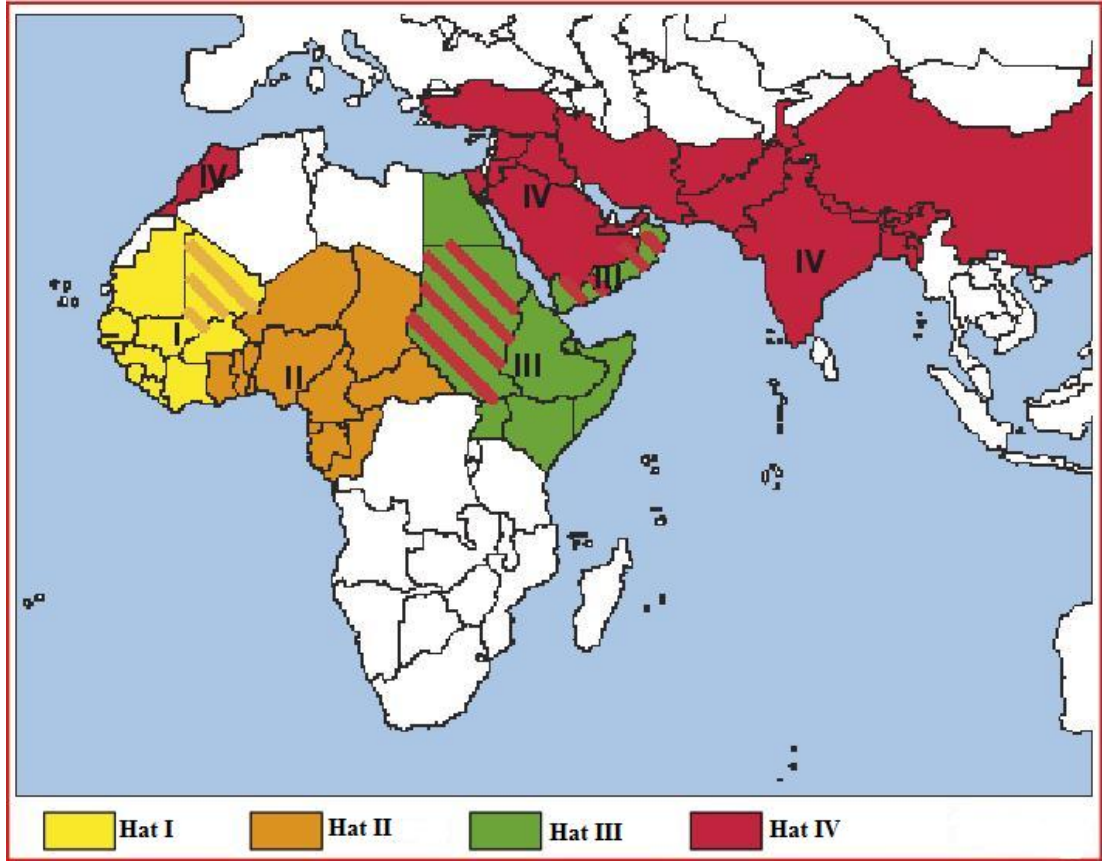
PPRV dış ortamda hastalık yapabilme yeteneğini kısa sürede yitirdiğinden, bulaşmadaki en önemli yol, sürü içinde bulunan akut ateşli dönemdeki hastaların duyarlı hayvanlarla olan yakın temasıdır (Gopilo, 2005). Hasta hayvanların göz, burun ve ağız akıntıları ile dışkısı yüksek miktarlarda virus içermektedirler. Bu sekret ve ekskretler yoluyla (özellikle enfekte hayvanların aksırma ve tıksırmaları ile) küçük enfektif damlacıklar ortama yayılır ve duyarlı hayvanlar bu damlacıkları solunum yolu ile almak suretiyle hastalığa yakalanırlar (Gopilo, 2005). Olumsuz hava koşullarında keçi ve koyunların bir araya toplanmaları yakın teması beraberinde getirdiğinden, enfeksiyonun bulaşması için önemli bir fırsat oluşturmaktadır (Albayrak, 2007). Yakın temas hastalığın yayılmasında önemli bir yol olmakla birlikte, kontamine yatak, yemlik ve sular da ek bir bulaşma kaynağı oluşturmaktadırlar. Ancak RP virusuna benzer şekilde PPR virusunun canlılığını dış ortamda uzun süre koruyamaması, yağ çözücülere karşı hassasiyeti kontamine materyal ile bulaşma riskini azaltmaktadır (Gopilo, 2005).

Ezeibe ve ark. (2008) PPR enfeksiyonu sonrası dışkının virus saçılımındaki rolünü belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada, enfeksiyon sonrası iyileşen 40 keçinin 11. haftaya kadar PPRV hemagglutininlerini, 9 keçinin de viral antiijenleri saçmaya devam ettiklerini tespit etmişlerdir. Bu çalışma dikkate alındığında, kontrolsüz hayvan hareketleri sonucunda yer değiştiren doğal enfekte hayvanların duyarlı populasyonlar için büyük bir risk oluşturabileceği akla gelmektedir.

Güncel bir konu olarak PPR virusun yayılımında yaban hayatın rolü dikkatleri üzerine çekmektedir. Ancak henüz yeterli epidemiyolojik verilerin olmamasından dolayı daha detaylı araştırmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Baron ve ark., 2011).

1.2.2. Coğrafiik dağılım

PPR ilk tespitinin ardından Atlantik okyanusu ile Kızıldeniz arasındaki Afrika ülkelerinin çoğunda tespit edilmiştir (Lefevre ve Diallo, 1990). Etkilenen bölgeler Doğu Afrika'da kuzeyde Mısır; güneyde Kenya; Batı Afrika'da Gabon'a kadar uzanmaktadır (Chauhan ve ark., 2009). Moleküler tekniklerin yardımıyla Sudan (2000), Uganda (2007) ve yakın geçmişte Tanzanya'dan (2008 ve 2010) izole edilen virusların III. genetik hata dahil oldukları tespit edilmiştir (Banyard ve ark., 2010). PPR hemen hemen tüm Orta Doğu ülkeleri ile Türkiye'de tespit edilmiştir (Chauhan ve ark., 2009; Özkul ve ark., 2002). Hastalık Hindistan ve Güney Batı Asya'da yaygın bir şekilde görülmektedir (Shaila ve ark., 1989). Günümüzde Sahara ve Ekvator arasındaki geniş bölgede yer alan Afrika ülkelerinin çoğunda, Orta Doğu ülkelerinde (Arap yarımadası, İsrail, Suriye ve Ürdün) ve Hint yarımadasında hastalığın varlığı bildirilmiştir. Nepal, Hindistan, Bangladeş, Pakistan ve Afganistan'da PPR salgınlarının olduğu bilinmektedir (Abdollahpour ve ark., 2006). PPR virusun 4 farklı genetik hattının coğrafiik dağılımı Şekil 1.7'de gösterilmiştir.



Şekil 1.7. PPRV'nin 4 farklı genetik hattının coğrafik dağılımı (Minet ve ark., 2009)

Türkiye'nin Trakya bölgesinde PPRV enfeksiyonunun tespiti virusun bilinirliğine ve Avrupa'nın diğer bölgelerine yayılma potansiyelinin sorgulanmasına neden olmuştur (Özkul ve ark., 2002; Banyard ve ark., 2010). Ayrıca Türkiye, Hindistan, İran, Irak'da son yıllarda görülen büyük salgınlar PPR virusun küresel insidensinde dikkate değer bir artışın olduğunu göstermektedir (Banyard ve ark., 2010). Enfeksiyon yıllardır Asya ve Afrika'da salgınlar şeklinde hüküm sürmekte iken, son yıllarda Avrupa Birliği sınırlarına yakın bölgelerde de rapor edilmesi, hastalığa olan ilginin hem bilimsel çevrelerde hem de medyada artmasına sebep olmuştur. Buna örnek olarak, Fas'taki PPR salgını ve Kuzey Afrika'daki PPRV enfeksiyonunun potansiyel varlığı nedeniyle Güney Avrupa'ya enfekte hayvanların geçiş riskinin artması verilebilir. Tarihsel olarak Fas ve İspanya arasında varolan koyun ve keçi ticareti oldukça önemlidir. Bu yüzden hastalığın başarılı bir şekilde kontrol edilebilmesi için, Avrupa ülkelerinde de sürveylans çalışmalarının sürdürülmesinin gerekliliği ortaya çıkmaktadır (Minet ve ark., 2009).

1.2.3. Klinik belirtiler

PPRV enfeksiyonunda, çeşitli faktörlere (hayvanın türü ve yaşı, virusun virulensi ve miktarı, sekonder enfeksiyonların gelişimi vb.) bağlı olarak perakut, akut ve subakuta kadar değişen farklı klinik tablolar gözlenir (Diallo, 1988; Lefevre ve Diallo, 1990). Enfekte koyun ve keçiler biraz şiddetli olmakla birlikte RPV ile enfekte sığırların göstermiş olduğu klinik belirtilere benzer bir tablo sergiler. Enfekte sürüdeki mortalite oranı hayvanın türü, yaşı ve sekonder enfeksiyonların varlığı ile ilişkili olarak %10-90 arasında değişir. Koyun ve keçi ırkları arasında değişik derecelerde PPRV enfeksiyonuna karşı doğuştan bir direnç olmakla birlikte, yaşa bağlı direnç mortalite oranlarını etkilemektedir. Öyleki kuzu ve oğlaklarda hemen hemen %100 oranında ölüm görülürken, gençlerde %40, yetişkinlerde ise %10 civarında görülmektedir. İnkübasyon periyodu virus miktarı ve enfeksiyon yoluna bağlı olarak ortalama 3-9 gün arasında değişir (Baron ve ark., 2011). Enfeksiyonu takip eden 3-4 günlük inkübasyon süresince virus orofarengeal lenf yumrularında replike olduktan sonra kan ve lenf yolu ile affinite duyduğu primer organlardan öncelikle akciğer olmak üzere diğer doku ve organlara yayılır (Gibbs ve ark., 1979). Bu süre sonunda, vücut ısısında 40-41,5°C derecelere ulaşan artış görülür. Ateş yükselmesinden birkaç gün sonra ölümle sonuçlanan perakut form nadiren görülür.

Yaygın olarak görülen akut formda, ateş bir haftaya kadar uzar ve hastalığa ait semptomlar bu formda görülür. Bu dönemde lökopeni, ağız, burun ve göz mukozasında konjesyon ile göz-burun akıntısı dikkati çeker. Beyaz hücre sayısı referans değerlerin yaklaşık %10 kadar altında kalır ve ancak nekahat döneminde normal seviyesine döner. Ateşin yükselmeye başlamasından sonra ağız ve vajina mukozasında nekrotik lezyonlar görülmeye başlar. Başlangıçta küçük gri-beyaz renkte ve nokta şeklindeki nekroz odakları zamanla büyür ve yayılırlar. Önce yanak ve alt dudağın iç kısmında, bazen bunlara ek olarak dilin üst ve yan kenarlarında görülür. Ağız ve yanaklardaki nekrotik odaklar hızla erozyona uğrar ve sarı-mat beyaz renkli hücre yıkıntılarıyla örtülü bir hal alır. Ardından yangılı dokudan salınan eksudat ile kabuk bağlar. Erozyonlar farenks ve dilin alt yüzüne doğru yayılabilirler.

Hasta hayvanlarda aşırı salivasyon ve su tüketimi görülür. Ancak çiğneme ve yutmaya bağlı güçlüklerden dolayı, yem alma azalmış ya da durmuştur. Hastalar huzursuz, depresif ve anorektiktir. Yüzeysel solunum yaparlar ve nefes kötü kokuludur (Baron ve ark., 2011). Solunum güçlüğüne bağlı olarak baş ve boynu ileri uzatma, burun deliklerini açma, dili dışarı çıkarma ve hafif iniltili bir öksürük gözlemlenir. Başlangıçta seröz karakterde olan ağız, burun ve göz akıntıları sekonder bakteriyel enfeksiyonlarla yoğun ve sarı renkli bir hal alır. Bu akıntılar çeneyi ve gözaltı kıllarını ıslatır ve sonrasında kurur. Bu kuruma göz kapaklarının yapışmasına, burun tıkanmasıyla da nefes almada güçlüğe neden olur (FAO, 1999). Enfeksiyonun başlamasından 1-3 gün sonra ishal görülür. Ölüm genellikle hastalığın başlamasından 5-12 gün sonra gerçekleşir. Enfeksiyon sırasında gebe olan anneler yavru atabilir. Nekahat dönemi birkaç hafta sürebilir ve bu dönem zarfında beyaz kan hücreleri normal seviyelerine yavaş yavaş geri dönerler. Ağızdaki lezyonlar 2-3 hafta gibi bir sürede iyileşir. Enfeksiyon sırasında beyaz kan hücrelerinin miktarındaki geçici azalma bağışıklık sisteminde genel bir zayıflamaya neden olduğundan, latent ya da kronik enfeksiyonların ve diğer patojenlerce oluşturulan ikincil enfeksiyonların ortaya çıkmasına zemin hazırlamaktadır (Baron ve ark., 2011).

PPR enfeksiyonunun subklinik formunda, akut formda olduğu gibi belirgin bir klinik tablo gözlenmez. Hafif solunum sistemi bozuklukları ve arasıra görülen dalgalı ateş dışında önemli bir klinik belirti tespit edilemez. Bu belirtilerin şiddeti hayvanın yaşı, türü ve bireysel direncine göre değişir. Hastalık 10-15 gün sürer. Subklinik formun son evresinde diş etleri, ağız, dil, burun mukozası ve yanak papillalarında papülöz ve püstülöz benzeri patolojik değişiklikler gözlenir. Bazen bu papül benzeri lezyonlara derinin kılsız bölgelerinde de rastlanır (Lefevre ve Diallo, 1990; Gül ve ark., 2006). Hastada görülen deri lezyonlarının (papüller) çiçekle, ağız lezyonlarının ektima ile karıştırılma ihtimali söz konusudur (Gül ve ark., 2006).

Hastalığın subakut formu, 1-2 gün süren vücut ısısında ılımlı bir artış ile birlikte, 2-3 gün süren ve fazla dikkat çekmeyen mukozal akıntı ile karakterizedir. Hastalığın bu formunda ölüm görülmez (Diallo, 2006).

1.3. Patogenez

PPRV lenfotropik ve epiteliyotropik karakterde olduğundan, en şiddetli lezyonlar lenfoid ve epitel dokudan zengin organ sistemlerinde görülür (Abubakar ve ark., 2011; Scott, 1981). Nazofarengeal mukoza PPR virusunun konakçıya bulaşmasındaki en önemli giriş yoludur. Damlacık enfeksiyonlarına bağlı olarak aerosol yolla vücuda üst solunum yolundan giren virus, diğer doku ve organlara buradan yayılır. Bu yüzden enfekte akciğer dokusu yüksek oranda virus içerir. Aerosol yolla bulaşmayı takiben başta tonsillerde olmak üzere, farengeal ve mandibular lenf nodüllerinde primer enfeksiyon şekillenir (Baron ve ark., 2011). Viremi, enfeksiyondan 2-3 gün sonra, klinik belirtilerin görülmesinden 1-2 gün önce gelişir. Viremiyi virusun dalak, kemik iliği, solunum ve gastrointestinal sisteme yayılımı izler (Abubakar ve ark., 2011; Scott, 1981). Dokularda virusun replikasyonu sonucu hastalığa özgü lezyonlar şekillenir (Baron ve ark., 2011). Klinik belirtiler ortaya çıkmadan önce ağız, burun ve göz akıntıları ve idrar ile virus saçılmaktadır. Ayrıca ishal semptomlu koyunlarda da gaitadan virus saçılımı olmaktadır (Brown ve ark., 1991; Ezeibe ve ark., 2008). Lenfoid dokulardaki lenfositlerin yıkımı sonucu oluşan lökopeniye bağlı olarak immunsupresyon şekillenir (Baron ve ark., 2011). Akut hastalık lenfopeni, immunsupresyon ve sonrasında ikincil bakteriyel enfeksiyonlarla birlikte seyreder (Abubakar ve ark., 2011).

Yapılan çalışmalar koyun ve keçilerde PPRV ile enfekte hücrelerin apoptozisinin, enfeksiyonun patogenezisinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Örneğin keçi periferik mononükleer kan hücrelerinin PPRV ile in-vitro enfeksiyonunun çekirdek yoğunlaşması ve parçalanması, DNA'nın parçalanması,

plazma membranında baloncuk oluşumu şeklinde patolojik değişikliklere yol açarak apoptosise neden olduğu gösterilmiştir (Abubakar ve ark., 2011).

1.3.1. Teşhis

PPR kontrol programlarının etkili bir şekilde uygulanabilmesi için enfeksiyonun teşhisinde hızlı, spesifik, duyarlı laboratuvar metotlarının kullanımı çok önemlidir (Diallo ve ark., 1995). Hastalık sığır vebası, şap, pastöröllosis, ektima, çiçek, keçi plöyropnömonisi, mavidil, koksidirosis, kolibasillois, zehirlenmeler, kriptosporodiosis ve pestivirus enfeksiyonları ile karışabilmektedir. Klinik bulgular göz önünde bulundurularak enfeksiyondan şüphe edilmesine rağmen, kesin teşhis için laboratuvar kontrolleri şarttır (Diallo, 1988; Scott, 1990). Laboratuvar kontrollerinin esasını viral antijen tespiti, virus izolasyonu, nükleik asit tespiti ve 14 gün ara ile alınan serum örneklerinde spesifik antikorların tespit edilmesi oluşturur (Gopilo, 2005). Bu amaçla laboratuvarlarda çok sayıda serolojik ve virolojik teknikler kullanılmaktadır (Abubakar ve ark., 2011).

1.3.1.1. Örneklerin toplanması

Teşhis amacıyla laboratuvara örnek göndermede öncelikle materyallerin alınacağı hayvanlar doğru bir şekilde tespit edilmelidir. Ölmüş ya da ileri derecede ishalin şekillendiği hayvanlardan alınan örnekler yeterli miktarda virus içermediğinden teşhis için uygun değildir. Virolojik teşhis amacıyla; canlı ve beden ısısı yüksek hayvanlardan akut viremik safhada defibrine kan, oral, nazal, konjunktival swap örnekleri, lenf yumrusu biyopsi materyali, ölen ve/veya öldürülen hayvanlardan akciğer, dalak, lenf yumrusu alınabilir. Alınan örnekler en kısa sürede, soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Virus izolasyon şansının arttırılması için özellikle canlı hayvanlardan viremi fazında ve sekonder etkenler olaya karışmadan örnekler alınmalıdır. Ölen hayvanlardan alınan örnekler virus izolasyonu için

genellikle uygun olmamakla birlikte, izolasyonun zorunlu olduğu durumlarda, ortam ısısına bağlı olarak en geç iki saat içinde alınmalı ve laboratuvara ulaştırılmalıdır (Lefevre ve Diallo,1990; Durajoiye ve Lefevre, 1996; Diallo ve ark., 1995).

1.3.1.2. Virusun identifikasyonu

1.3.1.2.1. Viral antijen tespiti

PPRV antijenleri immunocapture ELISA (ICE), counter immunoelectrophoresis (CIEP) ya da agar gel immunodiffusion (AGID) testleri ile tespit edilebilir. CIEP ve ICE testleri PPR ve RP viruslarını birbirinden ayırt edebilir ancak, AGID bu ayrımı yapmakta yetersizdir. Ayrıca AGID testi sensitivitesi düşük olduğundan, hafif seyreden PPR olgularında düşük miktardaki viral antijenleri tespit etmede başarısızdır. AGID ve ICE testleri için hazır ticari kitler mevcuttur. Konjunktival swap ve doku örneklerinden antijen tespitinde immunfloresan testi kullanılabilir (FAO, 1999).

1.3.1.2.2. Virus izolasyonu

Duyarlı hücre kültürlerinde virus izolasyonu mümkün olmakla birlikte, zahmetli ve zaman alıcı olması nedeniyle rutin teşhiste kullanılabilecek bir yöntem değildir. Hızlı sonuç veren tekniklerin yanında hücre kültüründe virusun izolasyonu ancak daha sonraki çalışmalarda virusun kullanımı açısından önemlidir (OIE, 2012). PPRV, kuzu böbrek ve kuzu akciğer hücre kültürlerinde izole edilebilmektedir. Ancak sözü edilen hücre kültürlerinde başarılı bir şekilde virus izolasyonu yapabilmek için birden fazla kör pasajlamaya gereksinim duyulabilmektedir. Son zamanlarda bir haftadan daha kısa bir sürede ve kör pasajlamaya gereksinim bırakmayan morbillivirus reseptörleri eksprese eden hücre hattı (Vero, CV1) derivatları geliştirilmiştir. Bunlardan monkey cell line CV1 derivatları goat SLAM,

Vero hücresi derivatları dog SLAM eksprese etmektedirler (OIE, 2012). Bunun yanında devamlı hücre kültürlerinden Vero, MDBK (Madine Darby Bovine Kidney), 293T (Transformed human embryo kidney) ve BHK-21 (Baby Hamster Kidney-21) hücreleri de izolasyonda kullanılmaktadır (Özkul ve ark., 2002; Gülyaz ve Özkul, 2005; Gopilo, 2005). Theleria parva yoluyla transforme edilen T lenfoblast hücre kültürlerinin diğer hücre kültürleri ile karşılaştırıldığında, RPV ve PPRV izolasyonu için daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Gopilo, 2005).

1.3.1.2.3. Nükleik asit tespiti

Reverse transcriptase polimerase chain reaction (RT-PCR) teknikleri, PPR virusunun spesifik teşhisi için değişik gen bölgelerini hedef almakla birlikte özellikle N ve F gen bölgelerinin amplifikasyonu temeline dayanmaktadır (Couacy-Hymann ve ark., 2002; Forsyth ve Barrett, 1995). Bu teknik, Vero hücre kültüründe klasik virus titrasyonundan 1000 kez daha duyarlı bulunmuştur (Couacy-Hymann ve ark., 2002). Ayrıca virus izolasyonu 10-12 gün gibi bir süre alırken RT-PCR, RNA ekstraksiyonu da dahil 5 saat gibi kısa bir sürede sonuç vermektedir. Ayrıca N ve M gen bölgelerinin amplifikasyonuna dayalı multipleks RT-PCR tekniği de kullanılmıştır (George ve ark., 2006). N gen bölgesini hedef alan RT-PCR tekniğinin diğer bir şekli de, PCR ürünlerinin işaretli problemlerin kullanıldığı ELISA yöntemiyle pleyt üzerinde tespit edilmesidir (Saravanan ve ark., 2004; Kumar ve ark., 2007). Bu teknik, (RT-PCR-ELISA tekniği) klasik RT-PCR tekniğine göre 10 kez daha duyarlı bulunmuştur. Son yıllarda PPRV enfeksiyonunun teşhisi için kullanılan nükleik asit amplifikasyon metotları real time RT-PCR (rRT-PCR) tekniği ile daha duyarlı hale getirilmiştir (OIE, 2012). Bu metot konvansiyonel RT-PCR ile karşılaştırıldığında 10 kez daha duyarlı bulunmuş, ayrıca kontaminasyon riskinin minimum seviyelere indirildiği bildirilmiştir. Bu amaçla N, M ve F genlerini hedef alan rRT-PCR teknikleri geliştirilmiştir (Bao ve ark., 2008; Balamurugan ve ark., 2010; Kwiatak ve ark., 2010; Munir ve ark., 2012).

PPRV enfeksiyonunun teşhisinde nükleik asit izotermal amplifikasyon uygulamaları Li ve ark. (2010) tarafından tanımlanmıştır. Bu tekniğin sensitivitesi rRT-PCR tekniğine benzerlik göstermektedir. İzotermal amplifikasyon, uygulaması kolay, hızlı ve sonuçların çıplak gözle değerlendirilebilmesi gibi avantajlara sahiptir (OIE, 2012).

1.3.1.2.4. Serolojik testler

Virus nötralizasyon ve competitive ELISA (C-ELISA) testleri serolojik teşhis amacıyla kullanılmaktadır. Her iki test PPRV enfeksiyonunu RPV enfeksiyonundan ayırabilmektedir. C-ELISA spesifitesi (%99.8) ve sensitivitesi (%90.5) yüksek olduğundan PPRV enfeksiyonunun serolojik teşhisi için en uygun testtir (Al-Moslih, 2012).

1.3.2. Ayırıcı teşhis

Yüksek ateş, mukoz membranlarda hemoraji ve erozyonlar, ishal ve bronchopneumonia ile karakterize olgularda, klinik olarak PPR'dan şüphe edilse de, aynı zamanda contagious caprine pleuropneumonia (CCPP), pastöröllosis, mavidil, ektima, çiçek, şap, koksidiyosiz, kriptosporidyosiz, kolibasilloz gibi hastalıklar her zaman dikkate alınmalıdır (FAO, 1999).

Mavidil hastalığında ağız mukozasında görülen inflamasyon, erozyon, ülserasyon ve nekrozlar PPR'a benzerse de, dilin siyanotik renk alması, coronitis ve pododermatitis klinik olarak PPR enfeksiyonunda görülmez.

Koyun-keçi çiçeğinde oluşan göz burun akıntısı ve konjunktivitis belirtileri PPR'a benzerlik gösterse de, derinin kılsız bölgesinde meydana gelen klasik çiçek lezyonları klinik ayırıcı teşhiste en önemli bulgulardır (Baron ve ark., 2011).

Şapta solunum problemleri ve ishalin olmayışı, ağız mukozasına ilaveten tırnak aralarında vezikül ve aftların varlığı ile birlikte salyanın mukoid özellik göstermesi hastalığın PPR'dan ayrılmasını sağlar (FAO, 1999).

CCPP hastalığı ise sadece keçilerde görülmesi, ateş, güç solunum ve öksürüğün varlığına rağmen ağız lezyonları ve ishalin olmayışı ile PPR'dan ayrılır (FAO, 1999).

1.3.3. İmmunoloji

PPRV antijenik olarak RPV ile yakın ilişkili olduğundan iki virus arasında çapraz koruma mevcuttur (Taylor, 1979). Homolog PPR aşısı geliştirilinceye kadar PPR'a karşı koruyucu amaçla doku kültürü RPV aşısı kullanılmıştır (Diallo, 2004). Seksenli yılların sonuna doğru homolog PPRV aşısı, Nigeria/75/1 suşunun, Vero hücre kültüründe seri pasajları sonrasında başarılı bir şekilde attenué edilmesiyle üretilmiştir (Diallo ve ark., 1989). Aşının, saha denemelerinde oldukça güvenli olduğu, gebe hayvanlarda bile rahatlıkla kullanılabileceği bildirilmiştir (Diallo ve ark., 1995).

Koyun ve keçiler ekonomik hayatları boyunca muhtemelen PPRV ile birden fazla enfekte olmazlar. Nigeria/75/1 aşı suşuyla yapılan aşılama koyun ve keçilerde %100'e varan bağışıklık oluşmakta ve 12 ay süreyle devam etmektedir (Awa ve ark., 2002). Bağışıklıktan nötralizan antikorlar sorumludur. Enfeksiyonun 16. gününde PPRV spesifik nötralizan antikorları saptanmıştır (Gülyaz ve ark., 2005). Aşılı annelerden doğan kuzu ve oğlaklarda maternal antikorlar 6. aya kadar tespit edilebilmektedir; ancak kuzularda 3,5 ay, oğlaklarda ise 4,5 aya kadar koruma

sağlayabilmektedir. Bu nedenle kuzuların 4. ay, oğlakların ise 5. ayda bağışık hale getirilmesi gereklidir (Awa ve ark., 2002). Hastalığı atlatan hayvanlarda immunitenin ömür boyu sürdüğü kabul edilmektedir (OIE, 2012).

1.4. Koruma ve kontrol

PPR salgınlarının kontrolü temel olarak karantina, aşılama ve risk gruplarının koruyucu immunizasyonunu kapsar (Abubakar ve ark., 2011). Hayvan hareketlerinin kontrolünün, hastalığın yaygın olarak görüldüğü yerler olan Orta Doğu, Afrika ve Asya'da başarıyla uygulanması zordur. Bu nedenle aşılama PPRV enfeksiyonunun kontrolünde en temel yol olarak kabul edilir (Diallo, 2003). Homolog canlı aşı güvenilirliği, uzun süre bağışıklık sağlaması ve termostabil olması gibi birçok avantaja sahiptir. Ancak enfeksiyonu atlatmış ve aşılanmış hayvanların serolojik olarak birbirinden ayırt edilmesinde yetersizdir (Diallo, 2003). RPV enfeksiyonunun başarılı bir şekilde eradikasyonundan sonra dikkatler PPRV enfeksiyonunun eradikasyonuna yoğunlaşmıştır. Kullanılmakta olan canlı attenué aşı ile elde edilen bağışıklık, mevcut ve kullanılmakta olan serolojik testler ile doğal enfeksiyon sonucu kazanılan bağışıklıktan ayıramamaktadır. Bu durum RP eradikasyon çalışmasında olduğu gibi, planlanacak PPR eradikasyon çalışmalarında geriye dönük serolojik araştırmalarda karışıklıklara sebebiyet verecektir. Doğal enfekte hayvanların tanımlanmasına olanak sağlayan differentiation of infected from vaccinated animals (DIVA) stratejisine hizmet eden rekombinant aşılar geliştirilmiştir. DIVA aşılar hastalığın eradikasyonunda çok önemli bir yer tutmaktadır. Enfeksiyon sırasında dominant antikor cevabı H glikoproteini ve N proteinine karşı oluşmaktadır. Ancak yalnızca H glikoproteinine karşı şekillenen antikorlar nötralizan özelliğe sahiptir. Muhtemel bir DIVA aşısında rekombinant virus ile PPRV H proteininin ekspresyonu sağlanarak spesifik antikor cevabının alınması amaçlanmıştır. Böylece enfeksiyonu atlatanlarda N proteini ve H glikoproteinine karşı antikorlar gelişirken aşılanmış hayvanlarda sadece H glikoproteinine karşı antikor yanıtı alınacaktır (Baron ve ark., 2011). Geçmişte değişik morbillivirusların H ve F proteinlerinin heterolog canlı virus vektör sistemleriyle ekprese edildiği ve aşı olarak etkin olduğu gösterilmiştir (Abubakar ve

ark., 2011). PPRV F proteini eksprese eden attenué Capripoxvirus KS1 suşu ile yapılan rekombinant aşının düşük dozlarda (0,1 PFU) bile etkin olduğu gösterilmiştir (Berhe ve ark., 2003). Benzer şekilde PPRV H ya da F proteinleri eksprese eden rekombinant capripoxvirus rekombinant aşısı geliştirilmiş ve PPRV enfeksiyonuna karşı uzun süreli immun yanıt oluşturduğu gösterilmiştir (Chen ve ark., 2010). Diğer bir çalışmada attenué modifiye vaccinia virus Ankara suşu (MVA) PPRV immunojenleri için vektör olarak kullanılmıştır. PPRV F ve H glikoproteinlerini eksprese eden MVA-F ve MVA-H isimli iki rekombinant virus geliştirilmiştir. Bu aşilar ile keçilerin PPR'dan kesin bir şekilde korunduğunun tespit edilmiş olması PPRV eradikasyonu için yoğun aşılama çalışmalarında her iki aşının ya da bir tanesinin kullanılabilirliği için olumlu bir işaret olarak değerlendirilmiştir (Chandran, 2010). Poxvirusun vektör olarak kullanıldığı bu tür aşiları uygularken dikkat edilmesi gereken bir husus; doğal olarak sirküle olan poxviruslara karşı daha önceden oluşmuş immun yanıtın aşiların stratejilerini sekteye uğratma ihtimalidir (Abubakar ve ark., 2011).

Hastalık başladıktan sonra PPRV kontrolü için takip edilebilecek antiviral tedavi RNA interference (RNAi) kullanarak gen ekspresyonunun durdurulmasıdır. İn-vitro PPRV ve RPV inhibisyonu sentetik kısa interfere edici RNA'lar (short interfering RNAs - siRNAs) kullanılarak gösterilmiştir (De Almeida, 2007). PPRV ve RPV N geni hedef alan siRNA'lar in vitro olarak virus replikasyonunda %80 oranında azalmaya sebep olmuştur. PPR virusunun iki korunmuş bölgesi olan NPPRV6 ve NPPRV7'yi hedef alan siRNA'lar PPRV replikasyonunda inhibisyona, CPE oluşumu, immunfloresan boyama ile tespit edilen viral antijen, viral titre ve tespit edilebilen viral RNA miktarında azalmaya neden olmuşlardır (Abubakar ve ark., 2011).

Sujatha ve ark., (2009) tarafından araştırılan diğer bir antiviral terapi ise PPR virusuna karşı 4, 4'-(arylmethylene)bis(3-methyl-1-phenyl-pyrazol-5-ols) etkinliğidir. Bu sentetik bileşik PPR virusuna karşı mükemmel bir antiviral aktivite göstermiş ve kullanımda olan ribavirinden daha etkin olduğu tespit edilmiştir.

Enfeksiyonun görülmediği ülkelerde olası PPRV enfeksiyonunun kontrolü, enfekte bölgelerden koyun ve keçi alımlarının durdurulması, karantina, hayvan kesimi, karkasların uygun bir biçimde imhası gibi klasik yöntemlerle yapılabilir (Gopilo, 2005).

Ülkemizde PPR, 21 Ekim 1997 tarih ve 23147 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı’nın 1997/10 No’lu tebliği ile ihbarı mecburi hastalıklar listesine alınmıştır. Bu tebliğe göre şüpheli her vaka mutlaka takip edilmeli, hastalık görülmesi durumunda derhal ihbarı yapılmalıdır. Hayvan hareketlerinin kontrolü, karantina tedbirlerinin uygulanması ve hasta hayvanların imhası için ilgili kanun hükümleri uygulanmalıdır.

1.5. Türkiye’de PPRV enfeksiyonunun durumu

PPRV enfeksiyonu, Türkiye’de küçük ruminantların önemli, enfeksiyöz hastalıklardan biridir. Enfeksiyonun Türkiye’deki varlığı ilk olarak 1993 yılında enfekte kuzularda patomorfolojik ve immunohistolojik bulgulara dayanılarak ortaya konulmuştur (Alçıgır ve ark., 1996). Ardından Tatar (1998) tarafından hastalığın serolojik olarak varlığı gösterilmiştir. OIE tarafından da PPR’in Türkiye’deki varlığı 1999 yılında bildirilmiştir (FAO, 1999).

Özkul ve ark. (2002) PPRV enfeksiyonunun dağılımını, prevalansını ve konak aralığını araştırdıkları çalışmalarında, seropozitiflik oranını koyunlarda %29,2 (315/1077), keçilerde %20 (42/209) olarak tespit etmişlerdir.

Ülkede sirküle olan virusa ait tam dizin analizi 2000 yılında enfekte bir koyundan izole edilen PPRV TU00 izolatu için 2004 yılında gerçekleştirilmiş, söz konusu virusun Orta Doğu, Arabistan ve Asya’dan orijin alan IV. genetik hatta ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 1.8) (Bailey ve ark., 2005).

Gül ve ark. (2006) ektima ve çiçek benzeri lezyonlarla karakterize olgularda PPRV enfeksiyonunun da dikkate alınması gerektiğini vurgulayarak, erken teşhis şansının artacağını ve yayılım riskinin azalacağını bildirmişlerdir.

Kul ve ark. (2007) tarafından Kırıkkale ilinde, 15 farklı sürüden gelen 15 koyun ve 6 keçi üzerinde gerçekleştirilen çalışmada PPR'ın patolojik ve virolojik bulguları tanımlanmış ve RT-PCR sonucu F genine ait 488 bp genom fragmenti 18 olguda elde edilmiştir. Bu çalışma ile elde edilen izolatların nükleotid dizilimleri, 2004 yılında tam dizin analizi yapılan Türkiye'ye ait TU00 izolatı ile karşılaştırıldığında 5999. (G→C) ve 6083. (C→T) nükleotitlerdeki 2 mutasyon tüm dizinlerde tespit edilmiştir. Ancak aminoasit dizilimlerinde hiçbir değişiklik gözlenmemiştir.

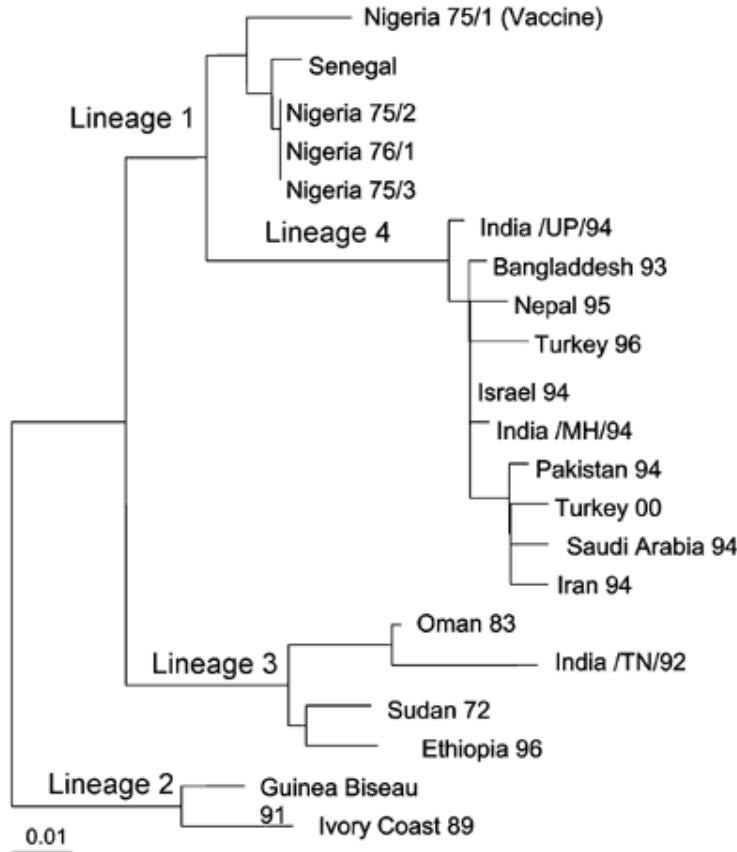
Albayrak (2007) PPRV enfeksiyonunun epidemiyolojisine yönelik yaptığı çalışmada, Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinde örneklenen hayvanlarda ve illerde seroprevalansın sırasıyla %14,9 ve %3,5-38,2 olduğunu tespit etmiştir.

Gür ve Albayrak (2010) Şanlıurfa'da yeralan bir kamu işletmesinde bulunan siyah kuyruklu ceylanlardan [*Goitered Gazelle (Gazella subgutturosa subgutturosa)*] alınan kan serum örneklerinde %10 oranında PPRV spesifik antikorların varlığını tespit ederek Türkiye'de ilk kez ceylanlarda PPR enfeksiyonunun varlığını göstermişlerdir.

Aktaş ve ark. (2011) Erzurum ilinde PPRV enfeksiyonu ile ilgili ölüm oranlarını değerlendirdikleri çalışmada, süt emen kuzularda (%100) ölüm oranını genç (%24) ve yetişkinlerden (%50) daha yüksek olarak tespit etmişlerdir.

Bu çalışmalara ek olarak Marmara (Yeşilbağ ve ark., 2005) ve Ege (Toplu, 2004) bölgelerinde hastalığın varlığına dair bildirimler yapılmıştır.

Serolojik ve moleküler epidemiyolojik teknikler ile elde edilen veriler, hastalığın Türkiye’de yaygın bir şekilde varlığını ve aktif olarak komşu ülkelerde sirküle olan PPR virusunun sınırdan geçerek ülkeye girişinin mümkün olabileceğini göstermiştir. Coğrafik konumundan dolayı Türkiye, endemik olarak hastalığın görüldüğü birkaç ülke ile komşudur. Bu sebeple Doğu ve Güney Anadolu sınırlarında kontrolsüz hayvan hareketlerinden dolayı enfeksiyonun ülkeye girişinin ve yayılımının kontrolü oldukça zordur (Özkul ve ark., 2002; Banyard ve ark., 2010). Ancak yapılan epidemiyolojik çalışmalar ile birlikte karantina ve aşılama gibi kontrol programlarının kısa sürede alınmasıyla enfeksiyonun yayılımının önüne geçilebilecektir.



Şekil 1.8. Turkey2000 izolatının F gene dayalı filogenetik ilişkisi (Özkul ve ark. 2002)

1.6. Amaç

Planlanan bu çalışmada, Türkiye'nin değişik bölgelerinde yetiştirilen koyun ve keçilerde PPRV enfeksiyonunun prevalansının belirlenmesi ve PPRV enfeksiyonuyla ilgili olarak güncel verilere ulaşılması ve enfeksiyonun rutin tanısında kullanılan Fusion (F) gen bölgesini hedef hedef alan RT-PCR tekniği ile Nükleoprotein (N) gen bölgesini hedef alarak yapılacak konvansiyonel ve Real-Time RT-PCR tekniklerinin karşılaştırılması ve enfeksiyonun tanısında hızlı, spesifik ve duyarlı teşhis tekniklerinin ortaya konulması ile enfeksiyonun kontrol/eradikasyonunda alınması gerekli tedbirlerin uygulanmasına katkıda bulunmak hedeflenmiştir. Ayrıca araştırmada elde edilecek viruslar ile her iki gen bölgesi hedef alınarak yapılacak moleküler karakterizasyon çalışması, Türkiye'de sirküle olan viruslar ve genetik yakınlıklarının ortaya konulabilmesi açısından epidemiyolojik anlamda önemli verilere ulaşılması hedeflenmiştir.

Çizelge 2.1. PPRV enfeksiyonu şüpheli örneklerin yıl ve tür bazında dağılımları

Örnek Alınan Yıllar	Koyun	Keçi	Toplam
2012	53	21	74
2011	339	50	389
2010	81	30	111
Toplam	473	101	574

Çizelge 2.2. PPRV enfeksiyonu şüpheli örneklerin yıl ve çeşit bazında dağılımları

Örnek Alınan Yıllar	Doku	Kan	Nasal Swap	Toplam
2012	55	19	0	74
2011	242	140	7	389
2010	77	34	0	111
Toplam	374	193	7	574

Çizelge 2.3. PPRV enfeksiyonu şüpheli örneklerin illere göre dağılımı

Örneklenen İllerin kodları	Örneklenen İller	Test Edilen Örnek Sayısı	Hayvan Türü	Alınan Örnekler		
				Doku	Kan	Nasal Swap
01	Adana	27	Keçi		27	
02	Afyon	7	Koyun	7		
03	Ağrı	2	Koyun	2		
04	Amasya	3	Koyun	3		
05	Ankara	7	Koyun	7		
06	Antalya	1	Koyun	1		
07	Aksaray	2	Koyun	2		
08	Aydın	4	Koyun	4		
09	Balıkesir	52	Koyun	24	19	1
			Keçi	5	3	
10	Bilecik	6	Koyun	5	1	
11	Bingöl	1	Koyun	1		
12	Bitlis	1	Koyun	1		
13	Burdur	1	Koyun	1		
14	Bursa	36	Koyun	17	12	1
			Keçi	4	2	
15	Bolu	1	Koyun	1		
16	Çanakkale	42	Koyun	26	10	
			Keçi	3	3	
17	Düzce	3	Koyun	3		
18	Diyarbakır	1	Koyun	1		
19	Edirne	24	Koyun	13	6	
			Keçi	4	1	
20	Elazığ	8	Koyun	8		
21	Erzincan	1	Koyun	1		
22	Erzurum	2	Koyun	2		
23	Giresun	2	Koyun	2		
24	Hatay	25	Koyun		10	
			Keçi		15	
25	Isparta	2	Koyun	2		
26	İstanbul	47	Koyun	20	16	1
			Keçi	7	3	
27	İzmir	30	Koyun	17	7	
			Keçi	4	2	
28	Karaman	1	Koyun	1		
29	Kars	10	Koyun	10		
30	K.Maraş	19	Koyun	7	5	1
			Keçi	6		
31	Kırıkkale	25	Koyun	25		
32	Kırklareli	38	Koyun	18	16	1
			Keçi	3		
33	Kocaeli	27	Koyun	11	8	1
			Keçi	3	4	
34	Konya	10	Koyun	10		
35	Kütahya	4	Koyun	4		
36	Malatya	3	Koyun	3		
37	Manisa	21	Koyun	14	7	
38	Muğla	2	Koyun	2		
39	Niğde	1	Koyun	1		
40	Osmaniye	3	Koyun	3		
41	Sakarya	30	Koyun	15	13	
			Keçi	2		
42	Samsun	5	Koyun	5		
43	Siirt	4	Koyun	4		
44	Sinop	3	Koyun	3		
45	Sivas	1	Koyun	1		
46	Şanlıurfa	2	Koyun	2		
47	Tekirdağ	13	Koyun	9	3	1
48	Tokat	10	Koyun	10		
49	Tunceli	1	Koyun	1		
50	Yalova	3	Koyun	3		
TOPLAM		574		374	193	7

2.1.2. Virus

Çalışmada, konvansiyonel ve Real-Time RT-PCR tekniğinde kontrol virus olarak Nigeria/75/1 aşısı suşunu içeren ticari PPRV aşısı (Vetal Pestvac K) kullanıldı.

2.1.3. Kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 2.4'te liste halinde verildi.

Çizelge 2.4. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Agaroz	Prona, EU
EDTA	Merck, Almanya
Etidyum bromür	Sigma, ABD
Mutlak etanol	Merck, Almanya
Tris HCL	Merck, Almanya
Tris base	Merck, Almanya
DNA maker	Fermentas, Litvanya

2.1.4. Ticari kitler

Çalışmada nükleik asit ekstraksiyonu ve dizin analizi öncesi hazırlık için kullanılan ticari kitler Çizelge 2.5'te liste halinde verildi.

Çizelge 2.5. Çalışmada kullanılan ticari kitler

High Pure Viral RNA Kit (Kat. No: 11 858 882 001)	Roche, Almanya
High Pure PCR Product Purification Kit (Kat. No: 11 732 668 001)	Roche, Almanya
Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Kat. No: 210212)	Qiagen, Almanya
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Lot. No: 1103317)	Qiagen, Almanya

2.1.5. Cihazlar

Çalışma süresince kullanılan laboratuvar cihazları Çizelge 2.6’da liste halinde verildi.

Çizelge 2.6. Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları

Soğutmalı santrifuj	Sigma, ABD
Vortex	Heidolph Reax Top, Almanya
Termal Cyclers	Techne, İngiltere
Termal Cyclers	Thermo, İngiltere
Roche LightCycler 2.0	Roche, Almanya
ABI 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, ABD
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, ABD
Picodrop Spektrofotometre	Picodrop, İngiltere
Hassas terazi	Presica, İsviçre
pH metre	Metler Toledo MP, İsviçre
Jel Görüntüleme Sistemi	Poloroid, GelCam, UK

2.2. Yöntem

2.2.1. Virolojik kontrol amacıyla alınan örneklerin hazırlanması

2.2.1.1. Kan örneklerinin hazırlanması

Çalışmada kullanılan ticari ekstraksiyon kiti (High Pure Viral RNA Kit, Roche, Almanya) ile antikoagulanlı tüplere alınan tam kan örnekleri direkt olarak RNA ekstraksiyonunda kullanıldı.

2.2.1.2. Doku ve nasal swap örneklerinin hazırlanması

Virolojik kontrol amacıyla alınan doku örnekleri, 1/10 oranında PBS içeren bir tüpe alındı, homojenizatörde homojen hale getirildi. Swap örnekleri vortekslendi. Doku ve swap örnekleri 3000 rpm’de santrifüj edildi ve üst kısım RNA ekstraksiyonunda kullanıldı.

2.2.2. Viral RNA Ekstraksiyonu

PPRV RNA’sı, sahadan elde edilen kan, nasal swap ve doku örneklerinden (lenf yumrusu, akciğer, dalak, rektum ve ince barsak) ticari High Pure Viral RNA Kiti (Roche, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda elde edildi. Buna göre;

1. Homojenat haline getirilen örnekten 200 µl alınarak 1,5ml'lik eppendorf tüpe konuldu. Üzerine 200µl Binding buffer, 50µl Proteinase K, 4µl polyA eklendi ve vorteks yardımıyla karıştırıldı. Bu karışım 72°C'de 10 dakika inkube edildi.
2. Kit içindeki column tüplere silika jelli tüpler yerleştirilerek birleştirildi. Hazırlanan karışım bu tüplere aktararak 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonrası altta sıvı biriken column tüp atıldı. Üstteki silika jelli tüp yeni column tüplere yerleştirildi. Üzerine 500 µl Inhibitor Removal Buffer eklenip 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası altta sıvı biriken column tüp atıldı. Üstteki silika jelli tüpler yeni column tüp içine yerleştirildi. Üzerine 450 µl Wash Buffer eklendi ve 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu basamak bir kez daha tekrar edildi. Ardından filtrede kalan etanolün tamamen uzaklaştırılması için 13000 g'de 10 saniye santrifüj edildi.
5. Daha sonra silika jelli tüp yeni bir 1.5ml'lik eppendorf tüp içine yerleştirildi ve üzerine daha önceden 70°C'de ısıtılmış Elution Buffer'dan 50 µl eklendi ve 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Son olarak üstteki silika jelli tüp atıldı ve eppendorf tüp içindeki ekstrakt, PCR testinde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

2.2.3. Konvansiyonel RT-PCR

Konvansiyonel RT-PCR, ticari OneStep RT-PCR kiti (Qiagen, Almanya) ve 2 farklı primer çifti kullanılarak gerçekleştirildi. PPRV F proteinini kodlayan genin tespitinde Özkul ve ark. (2002), N proteinini kodlayan genin tespitinde ise Kerur ve ark. (2008) tarafından bildirilen yöntemler modifiye edilerek kullanıldı. Ticari

OneStep RT-PCR kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak optimizasyon gerçekleştirildi. Böylece her iki primer seti için aynı ısı protokolü ve PCR karışımı kullanıldı. Çalışmada kullanılan primer dizinleri ve ısı protokolü Çizelge 2.7 ve Çizelge 2.8’de verildi.

Çizelge 2.7. Konvansiyonel RT-PCR tekniğinde kullanılan primer setleri

Primer	Primer dizisi	Hedef gen	Pozisyon	Ürün büyüklüğü	Referans
F1(F)	5’ AGTACAAAAGATTGCTGATCACAGT 3’	F gen	5737–5761	448bp	(Özkul ve ark. 2002)
F2(R)	5’ GGGTCTCGAAGGCTAGGCCCGAATA 3’	F gen	6184–6160		
N1(F)	5’ GATGGTCAGAAGATCTGCA 3’	N gen	1208-1226	463bp	(Kerur ve ark., 2008)
N2(R)	5’ CTTGTCGTTGTAGACCTGA 3’	N gen	1652-1670		

Çizelge 2.8. Konvansiyonel RT-PCR tekniğinde kullanılan PCR karışımı ve ısı protokolü

Bileşen	Konsantrasyon	Kullanılan Program
Deiyonize su	6,4 µl	50°C’de 30 dk 95°C’de 15 dk 94°C’de 1 dk 50°C’de 1 dk 72°C’de 2 dk 72°C’de 10 dk 40 siklus
5x	4 µl	
Q sol	4 µl	
Primer-forward (20 pmol / µl)	0,5 µl	
Primer-reverse (20 pmol / µl)	0,5 µl	
DNTP	0,8 µl	
Enzim mix	0,8 µl	
RNA	3 µl	
Total	20 µl	

2.2.4. Real-Time RT-PCR (rRT-PCR)

N gen bölgesini hedef alan test, Kwiatek ve ark. (2010)’nın bildirdiği yöntem modifiye edilerek yapıldı. Araştırmacılar tarafından FAM-BHQ şeklinde önerilen prob, FAM-TAMRA olarak modifiye edildi. rRT-PCR amplifikasyonu ve tespiti Roche LightCycler 2.0 Real-Time PCR (Roche, Almanya) cihazında gerçekleştirildi. Bu amaçla kullanılan primer ve prob seti Çizelge 2.9 ve PCR karışımı Çizelge 2.10’da gösterildi.

Çizelge 2.9. Real Time RT-PCR tekniğinde kullanılan primer ve prob seti

Primer	Primer dizisi	Pozisyon	Referans
Forward Primer PPRNF	(5'- GAGTCTAGTCAAAACCCTCGTGAG-3')	1438-1461	Kwiatek ve ark., 2010
Taqman prob PPRNP	(FAM-5'- CGGCTGAGGCACTCTTCAGGCTGC-3'-TAMRA	1472-1495	
Reverse Primer PPRNR	(5'- TCTCCCTCCTCCTGGTCCTC-3')	1208-1226	

Çizelge 2.10. Real Time RT-PCR tekniğinde kullanılan PCR karışımı ve ısı protokolü

Bileşen	Konsantrasyon	Kullanılan Program
Deiyonize su	7,4 µl	50°C'de 30 dk 95°C'de 15 dk 95°C'de 15san 50°C'de 45 san) 45 siklus 40°C'de 30 san
5x	4 µl	
MgCl ₂	1 µl	
Primer – forward (10pmol / µl)	1 µl	
Primer- reverse (10pmol / µl)	1 µl	
Prob (5pmol / µl)	1 µl	
DNTP	0,8 µl	
Enzim mix	0,8 µl	
RNA	3 µl	
Total	20 µl	

2.2.5. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla, ethidium bromide içeren (Sigma, ABD) %1'lik agaroz jel (Prona, EU) hazırlandı. Hem tank tamponu hem de agaroz jel hazırlanmasında TAE (Tris Asetat - Ethylenediaminetetraacetic acid) tamponu kullanıldı. 0,5 x TAE solüsyonu içinde ısı yardımıyla (mikro dalga fırın) çözülen agaroz, yaklaşık 50-55 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, üzerine 0,5 µg/ml oranında ethidium bromide (Sigma, ABD) konuldu ve karıştırıldı. Jel tarakları yerleştirilmiş olan jel taşıyıcısına bu karışım döküldü. Yaklaşık 15 dakika sonra donmuş jelden taraklar çıkarılıp, jel taşıyıcı tanka yerleştirildi. PCR ürünleri yükleme boyası (6x Loading Dye, Fermentas, Litvanya) ile 1 kısım boya + 5 kısım PCR ürünü olacak şekilde karıştırılarak agaroz jele yüklendi. Ürün büyüklüğünün yaklaşık olarak belirlenebilmesi için 100 bp'lik marker (Fermentas, Litvanya) solüsyonundan (1 kısım stok marker + 1 kısım yükleme boyası + 4 kısım su) en dıştaki kuyucuklara 1 µl yüklendi. Daha sonra ürünler yaklaşık 30 dakika, 8 Volt/cm

elektrik akımına tabi tutuldu. Jel görüntüleme sistemi (Polaroid, GelCam, UK) kullanılarak PCR sonucu oluşan DNA bantları görüntülendi.

2.2.6. PCR ürünlerinin saflaştırılması

Bu amaçla, her iki gen bölgesi hedef alınarak yapılan konvansiyonel RT-PCR testinde pozitif olarak bulunan örneklerden kaliteli PCR ürününe sahip olanlar, örneklenen illeri temsil edecek sayıda seçildi. PCR ürünlerinin saflaştırılması amacıyla %1'lik agaroz jel ve geniş uçlu taraklar kullanıldı. Kuyucuklara 20 µl'den az olmamak üzere 5 kısım PCR ürünü ile 1 kısım 6x yükleme boyası bir parafilm üzerinde karıştırılarak konuldu. Jele 8 Volt/cm elektrik akımı uygulanarak 30 dakika süreyle DNA ürünlerinin ilerlemesi sağlandı. Elektroforez sonrasında UV ışık altında görüntülenen jelde hedef gen ürünlerinin bulunduğu bantlar, steril bir bisturi yardımıyla jelden kesilerek ayrıldı ve 1,5 ml'lik steril eppendorf tüplere konuldu. Elde edilen jel parçalarına High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Almanya) kullanılarak, firma tarafından önerilen prosedüre göre saflaştırma işlemi uygulandı. Buna göre; kesilen jel ile eşit hacimde bağlanma solüsyonu (Binding Buffer) jelin bulunduğu tüpe konuldu. Tüp 60 °C'de 15 dakika, jel tamamen eriyene kadar inkube edildi ve her 5 dakikada bir olmak üzere tüpler vortekslendi. Süre sonunda tüp içindeki sıvı, silika jel içeren tüplere aktarıldı. Bir dakika 10000 rpm'de santrifüj işlemini takiben tüpler, 700µl yıkama solüsyonu ile 2 kez yıkandı. Tüpler boş olarak 5 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. Silika jel tabakasının oda ısısında kurumması ve etanolün tamamen uçması beklendikten sonra, DNA 30µl elution solüsyonu veya RNAase-DNAase'dan arındırılmış su ile sulandırıldı. DNA'nın eldesi için tüplere 12000 rpm'de santrifüj işlemi uygulandı. İşlem sonunda elde edilen saflaştırılmış DNA'lar dizin analizinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

2.2.7. Dizin analizi

Saflaştırılan PCR ürününden Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, ABD) ve ABI 3130xl DNA Analyser (Applied Biosystem, ABD) ile dizin analizi gerçekleştirildi. Bu işlem için aşağıdaki aşamalar takip edildi:

2.2.7.1. BigDye® Terminator v3.1 için reaksiyon karışımının hazırlanması

1- Dizin analizi yapılacak her bir örnek için aşağıdaki tabloya göre reaksiyon karışımı toplamda 10 µl olacak şekilde hazırlandı (Çizelge 2.11).

2- Tek veya çift zincirli DNA örnekleri için aşağıdaki PCR programı kullanılarak, GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, ABD) PCR cihazında amplifikasyon gerçekleştirildi. DNA dizin analizi reaksiyon karışımı ve ısı protokolü Çizelge 2.11’de gösterildi.

Çizelge 2.11. Dizin analizinde kullanılan reaksiyon bileşenleri ve program

DNA Dizi Analizi Reaksiyon Karışımı			Program ve Döngü Sayısı
Reagent	Konsantrasyon	Hacim (1x)	96 °C’de 1 dk 96 °C’de 10 sn 50 °C’de 5 sn 60 °C’de 4 dk } x25
Big Dye Ready Reaction Premix	2.5x	2 µl	
Big Dye Sequencing Buffer	5x	2 µl	
Primer	5 pmol/µl	2 µl	
DNA	1-100 ng	2 µl	
Deiyonize su	-	2 µl	
Toplam hacim	1x	10 µl	

2.2.7.2. Receiver Spin Column Saflaştırılması için Sephadex Hazırlanması

Sephadex solüsyonu hazırlarken dizin analizine alınacak her örnek için 1 g Sephadex, 14 ml deiyonize su içinde eritildi. Sephadexin şişmesi ve jel kıvamına gelmesi için solüsyon, kolon işleminden yaklaşık 1 saat önce hazırlanıp, 4°C'de saklandı.

2.2.7.3. Receiver kolonun hazırlanması

1. Sephadex jelden 0.7 ml kolonun dip kısmına pipet yardımıyla bırakıldı.
2. 0.7 ml deiyonize su eklendi ve kolonun altındaki kapak çıkarıldı.
3. Kolon toplama tüpüne yerleştirilip vortekslendi.
4. 4600 rpm'de (ya da 730 x g), 2°C'de, 2 dakika santrifüj edildi. Sonra collection tüpte toplanan sıvı döküldü ve kolon tekrar tüpe yerleştirildi. Bu arada sıvının tümü santrifüj edildiğinden jel kristalize hal aldı.
5. Kristalize olmuş jele pipet ucu temas ettirilmeden amplifiye edilen PCR ürününden 10 µl aktarıldı. Bu arada jelde çatlak olup olmadığı kontrol edildi.
6. Yine 4600 rpm'de (ya da 730 g), 2°C'de, 2 dakika santrifüj edildi. Collection tüpte santrifüj sonrası biriken sıvıdan 10 µl alınıp, genetik analiz cihazının pleytine yerleştirildi.

7. Dizin analizi işlemine geçildi.

Ham veriler Applied Biosystem tarafından sağlanan özel yazılım SeqScape v2.5 ve AB DNA Sequencing Analyser Software v5.2 ile analiz edilerek DNA dizinleri belirlendi.

2.2.8. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Filogenetik Analiz

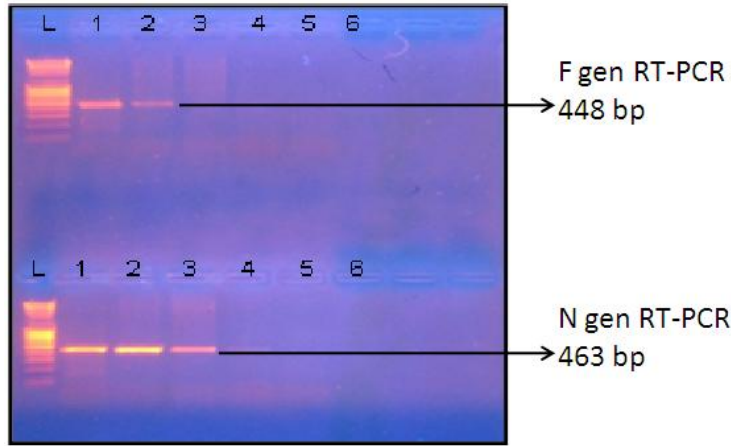
Analiz sonrası elde edilen ham veriler, National Center Biotechnology Information (NCBI) servisinin Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) web sayfasında sağlanan (BankIt: GenBank Submissions) hizmetten yararlanılarak tanımlandı. Dizinler, Bioedit (Version 7.0.5.3) ve Clustral W yazılımı (Hall, 1999) kullanılarak kendi aralarında karşılaştırıldı. Aynı programın çoklu hizalama (multiple alignment) özelliğinden yararlanılarak PPR virusunun hatlarını ifade eden referens virusların (F gen için HQ197753, X74443, FN995206, FN995999, FR667554, FR667555, AJ849636 ve N gen için HQ197753, HQ131963, EU267274, EU267273, DQ840171, DQ840174, DQ840183, DQ840168, DQ840159, AJ849636) ve komşu ülkelere ait virusların dizinleri ile hizalandı ve sonuçlar karşılaştırıldı. Filogenetik analizler, Nigeria/75/1 aşı suşu, Turkey2000 suşu ve diğer ülkelere ait PPRV suşları ile çalışmada elde edilen saha suşları arasındaki genetik yakınlığı ortaya koymak amacıyla nükleik asit dizinleri üzerinden gerçekleştirildi. Filogenetik analiz için MEGA v5.0 (Tamura ve ark., 2011) programı kullanıldı. Bu amaçla fasta formatına çevrilen tüm verilere (gerek bu araştırmadan elde edilen ve gerekse Gen Bankasından sağlanan PPRV N ve F gen kısmi dizinleri) Neighbour-Joining metoduna göre bootstrap analizi (1000 replicates) yapıldı. Analizde Tamura'nın 2'li parametresi kullanıldı ve bootstrap değerleri filogenetik harita üzerinde gösterildi.

3. BULGULAR

3.1. PCR sonuçları

3.1.1. Konvansiyonel RT-PCR sonuçları

Çalışmada kan, nasal swap ve doku örneklerinden PPRV N ve F gen bölgelerine yönelik yapılan konvansiyonel RT-PCR sonuçları Çizelge 3.4. de gösterildi. Buna göre 50 ilden alınan 574 adet PPRV enfeksiyonu şüpheli örneğin %39,3 (226/574) N gen RT-PCR ile, %35,5 (204/574) F gen RT-PCR ile pozitif olarak tespit edildi. Elde edilen ampliconlara ait agaroz jel görüntüleri Şekil 3.1’de gösterildi.

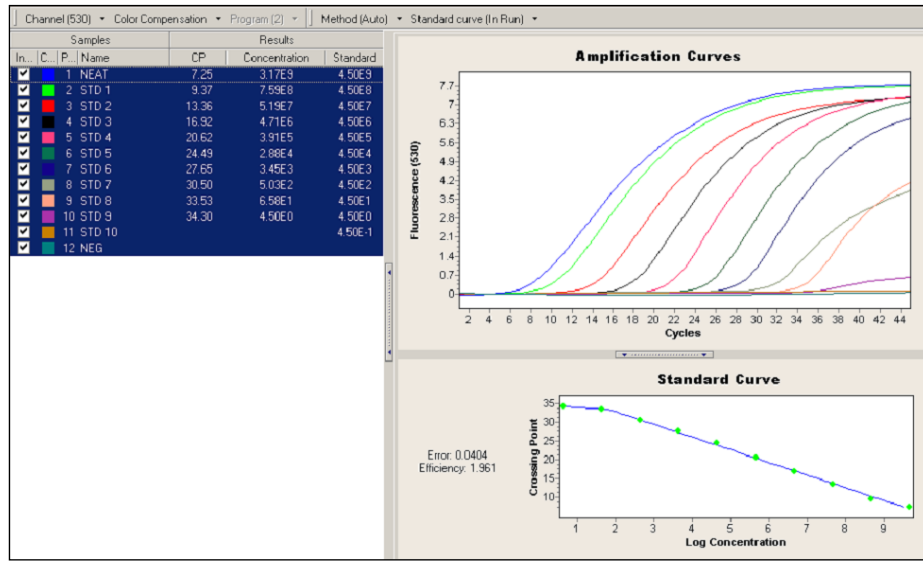


Şekil 3.1. PPRV F ve N gen bölgesi yönünden yapılan RT-PCR görüntüsü(L: DNA Ladder 100bp; 1: Pozitif kontrol; 2, 3, 4, 5: Saha örnekleri; 6: Negatif kontrol)

3.1.2. Real-Time RT-PCR tekniğinin sensitivitesi

Primer-prob setinin minimum tespit limitini belirlemek için standart eğri, $1,5 \times 10^9$ kopya/ul PPRV cDNA'sı içeren numuneden 10 katlı dilüsyonlar hazırlanarak çizildi

(Şekil 3.2). En düşük tespit limiti 34,30 CT değeri 4,5 cDNA kopyası olarak tespit edildi. CT değerleri ile cDNA konsantrasyonları arasındaki ilişki $9.37/4,5 \times 10^8 - 34,30/4,5 \times 10^0$ değerler arasında lineer olarak tespit edildi. Regresyon değeri $R^2 = \%98,7$ olarak hesaplandı ve testin tekrarlanabilir olduğu görüldü. Testin efficiency değeri; $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ eşitliğinden $E = (10^{-1/-3,240} - 1) \times 100 = \%100$ olarak hesaplandı.



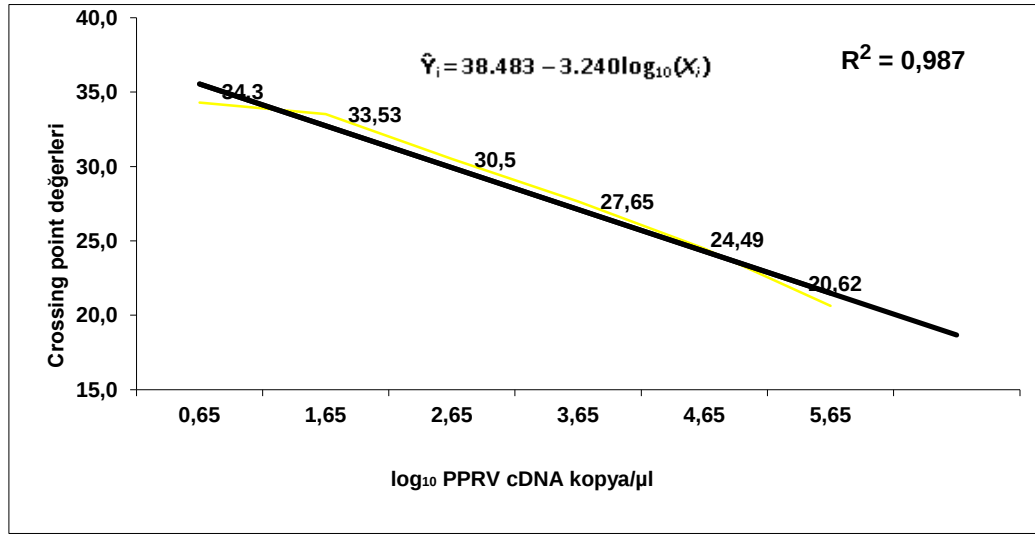
Şekil 3.2. Real Time RT-PCR tekniğinin sensitivitesi

3.1.3. Standart eğrinin oluşturulması

Mikrolitredeki PPRV cDNA konsantrasyonu $1,5 \times 10^9$ kopya olan stoktan 10^{-1} - 10^{-9} dilüsyonları hazırlandı. Dilüsyonlardan elde edilen kopya sayıları standart eğrinin oluşturulmasında kullanıldı. Hazırlanan dilüsyonlarda viral yükteki azalmanın doğrusallık gösterdiği görüldü (Çizelge 3.1 ve Şekil 3.3).

Çizelge 3.1. Real-Time PCR testinde sulandırılmalarda reaksiyona giren cDNA sayısı ve reaksiyon sonucunda elde edilen crossing point değerleri

Viral RNA sulandırma oranları	$\log_{10}$ PPRV cDNA kopya sayıları	PPRV cDNA konsantrasyonu/ μ l	Crossing point Değerleri
10^{-1}	8,65	$4,5 \times 10^8$	9,37
10^{-2}	7,65	$4,5 \times 10^7$	13,36
10^{-3}	6,65	$4,5 \times 10^6$	16,92
10^{-4}	5,65	$4,5 \times 10^5$	20,62
10^{-5}	4,65	$4,5 \times 10^4$	24,49
10^{-6}	3,65	$4,5 \times 10^3$	27,65
10^{-7}	2,65	$4,5 \times 10^2$	30,50
10^{-8}	1,65	$4,5 \times 10^1$	33,53
10^{-9}	0,65	$4,5 \times 10^0$	34,30



Şekil 3.3. Real Time RT-PCR tekniğinin standart eğrisi

3.1.4. Standart eğriye ait verilerin istatistiksel analizi

Standart eğrinin oluşturulması için elde edilen verilerin istatistiksel analizinde basit doğrusal regresyon yöntemi kullanıldı. Basit doğrusal regresyon analizinde crossing point değerleri bağımlı değişken ve PPR viral genom kopya sayıları $\log_{10}$ tabanına dönüştürüldü ve bağımsız değişken olarak belirtildi. SPSS 11.5 paket programında istatistiksel analizler yapıldı (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. EKK yöntemi ile standart eğri verilerine ait parametre tahminleri ve önem testleri

Değişkenler	Katsayılar	Standart Hata	t	P
Crossing point Değerleri(Y _i)	38. 834	0.755	50.977	0.000
Logaritmik dönüştürülmüş konsantrasyon değerleri(X _i)	-3.240	0.142	-22.830	0.000
R ² = %98,7				

Hedef gen için crossing point değeri, logaritmik dönüştürülmüş konsantrasyon değerleri arasında ilişkiyi gösteren basit doğrusal regresyon modeli;

$$\hat{Y}_i = 38.483 - 3.240 \log_{10}(X_i) \text{ şeklinde oluşturulmaktadır.}$$

Regresyon denklemine göre, logaritmik dönüştürülmüş konsantrasyonun, bir birim arttığında crossing point değerinin -3.240 azalması beklenildi. Verilere ait varyans analiz tablosu (Çizelge 3.3) incelendiğinde, elde edilen regresyon modelinin istatistiki olarak önemli bulunduğ u görüldü (p<0.01).

Çizelge 3.3. Standart eğriye ait varyans analiz tablosu

V.K. ¹	S.D. ²	K.T. ³	K.O. ⁴	F
Regresyon	1	629.986	629.986	521.202**
Hata	7	8.461	1.209	
Genel	8	638.447		

¹ Varyasyon kaynakları

² Serbestlik derecesi

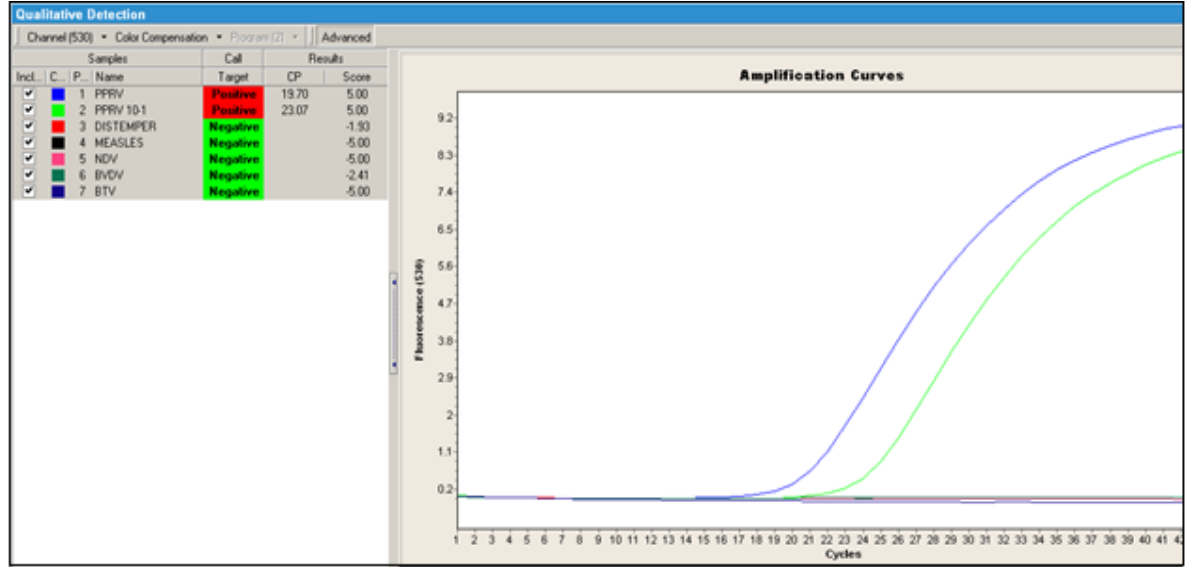
³ Kareler toplamı

⁴ Kareler ortalaması

** p<0.01

3.1.5. Real Time RT-PCR (rRT-PCR) Tekniğinin Spesifitesi

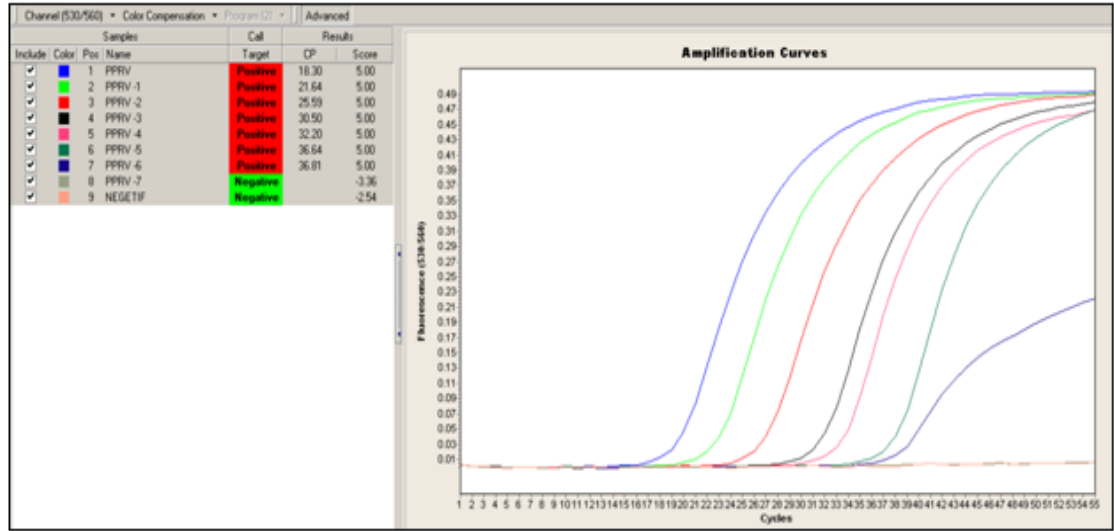
Tekniğin spesifitesi PPRV, diğer morbilliviruslar (canine distemper, measles virus) ve ilişkili olmayan viruslar (BTV, BVDV) ile doğrulandı. Bu amaçla pozitif kontrol virusu olarak Measles virus için Measles, Mumps, Rubella viruslarını içeren ticari aşı (Sera Institute of India Ltd); Distemper için Distemper, Parvovirus ve Parainfluenza viruslarını içeren ticari aşı (Nobicac DHPPI); Newcastle virus için 2010 AI/NDV yeterlilik testi için Weybridge U.K.'dan temin edilen suş, BTV ve BVDV için laboratuvarında mevcut pozitif örnekler kullanıldı. Spesifik amplifikasyon sinyali yalnızca PPRV ve PPRV 10^{-1} için sırasıyla 19,70 ve 23,07 CT olarak tespit edildi. Diğer morbilliviruslar ve ilişkili olmayan viruslar için herhangi bir amplifikasyon sinyali alınmadı. BTV ve BVDV ile herhangi bir çapraz reaksiyon gözlenmedi. Real Time RT-PCR tekniğinin spesifitesi Şekil 3.4'de gösterildi.



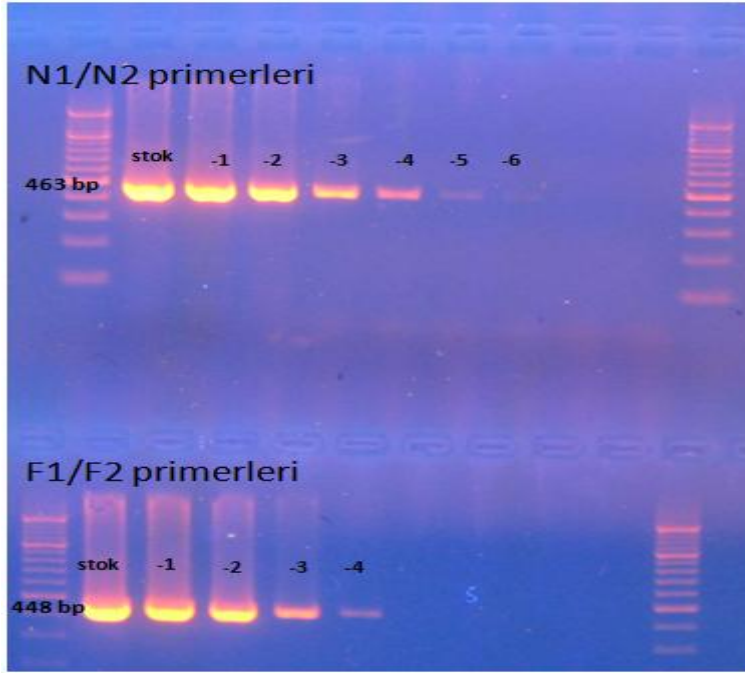
Şekil 3.4. Real Time RT-PCR tekniğinin spesifitesi

3.1.6. RT-PCR tekniklerinin performanslarının karşılaştırılması

F ve N gen bölgelerini hedef alan konvansiyonel RT-PCR ile rRT-PCR tekniklerinin performanslarını karşılaştırmak için, PPRV içeren stoktan RNA ekstraksiyonu yapılarak 10 katlı dilüsyonları hazırlandı. RRT-PCR sonucu CT değeri 36,81 ile 10^{-6} dilüsyon pozitif bulunurken, N ve F gen bölgelerini hedef alan konvansiyonel RT-PCR testlerinde sırasıyla 10^{-6} ve 10^{-4} dilüsyon pozitif olarak tespit edildi (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6).



Şekil 3.5. Real Time RT-PCR tekniğinin sensitivitesi



Şekil 3.6. Konvansiyonel N ve F gen RT-PCR tekniklerinin sensitivitesi

3.1.7. Saha örneklerinin RT-PCR sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi

Çalışmada kan, nasal swap ve doku örneklerinden PPRV N ve F gen bölgelerine yönelik yapılan konvansiyonel RT-PCR ile N gen bölgesine yönelik rRT-PCR sonuçları Çizelge 3.4’de gösterildi. Buna göre 50 ilden alınan 574 PPRV enfeksiyonu şüpheli örneğin %44,4 (255/574) N gen rRT-PCR ile, %39,3 (226/574) N gen RT-PCR ile ve %35,5 (204/574) F gen RT-PCR ile pozitif olarak bulundu. Üç metot birlikte değerlendirildiğinde %45,8 (263/574) pozitiflik tespit edildi. Sonuçlar yıl ve tür bazında değerlendirildiğinde, pozitiflik oranlarının koyunlarda %46.0-47,1 ve keçilerde 42.8-44.0 arasında değiştiği belirlendi (Çizelge 3.5). Kullanılan PCR tekniği ve test materyalleri bazında sonuçlar incelendiğinde ise, pozitiflik oranlarının %31,8-71,4 arasında değiştiği görüldü (Çizelge 3.6). Konvansiyonel RT-PCR ürünlerinin büyüklükleri DNA merdivenleri sayesinde hizalandı ve hedef bantlar görüntülendi. Agaroz jel elektroforez görüntüleri ile rRT-PCR sonuçları bilgisayar ortamında kaydedildi. Çalışma süresince alınan örneklerin illere göre RT-PCR sonuçları Çizelge 3.4’de gösterildi.

Çizelge 3.4. İllere göre RT-PCR sonuçları

Örneklenen İllerin Kodları	Test Edilen Örnek Adedi	Pozitif RT-PCR F gen	Pozitif RT-PCR N gen	Pozitif rRT-PCR N gen	RT-PCR tekniklerinin birlikte değerlendirilmesi
01	27	11	12	16	16
02	7	4	4	4	4
03	2	1	0	1	1
04	3	2	3	2	3
05	7	2	2	2	2
06	1	1	1	1	1
07	2	1	1	1	1
08	4	4	4	4	4
09	52	18	16	20	20
10	6	2	2	1	2
11	1	0	0	1	1
12	1	0	0	0	0
13	1	1	1	1	1
14	36	11	13	16	16
15	1	0	0	0	0
16	42	11	11	13	13
17	3	1	1	1	1
18	1	1	1	1	1
19	24	2	2	4	4
20	8	1	2	1	2
21	1	1	0	0	1
22	2	1	1	1	1
23	2	1	1	1	1
24	25	3	9	9	9
25	2	2	2	2	2
26	47	15	18	19	19
27	30	10	13	16	16
28	1	1	1	1	1
29	10	0	0	0	0
30	19	8	10	9	10
31	25	10	12	15	15
32	38	11	9	14	14
33	27	13	15	13	15
34	10	3	5	5	5
35	4	3	3	3	3
36	3	1	1	1	1
37	21	10	10	10	10
38	2	1	1	1	1
39	1	1	1	1	1
40	3	1	1	2	2
41	30	10	10	14	14
42	5	5	5	5	5
43	4	0	0	1	1
44	3	3	3	3	3
45	1	1	1	1	1
46	2	2	2	2	2
47	13	5	8	7	8
48	10	7	7	8	8
49	1	1	1	1	1
50	3	0	0	0	0
TOPLAM	574	204 (%35,5)	226 (%39,3)	255 (%44,4)	263(%45,8)

Çizelge 3.5. Yıl ve tür bazında RT-PCR sonuçları

	Koyun	Keçi	Toplam pozitiflik	Toplam örnek sayısı
2012	%47.1 (25/53)	%42.8 (9/21)	%45.9 (34/74)	74
2011	%46.0 (156/339)	%44.0 (22/50)	%45.7 (178/389)	389
2010	%46.9 (38/81)	%43.3 (13/30)	%45.9 (51/111)	111
Toplam	%46.3 (219/473)	%43.5 (44/101)	%45.8 (263/574)	574

Çizelge 3.6. Örnek çeşidine göre RT-PCR sonuçları

	Doku	Kan	Swap	Toplam Pozitif / Toplam Örnek
Test edilen örnek sayısı	374	193	7	
F gen RT-PCR pozitif örnekler	119 (%31,8)	81 (%41,9)	4 (%57,1)	204/574 (%35,5)
N gen RT-PCR pozitif örnekler	130 (%34,7)	92 (%47,6)	4 (%57,1)	226/574 (%39,3)
N gen rRT-PCR pozitif örnekler	150 (%40,1)	100 (%51,8)	5 (%71,4)	255/574 (%44,4)

3.2. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Filogenetik Analiz

Konvansiyonel RT-PCR testleri sonunda elde edilen pozitif örneklerden illeri temsil edecek şekilde 53 adet F gen ve 60 adet N gen kısmi dizin analizleri yapıldı ve gen bankası ulaşım numaraları JQ388615-JQ388664, JQ519907-JQ519965, JX117877-JX117880 olarak alındı. Tez süresince elde edilen virusların, F ve N gen kısmi dizinlerinin gen bankasında yer alacak son nomenklatöre göre yapılmış isimlendirmeleri ve ulaşım numaraları Çizelge 3.7 ve 3.8’de gösterildi.

Çizelge 3.7. F gen kısmi dizinlerinin gen bankasında yer alan son nomenklatöre göre yapılmış isimlendirmeleri ve ulaşım numaraları

Sıra No.	İl	Kod	Genbank No	Tür	Materyal	Sıra No.	İl	Kod	Genbank No	Tür	Materyal
1	Adana	ADANA	JQ388615	Koyun	Doku	28	K.Maraş	TR/KAHRAMANMARAS/2011/5F	JQ388663	Keçi	Kan
2	Adana	TR/ADANA/2011/53F	JQ519907	Koyun	Doku	29	K.Maraş	TR/KAHRAMANMARAS/2011/48F	JQ519915	Keçi	Kan
3	Afyon	TURKEY/AFYON/2011/35F	JQ388617	Koyun	Doku	30	K.Maraş	TR/KAHRAMANMARAS/2011/49F	JQ519917	Keçi	Kan
4	Amasya	AMASYA2011-8F	JQ388619	Koyun	Doku	31	Kırklareli	TR/KIRKLARELI/2011/2F	JQ519919	Koyun	Doku
5	Antalya	TR/ANTALYA/2011/42F	JQ388625	Koyun	Doku	32	Kocaeli	TR/KOCAELI/2010/586F	JQ519921	Koyun	Doku
6	Antalya	Turkey/Antalya/2011/6F	JQ388624	Koyun	Doku	33	Konya	TR/KONYA/2011/23F	JQ519924	Koyun	Doku
7	Ankara	ANKARA	JQ388621	Koyun	Doku	34	Konya	TR/KONYA/2011/36F	JQ519926	Koyun	Doku
8	Aydın	TR-AYDIN-2011-7F	JQ388627	Koyun	Doku	35	Konya	TR/KONYA/2011/41F	JQ519928	Koyun	Doku
9	Aydın	TR/AYDIN/2011/28F	JQ388629	Koyun	Doku	36	Kütahya	TR/KUTAHYA/2011/26F	JQ519930	Koyun	Doku
10	Aydın	TR-AYDIN-2011-29F	JQ388631	Koyun	Doku	37	Kütahya	TR/KUTAHYA/2011/30F	JQ519932	Koyun	Doku
11	Balıkesir	TR/BALIKESIR/2011/2640F	JQ388633	Koyun	Doku	38	Manisa	TR/MANISA/2011/21F	JQ519934	Koyun	Doku
12	Balıkesir	TR/BALIKESIR/2010/3262F	JQ388635	Koyun	Doku	39	Manisa	TR/MANISA/2011/31F	JQ519936	Koyun	Doku
13	Bilecik	TR-BILECIK-2011-18F	JQ388637	Koyun	Doku	40	Osmaniye	TR/OSMANIYE/2011/52F	JQ519939	Koyun	Kan
14	Bilecik	TR-BILECIK-2011-19F	JQ388638	Koyun	Doku	41	Manisa	TR/MANISA/2011/32F	JQ519937	Koyun	Doku
15	Bursa	TR/BURSA/2011/4F	JQ388641	Koyun	Doku	42	Sakarya	TR/SAKARYA/2011/20F	JQ519942	Koyun	Kan
16	Çanakkale	TR/CANAKKALE/2010/341F	JQ388643	Koyun	Doku	43	Samsun	TR/SAMSUN/2011/54F	JQ519946	Koyun	Doku
17	Çanakkale	TR/CANAKKALE/2011/3934F	JQ388645	Koyun	Doku	44	Samsun	TR/SAMSUN/2011/7F	JQ519944	Koyun	Doku
18	Edirne	TR/EDIRNE/2011/17F	JQ388647	Koyun	Doku	45	Şanlıurfa	TR/SANLIURFA/2011/50F	JQ519948	Koyun	Kan
19	Edirne	EDIRNE F	JX117877	Koyun	Doku	46	Şanlıurfa	TR/SANLIURFA/2011/51F	JQ519950	Koyun	Kan
20	Erzurum	TURKEY/ERZURUM/2011/5F	JQ388649	Koyun	Doku	47	Sinop	TR/SINOP/2011/8F	JQ519952	Koyun	Doku
21	Giresun	TR/GIRESUN/2011/43F	JQ388651	Koyun	Doku	48	Sinop	TR/SINOP/2011/47F	JQ519954	Koyun	Doku
22	Hatay	TR/HATAY/2011/6F	JQ388653	Keçi	Kan	49	Sivas	TR/SIVAS/2011/34F	JQ519956	Koyun	Doku
23	Hatay	TR/HATAY/2011/44F	JQ388655	Keçi	Kan	50	Tekirdağ	TR/TEKIRDAG/2011/4F	JQ519958	Koyun	Doku
24	Hatay	TR/HATAY/2011/45F	JQ388657	Keçi	Kan	51	Tekirdağ	TEKIRDAG	JX117879	Koyun	Doku
25	İstanbul	TR/ISTANBUL/2010/583F	JQ388659	Koyun	Doku	52	Tokat	TR/TOKAT/2011/1F	JQ519960	Koyun	Doku
26	İzmir	TR/IZMIR/2011/25F	JQ388661	Koyun	Doku	53	Tokat	TR/TOKAT/2011/46F	JQ519962	Koyun	Doku
27	İzmir	TR/IZMIR/2011/27F	JQ519965	Koyun	Doku						

Çizelge 3.8. N gen kısmi dizinlerinin gen bankasında yer alan son nomenklatöre göre yapılmış isimlendirmeleri ve ulaşım numaraları

Sıra No.	İl	Kod	Genbank No	Tür	Materyal	Sıra No.	İl	Kod	Genbank No	Tür	Materyal
1	Adana	TR/ADANA/2011/53N	JQ519908	Koyun	Doku	31	İzmir	TR/İZMİR/2011/22N	JQ519913	Koyun	Doku
2	Adana	ADANA	JQ388616	keçi	Kan	32	İzmir	TR/İZMİR/2011/14N	JQ519912	Koyun	Doku
3	Afyon	TURKEY/AFYON/2011/35N	JQ388618	Koyun	Doku	33	K.Maraş	TR/KAHRAMANMARAS/2011/5N	JQ388664	Keçi	Kan
4	Agri	TR/AGRI/2011/16N	JQ519909	Koyun	Doku	34	K.Maraş	TR/KAHRAMANMARAS/2011/48N	JQ519916	Keçi	Kan
5	Amasya	AMASYA	JQ388620	Koyun	Doku	35	K.Maraş	TR/KAHRAMANMARAS/2011/49N	JQ519918	Keçi	Kan
6	Ankara	ANKARA	JQ388622	Koyun	Doku	36	Kırklareli	TR/KIRKLARELI/2011/2N	JQ519920	Koyun	Doku
7	Antalya	TR/ANTALYA/2011/6N	JQ388623	koyun	Doku	37	Kocaeli	TR/KOCAELI/2010/586N	JQ519922	Koyun	Doku
8	Antalya	TR/ANTALYA/2011/42N	JQ388626	Koyun	Doku	38	Konya	TR/KONYA/2011/15N	JQ519923	Koyun	Doku
9	Aydın	TR-AYDIN-2011-7N	JQ388628	Koyun	Doku	39	Konya	TR/KONYA/2011/23N	JQ519925	Koyun	Doku
10	Aydın	TR/AYDIN/2011/28N	JQ388630	Koyun	Doku	40	Konya	TR/KONYA/2011/36N	JQ519927	Koyun	Doku
11	Aydın	TR-AYDIN-2011-29N	JQ388632	Koyun	Doku	41	Konya	TR/KONYA/2011/41N	JQ519929	Koyun	Doku
12	Balıkesir	TR/BALIKESIR/2010/2640N	JQ388634	Koyun	Doku	42	Kütahya	TR/KUTAHYA/2011/26N	JQ519931	Koyun	Doku
13	Balıkesir	TR-BALIKESIR-2010-3262N	JQ388636	Koyun	Doku	43	Kütahya	TR/KUTAHYA/2011/30N	JQ519933	Koyun	Doku
14	Bilecik	TR-BILECIK-2011-18N	JQ388639	Koyun	Doku	44	Manisa	TR/MANISA/2011/21N	JQ519935	Koyun	Doku
15	Bilecik	TR-BILECIK-2011-19N	JQ388640	Koyun	Doku	45	Manisa	TR/MANISA/2011/31N	JQ519964	Koyun	Doku
16	Bilecik	TR/BILECIK/2011/10N	JQ519910	Koyun	Doku	46	Manisa	TR/MANISA/2011/32N	JQ519938	Koyun	Doku
17	Bilecik	TR/BILECIK/2011/11N	JQ519911	Koyun	Doku	47	Osmaniye	TR/OSMANIYE/2011/52N	JQ519940	Koyun	Kan
18	Bursa	TR/BURSA/2011/4N	JQ388642	Koyun	Doku	48	Sakarya	TR/SAKARYA/2011/12N	JQ519941	Koyun	Doku
19	Çanakkale	TR/CANAKKALE/2010/341N	JQ388644	Koyun	Doku	49	Sakarya	TR/SAKARYA/2011/20N	JQ519943	Koyun	Doku
20	Çanakkale	TR/CANAKKALE/2011/3934N	JQ388646	Koyun	Doku	50	Samsun	TR/SAMSUN/2011/7N	JQ519945	Koyun	Doku
21	Edirne	TR/EDIRNE/2011/17N	JQ388648	Koyun	Doku	51	Samsun	TR/SAMSUN/2011/54N	JQ519947	Koyun	Doku
22	Edirne	EDIRNE	JX117878	Koyun	Doku	52	Şanlıurfa	TR/SANLIURFA/2011/50N	JQ519949	Koyun	Kan
23	Erzurum	ERZURUM/2011/5N	JQ388650	Koyun	Doku	53	Şanlıurfa	TR/SANLIURFA/2011/51N	JQ519951	Koyun	Kan
24	Giresun	TR/GIRESUN/2011/43N	JQ388652	Koyun	Doku	54	Sinop	TR/SINOP/2011/8N	JQ519953	Koyun	Doku
25	Hatay	TR/HATAY/2011/6N	JQ388654	keçi	Kan	55	Sinop	TR/SINOP/2011/47N	JQ519955	Koyun	Doku
26	Hatay	TR/HATAY/2011/44N	JQ388656	keçi	Kan	56	Sivas	TR/SIVAS/2011/34N	JQ519957	Koyun	Doku
27	Hatay	TR/HATAY/2011/45N	JQ388658	keçi	Kan	57	Tekirdağ	TR/TEKIRDAG/2011/4N	JQ519959	Koyun	Doku
28	İstanbul	TR/ISTANBUL/2010/583N	JQ388660	Koyun	Doku	58	Tekirdağ	TEKIRDAG	JX117880	Koyun	Doku
29	İzmir	TR/İZMİR/2011/25N	JQ388662	Koyun	Doku	59	Tokat	TR/TOKAT/2011/1N	JQ519961	Koyun	Doku
30	İzmir	TR/İZMİR/2011/27N	JQ519914	Koyun	Doku	60	Tokat	TR/TOKAT/2011/46N	JQ519963	Koyun	Doku

3.2.1. PPRV F Gen Bölgesi Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Filogenetik Analiz

Çalışmada elde edilen 53 adet F gen kısmi dizinlerinin nükleotid bazında yapılan karşılaştırmaları sonunda, Turkey96 dizini ile 6032. nt'de $G \rightarrow A$ ve 6041. nt'de $A \rightarrow G$ şeklinde iki, Turkey00 dizini ile 5849.nt.'de $C \rightarrow T$, 5999.nt.'de $G \rightarrow A$ ve 6083.nt.'de $C \rightarrow T$ şeklinde üç nükleotid değişiminin olduğu tespit edildi. Ayrıca Turkey96 dizini, Turkey2000 dizini ile karşılaştırıldığında 5849.nt.'de $C \rightarrow T$, 5999.nt.'de $G \rightarrow A$, 6032. nt'de $G \rightarrow A$, 6041. nt'de $A \rightarrow G$ ve 6083.nt'de $C \rightarrow T$ olmak üzere beş nükleotid değişikliğinin olduğu tespit edildi. Buna göre Turkey96 dizininde, Turkey2000 dizinine göre var olan 5 nükleotid değişiminden sadece ikisinin çalışmada elde ettiğimiz dizinlere aktarılmış olduğu tespit edildi. Nükleotid değişimleri Şekil 3.7'de gösterildi.

Tespit edilen bu nükleotid değişimlerine ilişkin olarak, F gen kısmi dizinlerinin kendi aralarındaki yüzde benzerlik oranları %98,2-100, Turkey96 ile %98,2-99,3 ve Turkey00 ile % 97,9-98,9 olarak tespit edildi (Çizelge 3.9).

Elde edilen F gen kısmi dizinlerinin gerek kendi aralarında ve gerekse Turkey 1996 ve Turkey2000 viruslarına ait gen dizinleri ile aminoasit bazında yapılan karşılaştırmalarında ise sırasıyla %97,8-100, %98,9-100 ve %98,9-100 arasında bir benzerlik olduğu tespit edildi (Çizelge 3.10).



	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280
Turkey2000-AJ849636	AAACCAGTCTTGAGAAAGTCGAATCAGGCAATAGAGGAAATCAGACTTGCAAATAAGGAGACCATACCTAGCAGTACAGGGCGTCCAGGATTATATCAACAATGAGCTTGTCCCTTCTGTCCATAGAAATGTCATGC												
Turkey96-FR667647				A			G		A			T	
ADANA-JQ388615				A							C	T	
AFYON-JQ388617				A							G	T	
AMASYA-JQ388619				A								T	
ANKARA-JQ388621				A								T	
ANTALYA-JQ388624				A								T	
AYDIN-JQ388627				A				T				T	
BALIKESIR-JQ388633				A								T	
BILECIK-JQ388637				A								T	
BURSA-JQ388641				A								T	
CANAKKALE-JQ388641				A								T	
EDIRNE-JQ388647				A								T	
ERZURUM-JQ388649				A							A	T	
GIRESUN-JQ388651				A								T	
HATAY-JQ388653				A							C	T	
ISTANBUL-JQ388659				A								T	
IZMIR-JQ388661				A								T	
KAHRAMANMARAS-JQ388663				A							C	T	
KIRKLARELI-JQ519919				A								T	
KOCAELI-JQ519921				A								T	
KONYA-JQ519924				A								T	
KUTAHYA-JQ519930				A								T	
MANISA-JQ519932				A								T	
OSMANIYE-JQ519939				A								T	
SAKARYA-JQ519942				A								T	
SAMSUN-JQ519944				A								T	
SANLIURFA-JQ519948				A							C	T	
SINOP-JQ519952				A								T	
SIVAS-JQ519956				A							C	T	
TEKIRDAG-JQ519958				A			C				C	T	
TOKAT-JQ519960				A								T	

Şekil 3.7.'nin devamı

Çizelge 3.9. Türkiye’de 1996-2012 yılları arasında saptanan virusların F gen dizinlerinin nükleotid düzeyinde yüzde benzerlik oranları

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32			
Turkey2000-AJ849636	1		98,2	98,2	98,6	98,6	98,9	98,9	98,6	98,9	98,6	98,9	98,9	98,9	98,2	98,9	98,2	98,9	98,6	98,2	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,6	98,2	98,9	98,2	97,9	98,9	1		
Turkey96-FR667647	2	98,2		98,6	98,9	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3	99,3	98,6	99,3	98,6	99,3	98,9	98,6	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	98,9	98,6	99,3	98,6	98,2	99,3	2		
ADANA-JQ388615	3	98,2	98,6		98,9	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3	100	99,3	98,9	100	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	98,9	100	99,3	100	99,6	99,3	3		
AFYON-JQ388617	4	98,6	98,9	98,9		99,3	99,6	99,6	99,3	99,6	99,6	99,3	99,6	99,6	98,9	99,6	98,9	99,6	99,3	98,9	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,3	98,9	99,6	98,9	98,6	99,6	4		
AMASYA-JQ388619	5	98,6	98,9	98,9	99,3		99,6	99,6	99,3	99,6	99,6	99,3	99,6	99,6	98,9	99,6	98,9	99,6	100	98,9	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	100	98,9	99,6	98,9	98,6	99,6	5		
ANKARA-JQ388621	6	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6		100	99,6	100	100	99,6	100	100	99,3	100	99,3	100	99,6	99,3	100	100	100	100	100	100	100	100	99,6	99,3	100	99,3	98,9	100	6	
ANTALYA-JQ388624	7	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6	100		99,6	100	100	99,6	100	100	99,3	100	99,3	100	99,6	99,3	100	100	100	100	100	100	100	100	99,6	99,3	100	99,3	98,9	100	7	
AYDIN-JQ388627	8	98,6	98,9	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6		99,6	99,6	99,3	99,6	99,6	98,9	99,6	98,9	99,6	99,3	98,9	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,3	98,9	99,6	98,9	98,6	99,6	8		
BALIKESIR-JQ388633	9	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6	100	100	99,6		100	99,6	100	100	99,3	100	99,3	100	99,6	99,3	100	100	100	100	100	100	100	100	99,6	99,3	100	99,3	98,9	100	9	
BILECIK-JQ388637	10	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6	100	100	99,6	100		99,6	100	100	99,3	100	99,3	100	99,6	99,3	100	100	100	100	100	100	100	100	99,6	99,3	100	99,3	98,9	100	10	
BURSA-JQ388641	11	98,6	98,9	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6	99,3	99,6	99,6		99,6	99,6	98,9	99,6	98,9	99,6	99,6	99,3	98,9	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,3	98,9	99,6	98,9	98,6	99,6	11	
CANAKKALE-JQ388641	12	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6	100	100	99,6	100	100	99,6		100	99,3	100	99,3	100	99,6	99,3	100	100	100	100	100	100	100	100	99,6	99,3	100	99,3	98,9	100	12	
EDIRNE-JQ388647	13	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6	100	100	99,6	100	100	99,6	100		99,3	100	99,3	100	99,6	99,3	100	100	100	100	100	100	100	100	99,6	99,3	100	99,3	98,9	100	13	
ERZURUM-JQ388649	14	98,2	98,6	98,9	98,9	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3	99,3		99,3	98,9	99,3	98,9	98,9	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	98,9	98,9	99,3	98,9	98,6	99,3	14	
GİRESUN-JQ388651	15	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6	100	100	99,6	100	100	99,6	100	100	99,3		99,3	100	99,6	99,3	100	100	100	100	100	100	100	100	99,6	99,3	100	99,3	98,9	100	15	
HATAY-JQ388653	16	98,2	98,6	100	98,9	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3		99,3	98,9	100	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	98,9	100	99,3	100	99,6	99,3	16	
İSTANBUL-JQ388659	17	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6	100	100	99,6	100	100	99,6	100	100	99,3	100	99,3		99,6	99,3	100	100	100	100	100	100	100	100	99,6	99,3	100	99,3	98,9	100	17	
İZMİR-JQ388661	18	98,6	98,9	98,9	99,3	100	99,6	99,6	99,3	99,6	99,6	99,3	99,6	99,6	98,9	99,6	98,9	99,6		98,9	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	100	98,9	99,6	98,9	98,6	99,6	18	
K.MARAS-JQ388663	19	98,2	98,6	100	98,9	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3	100	99,3	98,9		99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	98,9	100	99,3	100	99,6	99,3	19	
KIRKLARELİ-JQ519919	20	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6	100	100	99,6	100	100	99,6	100	100	99,3	100	99,3	100	99,6	99,3		100	100	100	100	100	100	100	99,6	99,3	100	99,3	98,9	100	20	
KOCAELİ-JQ519921	21	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6	100	100	99,6	100	100	99,6	100	100	99,3	100	99,3	100	99,6	99,3	100		100	100	100	100	100	100	99,6	99,3	100	99,3	98,9	100	21	
KONYA-JQ519924	22	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6	100	100	99,6	100	100	99,6	100	100	99,3	100	99,3	100	99,6	99,3	100	100		100	100	100	100	100	100	99,6	99,3	100	99,3	98,9	100	22
KUTAHYA-JQ519930	23	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6	100	100	99,6	100	100	99,6	100	100	99,3	100	99,3	100	99,6	99,3	100	100	100		100	100	100	100	99,6	99,3	100	99,3	98,9	100	23	
MANİSA-JQ519932	24	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6	100	100	99,6	100	100	99,6	100	100	99,3	100	99,3	100	99,6	99,3	100	100	100	100		100	100	100	99,6	99,3	100	99,3	98,9	100	24	
OSMANIYE-JQ519939	25	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6	100	100	99,6	100	100	99,6	100	100	99,3	100	99,3	100	99,6	99,3	100	100	100	100	100	100	100	100	99,6	99,3	100	99,3	98,9	100	25	
SAKARYA-JQ519942	26	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6	100	100	99,6	100	100	99,6	100	100	99,3	100	99,3	100	99,6	99,3	100	100	100	100	100	100	100	100	99,6	99,3	100	99,3	98,9	100	26	
SAMSUN-JQ519944	27	98,6	98,9	98,9	99,3	100	99,6	99,6	99,3	99,6	99,6	99,3	99,6	99,6	98,9	99,6	98,9	99,6	100	98,9	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	98,9	99,6	98,9	98,6	99,6	27	
SANLIURFA-JQ519948	28	98,2	98,6	100	98,9	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3	100	99,3	98,9	100	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	98,9		99,3	100	99,6	99,3	28	
SINOP-JQ519952	29	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6	100	100	99,6	100	100	99,6	100	100	99,3	100	99,3	100	99,6	99,3	100	100	100	100	100	100	100	100	99,6	99,3		99,3	98,9	100	29	
SIVAS-JQ519956	30	98,2	98,6	100	98,9	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3	99,3	98,9	99,3	100	99,3	98,9	100	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	98,9	100	99,3		99,6	99,6	99,3	30
TEKİRDAĞ-JQ519958	31	97,9	98,2	99,6	98,6	98,6	98,9	98,9	98,6	98,9	98,9	98,6	98,9	98,9	98,6	98,9	99,6	98,9	98,6	99,6	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,6	98,9	99,6		98,9	98,9	31	
TOKAT-JQ519960	32	98,9	99,3	99,3	99,6	99,6	100	100	99,6	100	100	99,6	100	100	99,3	100	99,3	100	99,6	99,3	100	100	100	100	100	100	100	100	99,6	99,3	100	99,3	98,9		98,9	32
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32			

Çizelge 3.10. Türkiye’de 1996-2012 yılları arasında saptanan virusların F gen dizinlerinin aminoasit düzeyinde yüzde benzerlik oranları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
Turkey2000-AJ849636	1	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
Turkey96-FR667647	2	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	2
ADANA-JQ388615	3	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	3
AFYON-JQ388617	4	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	97,8	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	4
AMASYA-JQ388619	5	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	5
ANKARA-JQ388621	6	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	6
ANTALYA-JQ388624	7	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	7
AYDIN-JQ388627	8	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	8
BALIKESİR-JQ388633	9	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	9
BİLECİK-JQ388637	10	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	10
BURSA-JQ388641	11	98,9	98,9	98,9	97,8	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	11
CANAKKALE-JQ388641	12	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	12
EDİRNE-JQ388647	13	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	13
ERZURUM-JQ388649	14	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	14
GIRESUN-JQ388651	15	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	15
HATAY-JQ388653	16	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	16
İSTANBUL-JQ388659	17	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	17
İZMİR-JQ388661	18	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	18
K.MARAS-JQ388663	19	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	19
KIRKLARELİ-JQ519919	20	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	20
KOCAELİ-JQ519921	21	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	21
KONYA-JQ519924	22	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	22
KUTAHYA-JQ519930	23	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	23
MANİSA-JQ519932	24	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	24
OSMANİYE-JQ519939	25	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	25
SAKARYA-JQ519942	26	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	26
SAMSUN-JQ519944	27	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	27
SANLIURFA-JQ519948	28	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	28
SINOP-JQ519952	29	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	29
SİVAS-JQ519956	30	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	30
TEKİRDAĞ-JQ519958	31	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	31
TOKAT-JQ519960	32	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	98,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	32

Nigeria/75/1 aşı suşu ile nükleotid bazında yapılan karşılaştırmalarda ise 28 adet nükleotid değişimi tespit edildi. Nükleotid değişimlerinin Nigeria/75/1 aşı suşundaki pozisyonları Çizelge 3.11 ve Şekil 3.8’de gösterildi. F gen kısmi dizinlerinde görülen bu nükleotid değişimlerine ilişkin, çalışmada elde edilen dizinlerin kendi aralarında %98,3-100, Nigeria/75/1 aşı suşu ile %91,3-92,4 oranında benzer oldukları tespit edildi (Çizelge 3.12).

Nigeria/75/1 aşı suşuna ait dizin ile çalışmada elde edilen F gen kısmi dizinlerinin aminoasit düzeyinde yapılan karşılaştırmalarında, 5854. (T→C) ile 5855. (C→T) ve 6120. (A→G) ile 6122. (T→C) nükleotidlerde meydana gelen değişimlerin sırasıyla V→A ve S→G şeklinde iki aminoasit değişimine neden olduğu tespit edildi. Grafikte ayrıca tüm dizinlerde PPRV F gen cleavage site bölgesinin korunmuş olduğu tespit edildi. PPRV F gen cleavage site bölgesi aminoasit dizini G-R-R-T-R-R, bölgenin korunmuşluğunu ifade etmektedir. F gen kısmi dizinlerini kendi aralarında ve Nigeria/75/1 dizini ile aminoasit düzeyinde karşılaştırması Şekil 3.9’da gösterildi. F gen kısmi dizinlerin kendi aralarında ve Nigeria/75/1 dizini ile aminoasit düzeyinde karşılaştırıldığında ise, sırasıyla %98,3-100 ve %97,5-98,3 oranında bir benzerlik olduğu tespit edildi (Çizelge 3.13).

F gen kısmi dizinler ve hatları temsil eden referans dizinler ile birlikte filogenetik ağaç oluşturulduğunda, Türkiye’de sirküle olan PPR viruslarının IV. genetik hat içinde yer aldığı görüldü. F gen kısmi dizinlerinin referans dizinleri ile olan ilişkisini gösteren filogram Şekil 3.10’da gösterildi. Komşu ülkelerde sirküle olan ve değişik yollarla ülkemize giren ya da girmesi muhtemel PPR virusları ile, çalışmada elde edilen F gen kısmi dizinler arasındaki uzaklıkların daha net görülmesi amacıyla oluşturulan filogram Şekil 3.11’de gösterildi. Şekil 3.11’deki filogram incelendiğinde, ülkemizde sirküle olan virusların F gen kısmi dizinlerine göre temelde 3 alt grupta toplandığı tespit edildi. Alt grup II içine Egypt09 (FR667557), alt grup III içine Turkey2000 (AJ849636) referans dizinlerinin girdiği, alt grup I içine ise sadece çalışmada elde edilen dizinlerin girdiği tespit edildi. Alt grup II

kapsadığı dizinler açısından incelendiğinde, ağırlıklı olarak Güneydoğu illerinden elde edilenler ve Egypt09'dan (FR667557) oluştuğu görüldü. Alt gruplar içine girmemesine rağmen Irak dizinlerinin diğer komşu ülke dizinlerine göre ülkemizde sirküle olan virüslara daha yakın olduğu tespit edildi.

Çalışmada elde edilen F gen kısmi dizinlerinin evrimsel sürecini incelemek amacıyla DnaSP v.5 (Librado, P. ve Rozas, J., 2009; <http://www.ub.edu/dnasp/>) ve NETWORK Software (<http://www.fluxus-engineering.com>) programları ile star contraction algorithm (Forster ve ark., 2001) ve median-joining (MJ) network algorithm (Bandelt ve ark., 1999) parametreleri kullanılarak network analizi yapıldı (Şekil 3.12). Network analizinde çalışmada elde edilen F gen kısmi dizinlerinin tamamının sarı renkle ifade edilen IV. genetik hat içinde yer aldığı görüldü. Ayrıca filogenetik analizde ağırlıklı olarak alt grup III içinde yer alan dizinlerin haplogrup 3 (H3) içinde, alt grup II içinde yer alan dizinlerin haplogrup 2 (H2) ve alt grup I içinde yer alan dizinlerin haplogrup 1 (H1) içinde yer aldığı tespit edildi. Network analiz incelendiğinde, H2 ile H3 arasında iki adet (69 ve 282); H3 ile H1 arasında da bir adet nükleotid (138) farklılığı tespit edildi. Çalışmada elde edilen dizinlerin büyük bir kısmını içeren H3 ile Iraq2009 (AY948429) arasında bir adet (280), Iraq2000 (FN995439) arasında iki adet (240, 78), Iraq2002 (FN995440) arasında beş adet (240, 19, 22, 23, 24), Turkey2000 (AJ849636) arasında üç adet (51, 201, 285) ve Iran2010 (FN995204) arasında dört adet nükleotid (234, 45, 27, 182) farklılığı tespit edildi. Filogenetik analizde olduğu gibi network analizde de, Iran2010 (FN995204) dizininin, aşı suşu Nigeria75/1'e 18 adet nükleotid farklılığı ile en yakın dizin olduğu tespit edildi.

Çizelge 3.11. F gen kısmi dizinlerinde Nigeria/75/1 dizinine göre meydana gelen nükleotid değişimlerinin genomdaki pozisyonu

Tam Genomdaki Pozisyonu	Nükleotid Değişimi	Tam Genomdaki Pozisyonu	Nükleotid Değişimi	Tam Genomdaki Pozisyonu	Nükleotid Değişimi	Tam Genomdaki Pozisyonu	Nükleotid Değişimi
5825.nt	A→G	5888.nt	C→T	5957.nt	A→G	6104.nt	T→G
5837.nt	C→T	5903.nt	A→G	6032.nt	G→A	6116.nt	A→G
5840.nt	G→A	5912.nt	C→A	6035.nt	G→A	6120.nt	A→G
5843.nt	C→T	5921. nt	A→C	6050.nt	A→G	6122.nt	T→C
5854.nt*	T→C	5924.nt	C→T	6053.nt	C→T	6140.nt	T→C
5855.nt*	C→T	5930. nt	G→A	6077.nt	C→T	6143.nt	T→C
5858.nt	G→A	5942.nt	T→C	6098.nt	T→C	6158.nt	T→C

*Aminoasit değişimine sebep olan nükleotidler

	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Nigeria/75/1-HQ197753	TCTAACACCTGGGCGCAGGACCCGCCGTTTTGTCGGGGCTGTTCTGGCCGAGTAGCAGTTGAGTCGCGACAGCCGCTCAAAATAACTGCCGAGTCGCACCTCCA'									
ADANA-JQ388615	. . G T . A . T CT . A A T G A C . T . .									
AFYON-JQ388617	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
AMASYA-JQ388619	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
ANKARA-JQ388621	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
ANTALYA-JQ388624	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
AYDIN-JQ388627	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
BALIKESIR-JQ388633	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
BILECIK-JQ388637	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
BURSA-JQ388641	. . GG T . A . T CT . A T G A C . T . .									
CANAKKALE-JQ388641	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
EDIRNE-JQ388647	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
ERZURUM-JQ388649	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
GIRESUN-JQ388651	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
HATAY-JQ388653	. . G T . A . T CT . A A T G A C . T . .									
ISTANBUL-JQ388659	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
IZMIR-JQ388661	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
KAHRAMANMARAS-JQ388663	. . G T . A . T CT . A A T G A C . T . .									
KIRKLARELI-JQ519919	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
KOCAELI-JQ519921	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
KONYA-JQ519924	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
KUTAHYA-JQ519930	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
MANISA-JQ519932	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
OSMANIYE-JQ519939	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
SAKARYA-JQ519942	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
SAMSUN-JQ519944	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
SANLIURFA-JQ519948	. . G T . A . T CT . A A T G A C . T . .									
SINOP-JQ519952	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									
SIVAS-JQ519956	. . G T . A . T CT . A A T G A C . T . .									
TEKIRDAG-JQ519958	. . G T . A . T CT . A A T G A C . T . .									
TOKAT-JQ519960	. . G T . A . T CT . A T G A C . T . .									

Şekil 3.8. F gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Nigeria/75/1dizini ile nükleotid düzeyinde karşılaştırılması

	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230
Nigeria/75/1-HQ197753	AGTCATTGATGAATTCCCAAGCAATTGAAAGTTTAAAAACCAGTCTTGAGAAGTCGAATCAGGCAATAGAAGAAATCAGACTTGCAAAATAAGGAGACCATACTGC									
ADANA-JQ388615	.A. C. G.									.A.
AFYON-JQ388617	.A. C. G.									.A.
AMASYA-JQ388619	.A. . . . A. . . . C. G.									.A.
ANKARA-JQ388621	.A. C. G.									.A.
ANTALYA-JQ388624	.A. C. G.									.A.
AYDIN-JQ388627	.A. C. G.									.A.
BALIKESIR-JQ388633	.A. C. G.									.A.
BILECIK-JQ388637	.A. C. G.									.A.
BURSA-JQ388641	.A. C. G.									.A.
CANAKKALE-JQ388641	.A. C. G.									.A.
EDIRNE-JQ388647	.A. C. G.									.A.
ERZURUM-JQ388649	.A. C. G.									.A.
GIRESUN-JQ388651	.A. C. G.									.A.
HATAY-JQ388653	.A. C. G.									.A.
ISTANBUL-JQ388659	.A. C. G.									.A.
IZMIR-JQ388661	.A. . . . A. . . . C. G.									.A.
KAHRAMANMARAS-JQ388663	.A. C. G.									.A.
KIRKLARELI-JQ519919	.A. C. G.									.A.
KOCAELI-JQ519921	.A. C. G.									.A.
KONYA-JQ519924	.A. C. G.									.A.
KUTAHYA-JQ519930	.A. C. G.									.A.
MANISA-JQ519932	.A. C. G.									.A.
OSMANIYE-JQ519939	.A. C. G.									.A.
SAKARYA-JQ519942	.A. C. G.									.A.
SAMSUN-JQ519944	.A. . . . A. . . . C. G.									.A.
SANLIURFA-JQ519948	.A. C. G.									.A.
SINOP-JQ519952	.A. C. G.									.A.
SIVAS-JQ519956	.A. C. G.									.A.
TEKIRDAG-JQ519958	.A. C. G.								C.	.A.
TOKAT-JQ519960	.A. C. G.									.A.

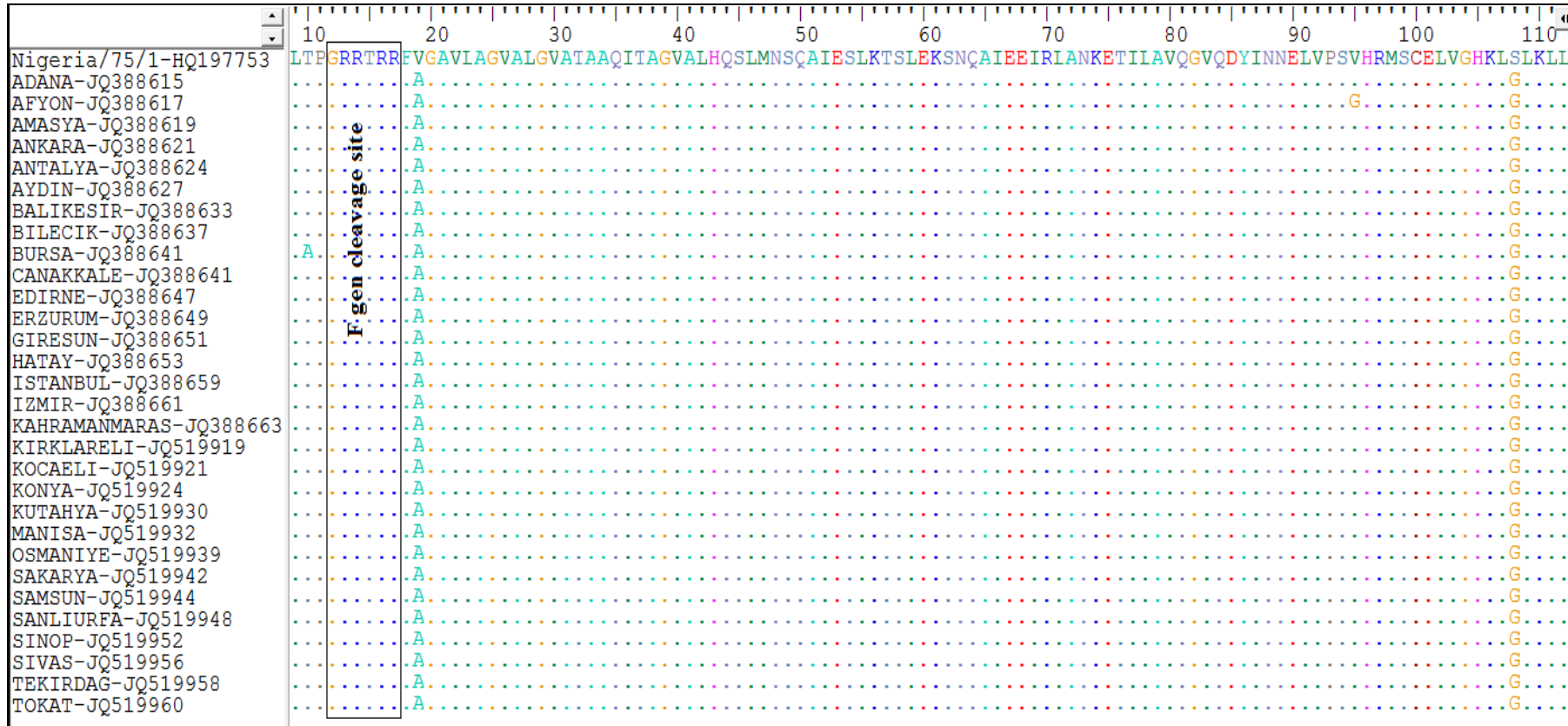
Şekil 3.8.'in devamı

	330	340	350	360
Nigeria/75/1-HQ197753	CTCAAGCTCCTTAGGTATTATACCGAGATCCTGTCTATATTCGG			
ADANA-JQ388615	C..C..T.....C.....			
AFYON-JQ388617	C..C.....C.....			
AMASYA-JQ388619	C..C.....C.....			
ANKARA-JQ388621	C..C.....C.....			
ANTALYA-JQ388624	C..C.....C.....			
AYDIN-JQ388627	C..C.....C.....			
BALIKESIR-JQ388633	C..C.....C.....			
BILECIK-JQ388637	C..C.....C.....			
BURSA-JQ388641	C..C.....C.....			
CANAKKALE-JQ388641	C..C.....C.....			
EDIRNE-JQ388647	C..C.....C.....			
ERZURUM-JQ388649	C..C.....C.....			
GIRESUN-JQ388651	C..C..T.....C.....			
HATAY-JQ388653	C..C..T.....C.....			
ISTANBUL-JQ388659	T.....C.....C.....			
IZMIR-JQ388661	C..C.....C.....			
KAHRAMANMARAS-JQ388663	C..C..T.....C.....			
KIRKLARELI-JQ519919	C..C.....C.....			
KOCAELI-JQ519921	C..C.....C.....			
KONYA-JQ519924	C..C.....C.....			
KUTAHYA-JQ519930	C..C.....C.....			
MANISA-JQ519932	C..C.....C.....			
OSMANIYE-JQ519939	C..C.....C.....			
SAKARYA-JQ519942	C..C.....C.....			
SAMSUN-JQ519944	C..C.....C.....			
SANLIURFA-JQ519948	C..C..T.....C.....			
SINOP-JQ519952	C..C.....C.....			
SIVAS-JQ519956	C..C..T.....C.....			
TEKIRDAG-JQ519958	C..C..T.....C.....			
TOKAT-JQ519960	C..C.....C.....			

Şekil 3.8.'in devamı

Çizelge 3.12. F gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Nigeria/75/1 dizini ile nükleotid düzeyinde yüzde benzerlik oranları

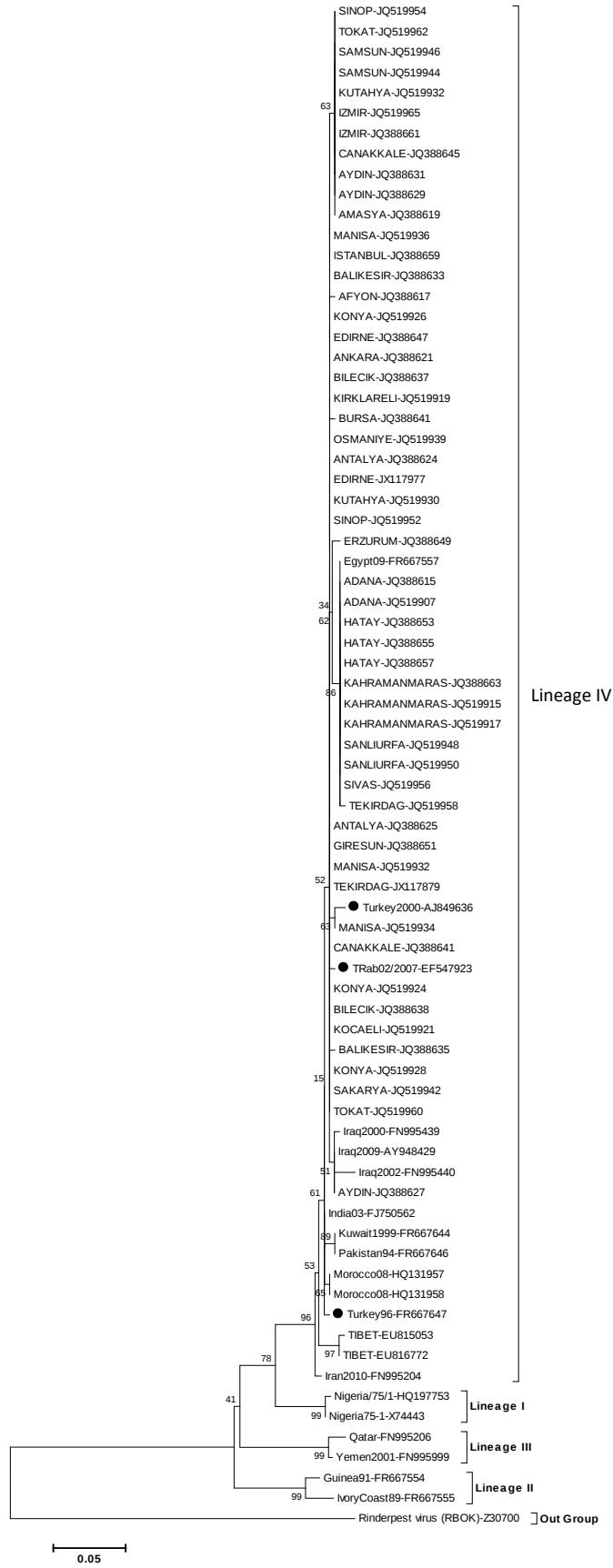
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31		
NIGERIA/75/1-HQ197753	1		91,5	92,1	92,1	92,4	92,4	91,8	92,4	92,4	92,1	92,4	92,4	91,8	92,1	91,5	92,1	92,1	91,5	92,4	92,4	92,4	92,4	92,4	92,4	92,4	92,1	91,5	92,4	91,3	91,3	92,4	1	
ADANA-JQ388615	2	91,5		98,9	98,9	99,1	99,1	98,6	99,1	99,1	98,9	99,1	99,1	98,9	99,4	100	98,9	98,9	100	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	98,9	100	99,1	99,7	99,7	99,1	2	
AFYON-JQ388617	3	92,1	98,9		99,4	99,7	99,7	99,1	99,7	99,7	99,4	99,7	99,7	99,1	99,4	98,9	99,4	99,4	98,9	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,4	98,9	99,7	98,6	98,6	99,7	3	
AMASYA-JQ388619	4	92,1	98,9	99,4		99,7	99,7	99,1	99,7	99,7	99,4	99,7	99,7	99,1	99,4	98,9	99,4	100	98,9	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	100	98,9	99,7	98,6	98,6	99,7	4	
ANKARA-JQ388621	5	92,4	99,1	99,7	99,7		100	99,4	100	100	99,7	100	100	99,4	99,7	99,1	99,7	99,7	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	99,7	99,1	100	98,9	98,9	100	5
ANTALYA-JQ388624	6	92,4	99,1	99,7	99,7	100		99,4	100	100	99,7	100	100	99,4	99,7	99,1	99,7	99,7	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	99,7	99,1	100	98,9	98,9	100	6
AYDIN-JQ388627	7	91,8	98,6	99,1	99,1	99,4	99,4		99,4	99,4	99,1	99,4	99,4	98,9	99,1	98,6	99,1	99,1	98,6	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,1	98,6	99,4	98,3	98,3	99,4	7	
BALIKESIR-JQ388633	8	92,4	99,1	99,7	99,7	100	100	99,4		100	99,7	100	100	99,4	99,7	99,1	99,7	99,7	99,1	100	100	100	100	100	100	100	99,7	99,1	100	98,9	98,9	100	8	
BILECIK-JQ388637	9	92,4	99,1	99,7	99,7	100	100	99,4	100		99,7	100	100	99,4	99,7	99,1	99,7	99,7	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	99,7	99,1	100	98,9	98,9	100	9
BURSA-JQ388641	10	92,1	98,9	99,4	99,4	99,7	99,7	99,1	99,7	99,7		99,7	99,7	99,1	99,4	98,9	99,4	99,4	98,9	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,4	98,9	99,7	98,6	98,6	99,7	10	
CANAKKALE-JQ388641	11	92,4	99,1	99,7	99,7	100	100	99,4	100	100	99,7		100	99,4	99,7	99,1	99,7	99,7	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	99,7	99,1	100	98,9	98,9	100	11
EDIRNE-JQ388647	12	92,4	99,1	99,7	99,7	100	100	99,4	100	100	99,7	100		99,4	99,7	99,1	99,7	99,7	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	99,7	99,1	100	98,9	98,9	100	12
ERZURUM-JQ388649	13	91,8	98,9	99,1	99,1	99,4	99,4	98,9	99,4	99,4	99,1	99,4	99,4		99,1	98,9	99,1	99,1	98,9	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,1	98,9	99,4	98,6	98,6	99,4	13	
GIRESUN-JQ388651	14	92,1	99,4	99,4	99,4	99,7	99,7	99,1	99,7	99,7	99,4	99,7	99,7	99,1		99,4	99,4	99,4	99,4	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,4	99,4	99,7	99,1	99,1	99,7	14	
HATAY-JQ388653	15	91,5	100	98,9	98,9	99,1	99,1	98,6	99,1	99,1	98,9	99,1	99,1	98,9	99,4		98,9	98,9	100	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	98,9	100	99,1	99,7	99,7	99,1	15	
ISTANBUL-JQ388659	16	92,1	98,9	99,4	99,4	99,7	99,7	99,1	99,7	99,7	99,4	99,7	99,7	99,1	99,4	98,9		99,4	98,9	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,4	98,9	99,7	98,6	98,6	99,7	16	
IZMIR-JQ388661	17	92,1	98,9	99,4	100	99,7	99,7	99,1	99,7	99,7	99,4	99,7	99,7	99,1	99,4	98,9	99,4		98,9	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	100	98,9	99,7	98,6	98,6	99,7	17
K.MARAS-JQ388663	18	91,5	100	98,9	98,9	99,1	99,1	98,6	99,1	99,1	98,9	99,1	99,1	98,9	99,4	100	98,9	98,9		99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	98,9	100	99,1	99,7	99,7	99,1	18
KIRKLARELI-JQ519919	19	92,4	99,1	99,7	99,7	100	100	99,4	100	100	99,7	100	100	99,4	99,7	99,1	99,7	99,7	99,1		100	100	100	100	100	100	100	99,7	99,1	100	98,9	98,9	100	19
KOCAELI-JQ519921	20	92,4	99,1	99,7	99,7	100	100	99,4	100	100	99,7	100	100	99,4	99,7	99,1	99,7	99,7	99,1	100		100	100	100	100	100	100	99,7	99,1	100	98,9	98,9	100	20
KONYA-JQ519924	21	92,4	99,1	99,7	99,7	100	100	99,4	100	100	99,7	100	100	99,4	99,7	99,1	99,7	99,7	99,1	100	100		100	100	100	100	100	99,7	99,1	100	98,9	98,9	100	21
KUTAHYA-JQ519930	22	92,4	99,1	99,7	99,7	100	100	99,4	100	100	99,7	100	100	99,4	99,7	99,1	99,7	99,7	99,1	100	100	100		100	100	100	100	99,7	99,1	100	98,9	98,9	100	22
MANISA-JQ519932	23	92,4	99,1	99,7	99,7	100	100	99,4	100	100	99,7	100	100	99,4	99,7	99,1	99,7	99,7	99,1	100	100	100	100		100	100	99,7	99,1	100	98,9	98,9	100	23	
OSMANIYE-JQ519939	24	92,4	99,1	99,7	99,7	100	100	99,4	100	100	99,7	100	100	99,4	99,7	99,1	99,7	99,7	99,1	100	100	100	100	100		100	99,7	99,1	100	98,9	98,9	100	24	
SAKARYA-JQ519942	25	92,4	99,1	99,7	99,7	100	100	99,4	100	100	99,7	100	100	99,4	99,7	99,1	99,7	99,7	99,1	100	100	100	100	100	100		99,7	99,1	100	98,9	98,9	100	25	
SAMSUN-JQ519944	26	92,1	98,9	99,4	100	99,7	99,7	99,1	99,7	99,7	99,4	99,7	99,7	99,1	99,4	98,9	99,4	100	98,9	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7		98,9	99,7	98,6	98,6	99,7	26
SANLIURFA-JQ519948	27	91,5	100	98,9	98,9	99,1	99,1	98,6	99,1	99,1	98,9	99,1	99,1	98,9	99,4	100	98,9	98,9	100	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	98,9		99,1	99,7	99,7	99,1	27	
SINOP-JQ519952	28	92,4	99,1	99,7	99,7	100	100	99,4	100	100	99,7	100	100	99,4	99,7	99,1	99,7	99,7	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	99,7	99,1		98,9	98,9	100	28
SIVAS-JQ519956	29	91,3	99,7	98,6	98,6	98,9	98,9	98,3	98,9	98,9	98,6	98,9	98,9	98,6	99,1	99,7	98,6	98,6	99,7	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,6	99,7	98,9		99,4	98,9	29
TEKIRDAG-JQ519958	30	91,3	99,7	98,6	98,6	98,9	98,9	98,3	98,9	98,9	98,6	98,9	98,9	98,6	99,1	99,7	98,6	98,6	99,7	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,6	99,7	98,9	99,4		98,9	30	
TOKAT-JQ519960	31	92,4	99,1	99,7	99,7	100	100	99,4	100	100	99,7	100	100	99,4	99,7	99,1	99,7	99,7	99,1	100	100	100	100	100	100	100	99,7	99,1	100	98,9	98,9		31	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31		



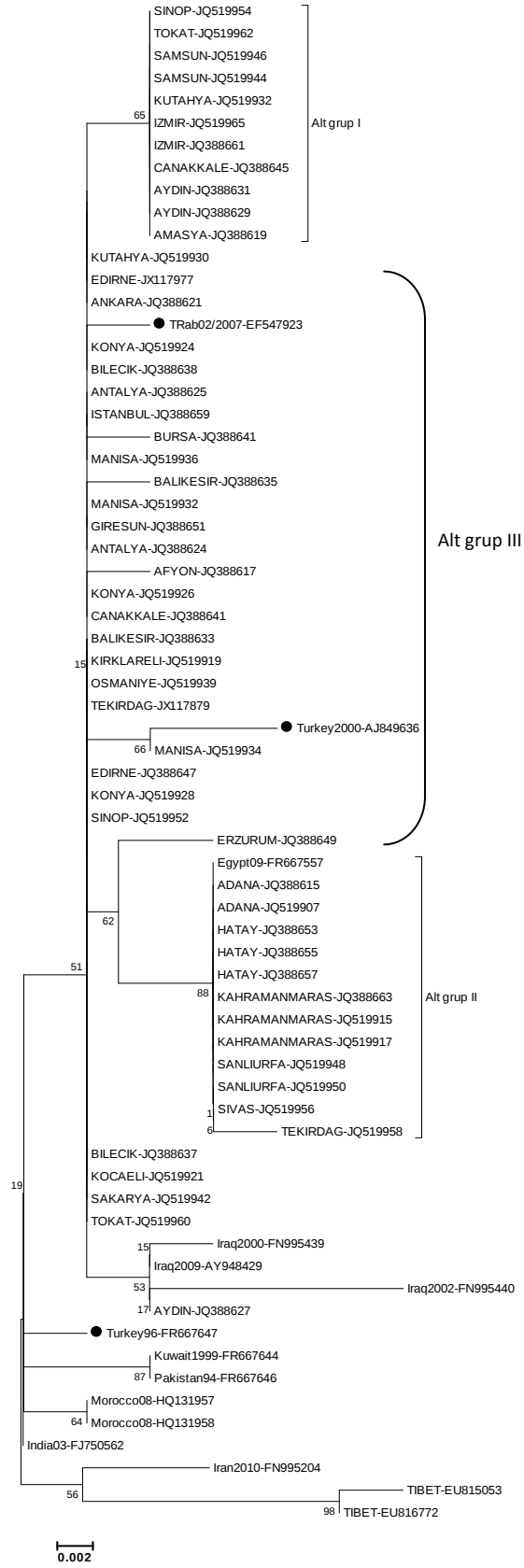
Şekil 3.9. F gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Nigeria/75/1dizini ile aminoasit düzeyinde karşılaştırılması

Çizelge 3.13. F gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Nigeria/75/1 dizini ile aminoasit düzeyinde yüzde benzerlik oranları

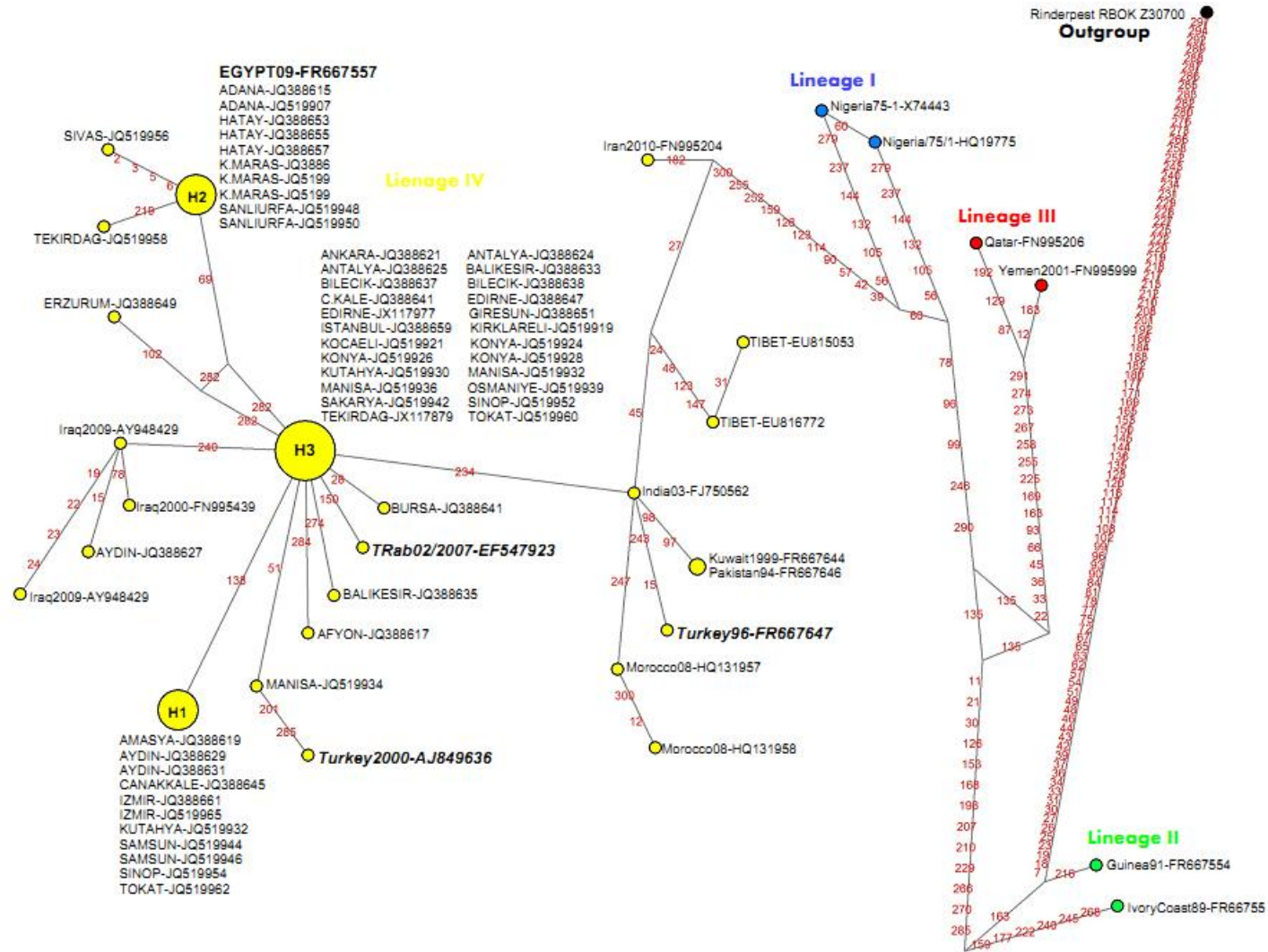
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31		
NIGERIA/75/1-HQ197753	1		98,3	97,5	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	97,5	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	97,5	98,3	98,3	1		
ADANA-JQ388615	2	98,3		99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	2	
AFYON-JQ388617	3	97,5	99,1		99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	98,3	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	98,3	99,1	99,1	3		
AMASYA-JQ388619	4	98,3	100	99,1		100	100	100	100	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	4	
ANKARA-JQ388621	5	98,3	100	99,1	100		100	100	100	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	5	
ANTALYA-JQ388624	6	98,3	100	99,1	100	100		100	100	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	6	
AYDIN-JQ388627	7	98,3	100	99,1	100	100	100		100	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	7	
BALIKESIR-JQ388633	8	98,3	100	99,1	100	100	100	100		100	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	8	
BILECIK-JQ388637	9	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100		99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	9	
BURSA-JQ388641	10	97,5	99,1	98,3	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1		99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	98,3	99,1	99,1	10		
CANAKKALE-JQ388641	11	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	11	
EDIRNE-JQ388647	12	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	12	
ERZURUM-JQ388649	13	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	13	
GİRESUN-JQ388651	14	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	100		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	14	
HATAY-JQ388653	15	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	100	100		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	15	
İSTANBUL-JQ388659	16	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	16	
İZMİR-JQ388661	17	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	17	
K.MARAS-JQ388663	18	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	18	
KIRKLARELİ-JQ519919	19	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	19	
KOCAELİ-JQ519921	20	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	20	
KONYA-JQ519924	21	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	21	
KUTAHYA-JQ519930	22	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100	99,1	100	100	22	
MANİSA-JQ519932	23	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		100	100	100	99,1	100	100	100	23	
OSMANIYE-JQ519939	24	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		100	100	99,1	100	100	100	24	
SAKARYA-JQ519942	25	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		100	99,1	100	100	100	25	
SAMSUN-JQ519944	26	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		99,1	100	100	100	26	
SANLIURFA-JQ519948	27	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		99,1	100	100	27	
SİNOP-JQ519952	28	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		99,1	100	100	28
SİVAS-JQ519956	29	97,5	99,1	98,3	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	98,3	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1		99,1	99,1	29	
TEKİRDAG-JQ519958	30	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,1		100	100	30
TOKAT-JQ519960	31	98,3	100	99,1	100	100	100	100	100	100	99,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,1	100		100	31
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31		



Şekil 3.10. F gen kısmi dizinlerinin filogenetik ilişkisi



Şekil 3.11. F gen kısmi dizinler ile komşu ülke dizinleri arasındaki filogenetik ilişki –● Türkiye’de 96-2002 yıllarında saptanan viruslar



Şekil 3.12. F gen kısmi dizinlerinin network analizi

3.2.2. PPRV N Gen Bölgesi Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Filogenetik Analiz

Konvansiyonel N gene yönelik RT-PCR ile pozitif bulunan örneklerden iyi ürün kalitesine sahip olan ve illeri temsil edecek şekilde seçilen 60 adedine dizin analizi yapıldı. Böylece elde edilen N gen kısmi dizinleri nükleotid düzeyinde Turkey2000 dizini ile karşılaştırıldı ve 1415. (G→T), 1460. (G→A) ve 1473. (T→C) nükleotidlerdeki değişimlerin tüm dizinlerde olduğu tespit edildi. Bunlara ek olarak, aminoasit değişimine sebebiyet vermesine rağmen, tüm dizinlerde görülmeyen 1452. (A→C), 1482. (C→T), 1529. (G→A), 1583. (C→T) ve 1615. (A→G) nükleotidlerde de değişimler tespit edildi. Tespit edilen tüm nükleotid değişimleri Çizelge 3.14 ve Şekil 3.13'te gösterildi. N gen kısmi dizinlerinde meydana gelen bu nükleotid değişimlerine ilişkin olarak, çalışmada elde edilen dizinler kendi aralarında %97,2-100, Turkey2000 dizini ile %97,5-98,9 oranında bir benzerliğin olduğu tespit edildi (Çizelge 3.15). Tam ve kısmi nükleotid değişimlerine bağlı olarak elde edilen N gen kısmi dizinlerinde, Turkey2000 dizinine göre 6 adet aminoasit değişimi tespit edildi. Aminoasit değişimleri ve tüm genomdaki yerleşimiyle ilgili bilgiler Çizelge 3.14'te verildi.

Çizelge 3.14. N gen kısmi dizinlerinde Turkey2000 dizinine göre meydana gelen nükleotid ve aminoasit değişimlerinin tam genomdaki pozisyonu

Tam Genomdaki Pozisyonu	Nükleotid Değişimi	Amino Asit değişimi	Tam Genomdaki Pozisyonu	Nükleotid Değişimi	Amino Asit değişimi	Tam Genomdaki Pozisyonu	Nükleotid Değişimi	Amino Asit değişimi
1415.nt	G→A	R→K	1473.nt	T→C		1583.nt	C→T	P→L
1452.nt	A→C	K→N	1482.nt	C→T		1615.nt	A→G	R→G
1460.nt	G→A	G→E	1529.nt	G→A	R→K			

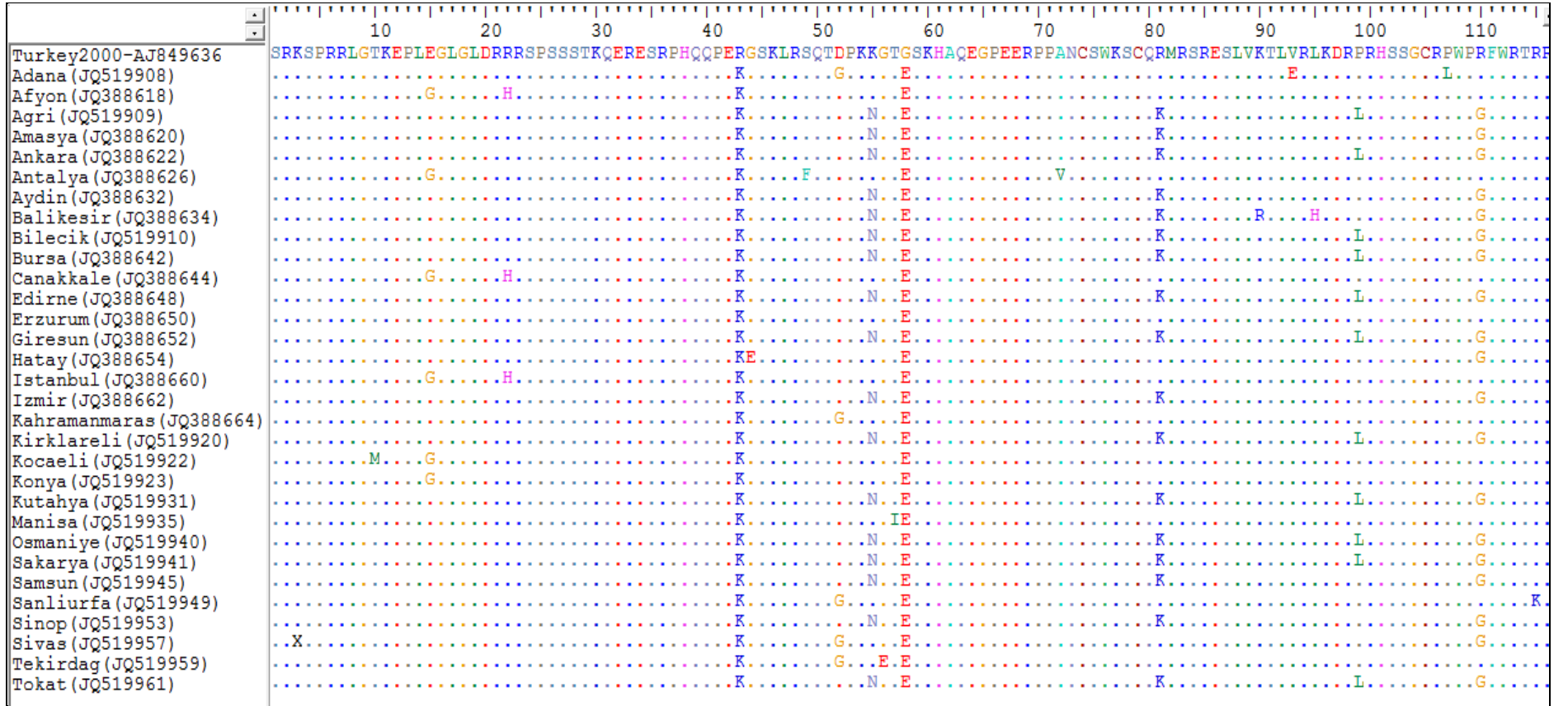
Çalışmada elde edilen N gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Turkey2000 dizini ile aminoasit düzeyinde karşılaştırılmasında, sırasıyla %94,2-100, % 94,2-98,3 oranında bir benzerlik saptandı (Çizelge 3.16).

	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350
Turkey2000-AJ849636	GCCAGAGGATGAGGTCTCGCGAGAGTCTGGTCAAAACCCCTCGTGAGGCTCAAAGATCGGCCGAGGCACCTCTTCAGGCTGCAGGCCATGGCCAAGATTCTGGAGGACCAGGAGGAGC											
Adana (JQ519908)					A.....					T.....		
Afyon (JQ388618)												
Agri (JQ519909)		A.....					T.....			G.....		
Amasya (JQ388620)		A.....								G.....		
Ankara (JQ388622)		A.....					T.....			G.....		
Antalya (JQ388626)												
Aydin (JQ388632)		A.....								G.....		
Balikesir (JQ388634)		A.....			G.....	A.....				G.....		
Bilecik (JQ519910)		A.....					T.....			G.....		
Bursa (JQ388642)		A.....					T.....			G.....		
Canakkale (JQ388644)												
Edirne (JQ388648)		A.....					T.....			G.....		
Erzurum (JQ388650)												
Giresun (JQ388652)		A.....					T.....			G.....		
Hatay (JQ388654)										G.....		
Istanbul (JQ388660)												
Izmir (JQ388662)		A.....								G.....		
Kahramanmaraş (JQ388664)												A.....
Kirklareli (JQ519920)		A.....					T.....			G.....		
Kocaeli (JQ519922)												
Konya (JQ519923)												
Kutahya (JQ519931)		A.....					T.....			G.....		
Manisa (JQ519935)												
Osmaniye (JQ519940)		A.....					T.....			G.....		
Sakarya (JQ519941)		A.....					T.....			G.....		
Samsun (JQ519945)		A.....								G.....		
Sanliurfa (JQ519949)												A.....
Sinop (JQ519953)		A.....								G.....		
Sivas (JQ519957)										G.....		
Tekirdag (JQ519959)												
Tokat (JQ519961)		A.....					T.....			G.....		

Şekil 3.13.'ün devamı

Çizelge 3.15. N gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Türkiye2000 dizini arası nükleotid düzeyinde yüzde benzerlik oranları

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32		
Turkey2000-AJ849636	1		98,3	98,3	97,8	98	97,8	98	97,8	97,5	97,8	97,8	98,3	97,8	98,9	97,8	98,6	98,3	97,8	98	97,8	98,3	98,6	97,8	98,6	97,8	98	98,6	98	98	98,6	97,8	1		
Adana(JQ519908)	2	98,3		98,3	97,8	98	97,8	98	97,8	97,5	97,8	97,8	98,3	97,8	98,9	97,8	98,6	98,3	97,8	98,6	97,8	98,3	98,6	97,8	98	97,8	97,8	98	99,1	98	98,6	99,1	97,8	2	
Afyon(JQ388618)	3	98,3	98,3		98,3	98,6	98,3	99,1	98,3	98	98,3	98,3	100	98,3	99,4	98,3	98,6	100	98,3	98	98,3	99,4	99,7	98,3	98	98,3	98,3	98,6	98,6	98,6	98	98,6	98,3	3	
Agri(JQ519909)	4	97,8	97,8	98,3		99,7	100	98	99,4	99,1	100	100	98,3	100	98,9	100	98,6	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6	100	97,5	100	100	99,7	98	99,7	98	98	100	4	
Amasya(JQ388620)	5	98	98	98,6	99,7		99,7	98,3	99,7	99,4	99,7	99,7	98,6	99,7	99,1	99,7	98,9	98,6	99,7	97,8	99,7	98,6	98,9	99,7	97,8	99,7	99,7	100	98,3	100	98,3	98,3	99,7	5	
Ankara(JQ388622)	6	97,8	97,8	98,3	100	99,7		98	99,4	99,1	100	100	98,3	100	98,9	100	98,6	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6	100	97,5	100	100	99,7	98	99,7	98	98	100	6	
Antalya(JQ388626)	7	98	98	99,1	98	98,3	98		98	97,8	98	98	99,1	98	99,1	98	98,3	99,1	98	97,8	98	99,1	99,4	98	97,8	98	98	98,3	98,3	98,3	97,8	98,3	98	7	
Aydin(JQ388632)	8	97,8	97,8	98,3	99,4	99,7	99,4	98		99,1	99,4	99,4	98,3	99,4	98,9	99,4	98,6	98,3	100	97,5	99,4	98,3	98,6	99,4	97,5	99,4	99,4	99,7	98	99,7	98	98	99,4	8	
Balikesir(JQ388634)	9	97,5	97,5	98	99,1	99,4	99,1	97,8	99,1		99,1	99,1	98	99,1	98,6	99,1	98,3	98	99,1	97,2	99,1	98	98,3	99,1	97,2	99,1	99,1	99,4	97,8	99,4	97,8	97,8	99,1	9	
Bilecik(JQ519910)	10	97,8	97,8	98,3	100	99,7	100	98	99,4	99,1		100	98,3	100	98,9	100	98,6	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6	100	97,5	100	100	99,7	98	99,7	98	98	100	10	
Bursa(JQ388642)	11	97,8	97,8	98,3	100	99,7	100	98	99,4	99,1	100		98,3	100	98,9	100	98,6	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6	100	97,5	100	100	99,7	98	99,7	98	98	100	11	
Canakkale(JQ388644)	12	98,3	98,3	100	98,3	98,6	98,3	99,1	98,3	98	98,3	98,3		98,3	99,4	98,3	98,6	100	98,3	98	98,3	99,4	99,7	98,3	98	98,3	98,3	98,6	98,6	98,6	98	98,6	98,3	12	
Edirne(JQ388648)	13	97,8	97,8	98,3	100	99,7	100	98	99,4	99,1	100	100	98,3		98,9	100	98,6	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6	100	97,5	100	100	99,7	98	99,7	98	98	100	13	
Erzurum(JQ388650)	14	98,9	98,9	99,4	98,9	99,1	98,9	99,1	98,9	98,6	98,9	98,9	99,4	98,9		98,9	99,1	99,4	98,9	98,6	98,9	99,4	99,7	98,9	98,6	98,9	98,9	99,1	99,1	98,6	99,1	98,9	14		
Giresun(JQ388652)	15	97,8	97,8	98,3	100	99,7	100	98	99,4	99,1	100	100	98,3	100	98,9		98,6	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6	100	97,5	100	100	99,7	98	99,7	98	98	100	15	
Hatay(JQ388654)	16	98,6	98,6	98,6	98,6	98,9	98,6	98,3	98,6	98,3	98,6	98,6	98,6	98,6	99,1	98,6		98,6	98,6	98,3	98,6	98,6	98,9	98,6	98,3	98,6	98,6	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,6	16	
Istanbul(JQ388660)	17	98,3	98,3	100	98,3	98,6	98,3	99,1	98,3	98	98,3	98,3	100	98,3	99,4	98,3	98,6		98,3	98	98,3	99,4	99,7	98,3	98	98,3	98,3	98,6	98,6	98,6	98	98,6	98,3	17	
Izmir(JQ388662)	18	97,8	97,8	98,3	99,4	99,7	99,4	98	100	99,1	99,4	99,4	98,3	99,4	98,9	99,4	98,6	98,3		97,5	99,4	98,3	98,6	99,4	97,5	99,4	99,4	99,7	98	99,7	98	98	99,4	18	
K.maras(JQ388664)	19	98	98,6	98	97,5	97,8	97,5	97,8	97,5	97,2	97,5	97,5	98	97,5	98,6	97,5	98,3	98	97,5		97,5	98	98,3	97,5	98,3	97,5	97,5	97,5	97,8	98,9	97,8	98,9	98,9	97,5	19
Kirklareli(JQ519920)	20	97,8	97,8	98,3	100	99,7	100	98	99,4	99,1	100	100	98,3	100	98,9	100	98,6	98,3	99,4	97,5		98,3	98,6	100	97,5	100	100	99,7	98	99,7	98	98	100	20	
Kocaeli(JQ519922)	21	98,3	98,3	99,4	98,3	98,6	98,3	99,1	98,3	98	98,3	98,3	99,4	98,3	99,4	98,3	98,6	99,4	98,3	98	98,3		99,7	98,3	98	98,3	98,3	98,6	98,6	98,6	98	98,6	98,3	21	
Konya(JQ519923)	22	98,6	98,6	99,7	98,6	98,9	98,6	99,4	98,6	98,3	98,6	98,6	99,7	98,6	99,7	98,6	98,9	99,7	98,6	98,3	98,6	99,7		98,6	98,3	98,6	98,6	98,9	98,9	98,9	98,3	98,9	98,6	22	
Kutahya(JQ519931)	23	97,8	97,8	98,3	100	99,7	100	98	99,4	99,1	100	100	98,3	100	98,9	100	98,6	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6		97,5	100	100	99,7	98	99,7	98	98	100	23	
Manisa(JQ519935)	24	98,6	98	98	97,5	97,8	97,5	97,8	97,5	97,2	97,5	97,5	98	97,5	98,6	97,5	98,3	98	97,5	98,3	97,5	98	98,3	97,5		97,5	97,5	97,8	98,3	97,8	97,8	98,3	97,5	24	
Osmaniye(JQ519940)	25	97,8	97,8	98,3	100	99,7	100	98	99,4	99,1	100	100	98,3	100	98,9	100	98,6	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6	100	97,5		100	99,7	98	99,7	98	98	100	25	
Sakarya(JQ519941)	26	97,8	97,8	98,3	100	99,7	100	98	99,4	99,1	100	100	98,3	100	98,9	100	98,6	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6	100	97,5	100		99,7	98	99,7	98	98	100	26	
Samsun(JQ519945)	27	98	98	98,6	99,7	100	99,7	98,3	99,7	99,4	99,7	99,7	98,6	99,7	99,1	99,7	98,9	98,6	99,7	97,8	99,7	98,6	98,9	99,7	97,8	99,7	99,7	98,3	100	98,3	98,3	99,7	27		
Sanliurfa(JQ519949)	28	98,6	99,1	98,6	98	98,3	98	98,3	98	97,8	98	98	98,6	98	99,1	98	98,9	98,6	98	98,9	98	98,6	98,9	98	98,3	98	98	98,3		98,3	98,9	99,4	98	28	
Sinop(JQ519953)	29	98	98	98,6	99,7	100	99,7	98,3	99,7	99,4	99,7	99,7	98,6	99,7	99,1	99,7	98,9	98,6	99,7	97,8	99,7	98,6	98,9	99,7	97,8	99,7	99,7	100	98,3		98,3	98,3	99,7	29	
Sivas(JQ519957)	30	98	98,6	98	98	98,3	98	97,8	98	97,8	98	98	98	98	98,6	98	98,9	98	98	98,9	98	98	98,3	98	97,8	98	98	98,3	98,9	98,3		98,9	98	30	
Tekirdag(JQ519959)	31	98,6	99,1	98,6	98	98,3	98	98,3	98	97,8	98	98	98,6	98	99,1	98	98,9	98,6	98	98,9	98	98,6	98,9	98	98,3	98	98	98,3	99,4	98,3	98,9		98	31	
Tokat(JQ519961)	32	97,8	97,8	98,3	100	99,7	100	98	99,4	99,1	100	100	98,3	100	98,9	100	98,6	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6	100	97,5	100	100	99,7	98	99,7	98	98		32	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32		



Şekil 3.14. N gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Turkey2000 dizini ile aminoasit düzeyinde karşılaştırılması

Çizelge 3.16. N gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Türkiye2000 dizini arası aminoasit yüzde benzerlik oranları

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
Turkey2000-AJ849636	1		95,9	96,7	95	95,9	95	95,9	95	94,2	95	95	96,7	95	98,3	95	96,7	96,7	95	96,7	95	96,7	97,5	95	97,5	95	95	95,9	96,7	95,9	95,9	96,7	95	1
Adana(JQ519908)	2	95,9		95,9	94,2	95	94,2	95	94,2	93,4	94,2	94,2	95,9	94,2	97,5	94,2	95,9	95,9	94,2	97,5	94,2	95,9	96,7	94,2	96,7	94,2	94,2	95	97,5	95	96,7	97,5	94,2	2
Afyon(JQ388618)	3	96,7	95,9		95	95,9	95	97,5	95	94,2	95	95	100	95	98,3	95	96,7	100	95	96,7	95	98,3	99,1	95	97,5	95	95	95,9	96,7	95,9	95,9	96,7	95	3
Agri(JQ519909)	4	95	94,2	95		99,1	100	94,2	98,3	97,5	100	100	95	100	96,7	100	96,7	95	98,3	95	100	95	95,9	100	95,9	100	100	99,1	95	99,1	95,9	95	100	4
Amasya(JQ388620)	5	95,9	95	95,9	99,1		99,1	95	99,1	98,3	99,1	99,1	95,9	99,1	97,5	99,1	97,5	95,9	99,1	95,9	99,1	95,9	96,7	99,1	96,7	99,1	99,1	100	95,9	100	96,7	95,9	99,1	5
Ankara(JQ388622)	6	95	94,2	95	100	99,1		94,2	98,3	97,5	100	100	95	100	96,7	100	96,7	95	98,3	95	100	95	95,9	100	95,9	100	100	99,1	95	99,1	95,9	95	100	6
Antalya(JQ388626)	7	95,9	95	97,5	94,2	95	94,2		94,2	93,4	94,2	94,2	97,5	94,2	97,5	94,2	95,9	97,5	94,2	95,9	94,2	97,5	98,3	94,2	96,7	94,2	94,2	95	95,9	95	95	95,9	94,2	7
Aydin(JQ388632)	8	95	94,2	95	98,3	99,1	98,3	94,2		97,5	98,3	98,3	95	98,3	96,7	98,3	96,7	95	100	95	98,3	95	95,9	98,3	95,9	98,3	98,3	99,1	95	99,1	95,9	95	98,3	8
Balikesir(JQ388634)	9	94,2	93,4	94,2	97,5	98,3	97,5	93,4	97,5		97,5	97,5	94,2	97,5	95,9	97,5	95,9	94,2	97,5	94,2	97,5	94,2	95	97,5	95	97,5	98,3	94,2	98,3	95	94,2	97,5	9	
Bilecik(JQ519910)	10	95	94,2	95	100	99,1	100	94,2	98,3	97,5		100	95	100	96,7	100	96,7	95	98,3	95	100	95	95,9	100	95,9	100	100	99,1	95	99,1	95,9	95	100	10
Bursa(JQ388642)	11	95	94,2	95	100	99,1	100	94,2	98,3	97,5	100		95	100	96,7	100	96,7	95	98,3	95	100	95	95,9	100	95,9	100	100	99,1	95	99,1	95,9	95	100	11
Canakkale(JQ388644)	12	96,7	95,9	100	95	95,9	95	97,5	95	94,2	95	95		95	98,3	95	96,7	100	95	96,7	95	98,3	99,1	95	97,5	95	95	95,9	96,7	95,9	95,9	96,7	95	12
Edirne(JQ388648)	13	95	94,2	95	100	99,1	100	94,2	98,3	97,5	100	100	95		96,7	100	96,7	95	98,3	95	100	95	95,9	100	95,9	100	100	99,1	95	99,1	95,9	95	100	13
Erzurum(JQ388650)	14	98,3	97,5	98,3	96,7	97,5	96,7	97,5	96,7	95,9	96,7	96,7	98,3	96,7		96,7	98,3	98,3	96,7	98,3	96,7	98,3	99,1	96,7	99,1	96,7	96,7	97,5	98,3	97,5	97,5	98,3	96,7	14
Giresun(JQ388652)	15	95	94,2	95	100	99,1	100	94,2	98,3	97,5	100	100	95	100	96,7		96,7	95	98,3	95	100	95	95,9	100	95,9	100	100	99,1	95	99,1	95,9	95	100	15
Hatay(JQ388654)	16	96,7	95,9	96,7	96,7	97,5	96,7	95,9	96,7	95,9	96,7	96,7	96,7	96,7	98,3	96,7		96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	97,5	96,7	97,5	96,7	96,7	97,5	96,7	97,5	96,7	96,7	16	
Istanbul(JQ388660)	17	96,7	95,9	100	95	95,9	95	97,5	95	94,2	95	95	100	95	98,3	95	96,7		95	96,7	95	98,3	99,1	95	97,5	95	95	95,9	96,7	95,9	95,9	96,7	95	17
Izmir(JQ388662)	18	95	94,2	95	98,3	99,1	98,3	94,2	100	97,5	98,3	98,3	95	98,3	96,7	98,3	96,7	95		95	98,3	95	95,9	98,3	95,9	98,3	98,3	99,1	95	99,1	95,9	95	98,3	18
K.maras(JQ388664)	19	96,7	97,5	96,7	95	95,9	95	95,9	95	94,2	95	95	96,7	95	98,3	95	96,7	96,7	95		95	96,7	97,5	95	97,5	95	95	95,9	98,3	95,9	97,5	98,3	95	19
Kirklareli(JQ519920)	20	95	94,2	95	100	99,1	100	94,2	98,3	97,5	100	100	95	100	96,7	100	96,7	95	98,3	95		95	95,9	100	95,9	100	100	99,1	95	99,1	95,9	95	100	20
Kocaeli(JQ519922)	21	96,7	95,9	98,3	95	95,9	95	97,5	95	94,2	95	95	98,3	95	98,3	95	96,7	98,3	95	96,7	95		95	97,5	95	95	95,9	96,7	95,9	95,9	96,7	95	21	
Konya(JQ519923)	22	97,5	96,7	99,1	95,9	96,7	95,9	98,3	95,9	95	95,9	95,9	99,1	95,9	99,1	95,9	97,5	99,1	95,9	97,5	95,9	99,1		95,9	98,3	95,9	95,9	96,7	97,5	96,7	96,7	97,5	95,9	22
Kutahya(JQ519931)	23	95	94,2	95	100	99,1	100	94,2	98,3	97,5	100	100	95	100	96,7	100	96,7	95	98,3	95	100	95	95,9		95,9	100	100	99,1	95	99,1	95,9	95	100	23
Manisa(JQ519935)	24	97,5	96,7	97,5	95,9	96,7	95,9	96,7	95,9	95	95,9	95,9	97,5	95,9	99,1	95,9	97,5	97,5	95,9	97,5	95,9	97,5	98,3	95,9		95,9	95,9	96,7	97,5	96,7	96,7	97,5	95,9	24
Osmaniye(JQ519940)	25	95	94,2	95	100	99,1	100	94,2	98,3	97,5	100	100	95	100	96,7	100	96,7	95	98,3	95	100	95	95,9	100	95,9		100	99,1	95	99,1	95,9	95	100	25
Sakarya(JQ519941)	26	95	94,2	95	100	99,1	100	94,2	98,3	97,5	100	100	95	100	96,7	100	96,7	95	98,3	95	100	95	95,9	100	95,9	100		99,1	95	99,1	95,9	95	100	26
Samsun(JQ519945)	27	95,9	95	95,9	99,1	100	99,1	95	99,1	98,3	99,1	99,1	95,9	99,1	97,5	99,1	97,5	95,9	99,1	95,9	99,1	95,9	96,7	99,1	96,7	99,1		95,9	100	96,7	95,9	99,1	27	
Sanliurfa(JQ519949)	28	96,7	97,5	96,7	95	95,9	95	95,9	95	94,2	95	95	96,7	95	98,3	95	96,7	96,7	95	98,3	95	96,7	97,5	95	97,5	95	95	95,9		95,9	97,5	98,3	95	28
Sinop(JQ519953)	29	95,9	95	95,9	99,1	100	99,1	95	99,1	98,3	99,1	99,1	95,9	99,1	97,5	99,1	97,5	95,9	99,1	95,9	99,1	95,9	96,7	99,1	96,7	99,1	100	95,9		96,7	95,9	99,1	29	
Sivas(JQ519957)	30	95,9	96,7	95,9	95,9	96,7	95,9	95	95,9	95	95,9	95,9	95,9	95,9	97,5	95,9	97,5	95,9	95,9	97,5	95,9	95,9	96,7	95,9	96,7	95,9	95,9	96,7	97,5	96,7		97,5	95,9	30
Tekirdag(JQ519959)	31	96,7	97,5	96,7	95	95,9	95	95,9	95	94,2	95	95	96,7	95	98,3	95	96,7	96,7	95	98,3	95	96,7	97,5	95	97,5	95	95	95,9	98,3	95,9	97,5		95	31
Tokat(JQ519961)	32	95	94,2	95	100	99,1	100	94,2	98,3	97,5	100	100	95	100	96,7	100	96,7	95	98,3	95	100	95	95,9	100	95,9	100	100	99,1	95	99,1	95,9	95		32
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	

Nigeria/75/1 aşı suşu ile çalışmada elde edilen N gen kısmi dizinleri arasında nükleotid bazında yapılan karşılaştırmalarda ise, 35 adet nükleotid değişimi tespit edildi. Nükleotid değişimleri Şekil 3.15 ve Çizelge 3.17’de gösterildi.

Çizelge 3.17. N gen kısmi dizinlerinde Nigeria/75/1 dizinine göre meydana gelen nükleotid değişimlerinin tam genomdaki pozisyonu

Tam Genomdaki Pozisyonu	Nükleotid Değişimi	Tam Genomdaki Pozisyonu	Nükleotid Değişimi	Tam Genomdaki Pozisyonu	Nükleotid Değişimi
1304.nt	A→G	1417.nt*	A→G	1493.nt	A→G
1308.nt*	A→G	1418.nt*	A→G	1500.nt*	G→A
1316.nt	T→C	1439.nt	T→C	1511.nt	T→C
1320.nt	C→A	1442.nt	G→A	1413.nt*	C→T
1327.nt*	T→C	1450.nt*	G→A	1517.nt	G→A
1373.nt	T→C	1459.nt*	C→G	1525.nt*	A→C
1381.nt*	A→G	1465.nt*	G→A	1535.nt	A→G
1382.nt	T→A	1473.nt*	T→C	1536.nt*	C→G
1395.nt*	C→T	1480.nt*	A→G	1551.nt*	A→G
1397.nt	T→C	1482.nt*	C→T	1583.nt	T→C
1398.nt*	A→G	1496.nt	T→C	1615.nt	A→G
1406.nt	G→A	1504.nt*	C→A		

*Aminoasit değişimine sebep olan nükleotidler

N gen kısmi dizinlerinde meydana gelen bu nükleotid değişimlerine ilişkin olarak, çalışmada elde edilen dizinlerin kendi aralarında %97,5-100, Nigeria/75/1 aşı suşu ile %89,3-90,9 oranında benzer oldukları tespit edildi (Çizelge 3.18).

Yapılan analiz sonunda meydana gelen bu nükleotid değişimlerinin Nigeria/75/1 aşı suşuna göre N gen kısmi dizinlerinde 19 adet aminoasit değişimine neden olduğu tespit edildi. N gen kısmi dizinlerinde tespit edilen aminoasit değişimleri Çizelge 3.19 ve Şekil 3.16’da gösterildi.

Çizelge 3.19. N gen kısmi dizinlerinde Nigeria/75/1 dizinine göre meydana gelen aminoasit değişimlerinin genomdaki pozisyonu

Tam Genomdaki Pozisyonu	Nükleotid Değişimi	Amino Asit değişimi	Tam Genomdaki Pozisyonu	Nükleotid Değişimi	Amino Asit değişimi
1304.nt	A→G		1459.nt*	C→G	T→R
1308.nt*	A→G	T→A	1465.nt*	G→A	R→Q
1316.nt	T→C		1473.nt*	T→C	S→P
1320.nt	C→A		1480. nt*	A→G	K→R
1327.nt*	T→C	V→A	1482.nt*	C→T	P→S
1373.nt	T→C		1496.nt	T→C	
1381.nt*	A→G	D→G	1504.nt*	C→A	P→Q
1382.nt	T→A		1493.nt	A→G	
1395.nt*	C→T	P→S	1500.nt*	G→A	G→S
1397.nt	T→C		1511.nt	T→C	
1398.nt*	A→G	T→A	1413.nt*	C→T	P→L
1406.nt	G→A		1517.nt	G→A	
1417.nt*	A→G	E→G	1525.nt*	A→C	Q→P
1418.nt*	A→G		1535.nt	A→G	
1439.nt	T→C		1536.nt*	C→G	L→V
1442.nt	G→A		1551.nt*	A→G	S→G
1450.nt*	G→A	G→E	1583.nt	T→C	
			1615.nt	A→G	K→R

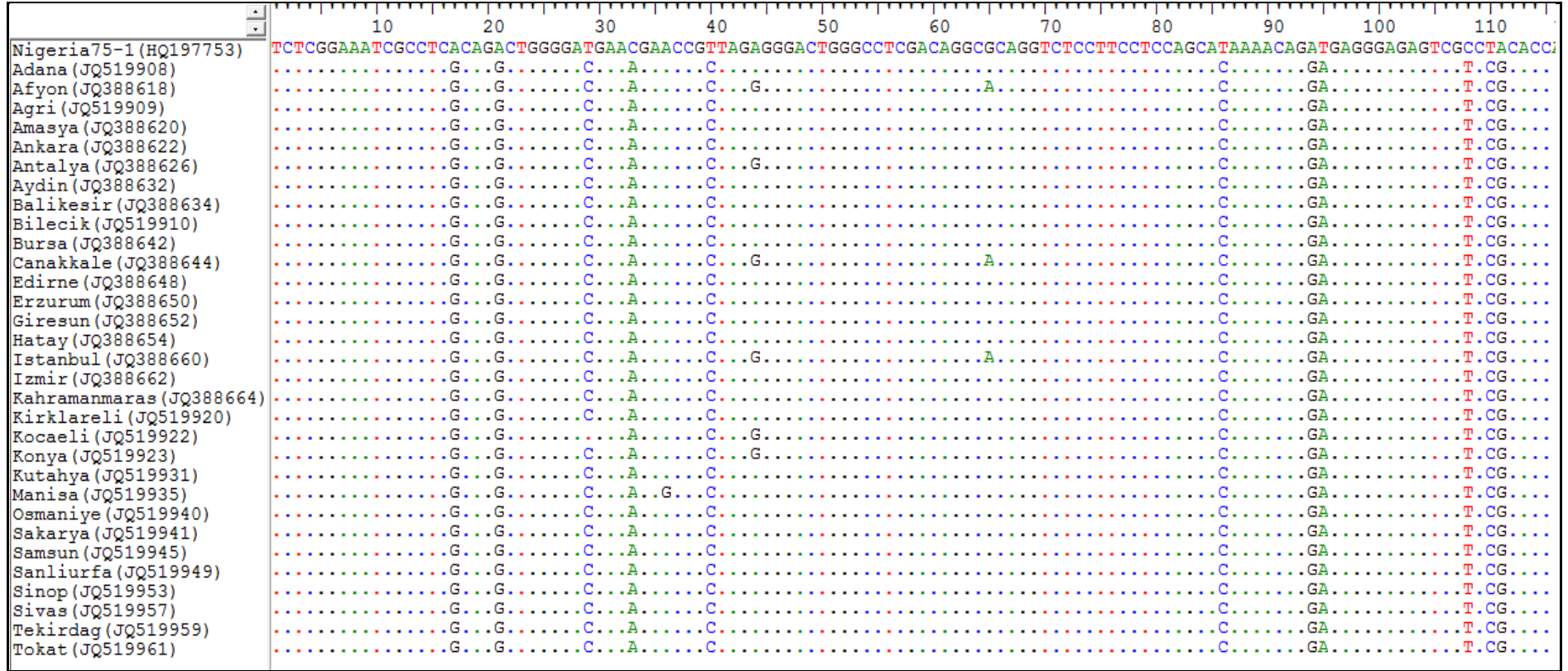
*Aminoasit değişimine sebep olan nükleotidler

N gen kısmi dizinler kendi aralarında ve Nigeria/75/1 dizini ile aminoasit düzeyinde karşılaştırıldığında, sırasıyla %95-100 ve %83,6-86 oranında benzer oldukları saptandı (Çizelge 3.20).

N gen kısmi dizinler ve hatları temsil eden referens dizinler ile birlikte filogenetik ağaç oluşturulduğunda, Türkiye’de sirküle olan PPR viruslarının IV. genetik hat içinde yer aldığı görüldü. F gen kısmi dizinlerinin referens dizinler ile olan ilişkisini gösteren filogram Şekil 3.17’de gösterildi.

Komşu ülkelerde sirküle olan PPR virusları ile çalışmada elde edilen N gen kısmi dizinleri arasındaki uzaklıkların, daha net görülmesi amacıyla oluşturulan filogram Şekil 3.18’de gösterildi. Şekil 3.18’deki filogram incelendiğinde, ülkemizde sirküle olan virusların N gen kısmi dizinlerine göre temelde 3 alt grupta toplandığı tespit edildi. Alt gruplar kendi içinde incelendiklerinde, genel olarak tüm grupların Türkiye’nin değişik illerinden elde edilen virusları içerdiği tespit edildi. Bu sebeple F gen filogramından farklı olarak, N gen filogramında herhangi bir alt grubun belirli bir bölgeyi temsil etmediği görüldü. Ancak aynı illerden elde edilen virusların filogramda birbirleri ile yakın oldukları tespit edildi. Komşu ülkelerden özellikle İran ve Irak dizinlerinin Türkiye dizinleri ile daha yakın ilişkili oldukları tespit edildi.

Çalışmada elde edilen N gen kısmi dizinlerinin evrimsel sürecini incelemek amacıyla DnaSP v.5 (Librado, P. ve Rozas, J., 2009; <http://www.ub.edu/dnasp/>) ve NETWORK Software (<http://www.fluxus-engineering.com>) programları ile star contraction algorithm (Forster ve ark., 2001) ve median-joining (MJ) network algorithm (Bandelt ve ark., 1999) parametreleri kullanılarak network analizi yapıldı (Şekil 3.19). Network analizinde, çalışmada elde edilen tüm dizinlerin sarı renkle ifade edilen IV. genetik hat içinde yer aldığı görüldü. Ayrıca filogenetik analizde ağırlıklı olarak alt grup I içinde yer alan dizinlerin haplogrup 1 (H1) içinde, alt grup II içinde yer alan dizinlerin haplogrup 2 (H2) ve alt grup III içinde yer alan dizinlerin haplogrup 3 (H3) içinde yer aldığı tespit edildi. Network analiz incelendiğinde, H2 ile H3 arasında iki adet (97 ve 175); H2 ile H1 arasında da bir adet nükleotid (229) farklılığı tespit edildi. Irak’ta tespit edilen Iraq-2011 (JF969755) (Hoffmann ve ark., 2012) ve İran’da tespit edilen IR-URM332/11 (JX898860) ve IR-URM333/11 (JX898861) (Faraji Majarashin, 2013) dizinleri diğer ülke dizinlerine göre Türkiye dizinlerine en yakın dizin olarak tespit edildi.



Şekil 3.15. N gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Nigeria/75/1 dizini ile nükleotid düzeyinde karşılaştırılması

	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230
Nigeria75-1 (HQ197753)	GCGACCAGAGAAGAAGTCAAAGCTGCGATCCCAAAATGGGTCCGAAGGAAGGGACACAAAGCGAACACGCTCAGGAAAGCCCAGAGGAGAAACTCCCGGCCCACTGCTTCCGGAGAG											
Adana (JQ519908)	..A.....GG.....C.....A.....G.....A.....C.....G.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Afyon (JQ388618)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Agri (JQ519909)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Amasya (JQ388620)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Ankara (JQ388622)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Antalya (JQ388626)	..A.....GG.....T.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.T..A.....C.T...A..											
Aydin (JQ388632)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Balikesir (JQ388634)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Bilecik (JQ519910)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Bursa (JQ388642)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Canakkale (JQ388644)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Edirne (JQ388648)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Erzurum (JQ388650)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Giresun (JQ388652)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Hatay (JQ388654)	..A.....G.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.....G.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Istanbul (JQ388660)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Izmir (JQ388662)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Kahramanmaraş (JQ388664)	..A.....GG.....A.....T.....C.....A.....A.....G.....A.....C.....G.....G.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Kirklareli (JQ519920)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Kocaeli (JQ519922)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Konya (JQ519923)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Kutahya (JQ519931)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Manisa (JQ519935)	..A.....GG.....T.....C..A.....A.....G.....A.....T.....G.....G.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Osmaniye (JQ519940)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Sakarya (JQ519941)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Samsun (JQ519945)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Sanliurfa (JQ519949)	..A.....GG.....C.....A.....G.....A.....C.....G.....G.....G.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Sinop (JQ519953)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Sivas (JQ519957)	..A.....GG.....A.....C.....A.....G.....A.....C.....G.....G.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Tekirdag (JQ519959)	..A.....GG.....C.....A.....A.....G.....A.....C.....G.....G.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											
Tokat (JQ519961)	..A.....GG.....C..A.....A.....G.....A.....C.....G.T.....G.....C.....A.....A.....C.T...A..											

Şekil 3.15.'in devamı

	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	
Nigeria75-1 (HQ197753)	ATGCAAGAGGATGA	ACTCTCGCGAGAGT	CTAGTCAAAACCC	TCGTGAGGCTCAA	AGATCGGCTGAGG	CACCTTCAGGCTG	CAGGCCATGGCCA	AAGATTCTGGAGG	ACCAGGAGGA			
Adana (JQ519908)	..C.....GG	..G.....A.....	..C.....	..T.....	..C.....	..T.....	..C.....	..T.....	..C.....	..T.....	..C.....	
Afyon (JQ388618)	..C.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Agri (JQ519909)	..C..A.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Amasya (JQ388620)	..C..A.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Ankara (JQ388622)	..C..A.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Antalya (JQ388626)	..C.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Aydin (JQ388632)	..C..A.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Balikesir (JQ388634)	..C..A.....GG	..G.....G.....A.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Bilecik (JQ519910)	..C..A.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Bursa (JQ388642)	..C..A.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Canakkale (JQ388644)	..C.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Edirne (JQ388648)	..C..A.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Erzurum (JQ388650)	..C.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Giresun (JQ388652)	..C..A.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Hatay (JQ388654)	..C.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Istanbul (JQ388660)	..C.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Izmir (JQ388662)	..C..A.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Kahramanmaraş (JQ388664)	..C.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Kirklareli (JQ519920)	..C..A.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Kocaeli (JQ519922)	..C.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Konya (JQ519923)	..C.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Kutahya (JQ519931)	..C..A.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Manisa (JQ519935)	..C.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Osmaniye (JQ519940)	..C..A.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Sakarya (JQ519941)	..C..A.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Samsun (JQ519945)	..C..A.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Sanliurfa (JQ519949)	..C.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Sinop (JQ519953)	..C..A.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Sivas (JQ519957)	..C.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Tekirdag (JQ519959)	..C.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	
Tokat (JQ519961)	..C..A.....GG	..G.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	..C.....	

Şekil 3.15.'in devamı

Çizelge 3.18. N gen kısmi dizinlerinin kendi ararında ve Nigeria/75/1 dizini arası nükleotid yüzde benzerlik oranları

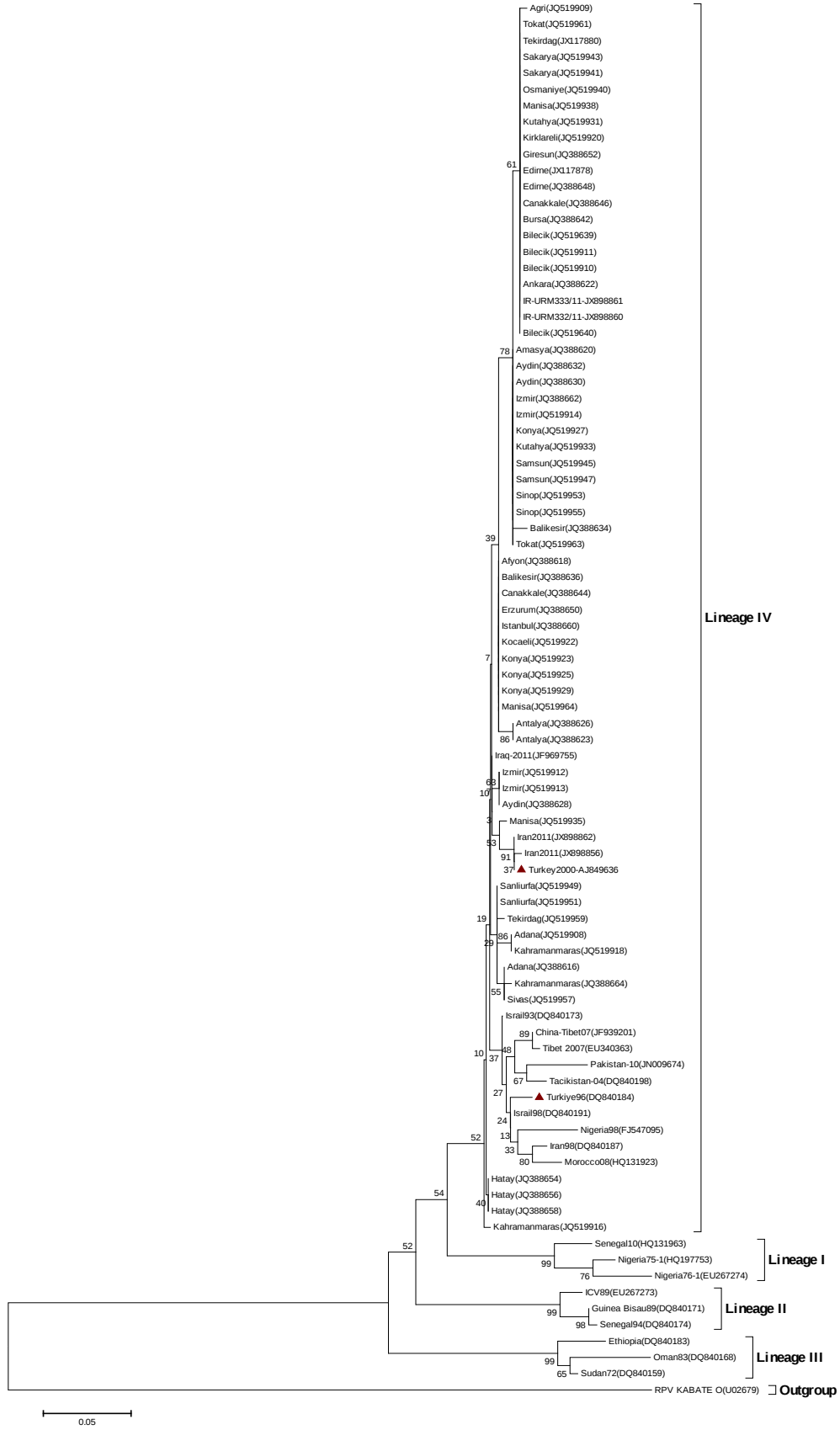
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
Nigeria75-1(HQ197753)	1		90,7	90,1	89,8	89,8	90,1	89,8	89,6	89,3	90,1	90,1	90,1	90,1	90,7	90,1	90,7	90,1	89,6	90,4	90,1	90,7	90,4	90,1	90,4	90,1	90,1	89,8	90,9	89,8	90,4	90,9	90,1	1
Adana(JQ519908)	2	90,7		98,3	97,5	98	97,8	98	97,8	97,5	97,8	97,8	98,3	97,8	98,9	97,8	98,3	98,3	97,8	98,6	97,8	98,3	98,6	97,8	98	97,8	97,8	98	99,1	98	98,6	99,1	97,8	2
Afyon(JQ388618)	3	90,1	98,3		98	98,6	98,3	99,1	98,3	98	98,3	98,3	100	98,3	99,4	98,3	98,3	100	98,3	98	98,3	99,4	99,7	98,3	98	98,3	98,3	98,6	98,6	98,6	98	98,6	98,3	3
Agri(JQ519909)	4	89,8	97,5	98		99,4	99,7	97,8	99,1	98,9	99,7	99,7	98	99,7	98,6	99,7	98	98	99,1	97,2	99,7	98	98,3	99,7	97,2	99,7	99,7	99,4	97,8	99,4	97,8	97,8	99,7	4
Amasya(JQ388620)	5	89,8	98	98,6	99,4		99,7	98,3	99,7	99,4	99,7	99,7	98,6	99,7	99,1	99,7	98,6	98,6	99,7	97,8	99,7	98,6	98,9	99,7	97,8	99,7	99,7	100	98,3	100	98,3	98,3	99,7	5
Ankara(JQ388622)	6	90,1	97,8	98,3	99,7	99,7		98	99,4	99,1	100	100	98,3	100	98,9	100	98,3	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6	100	97,5	100	100	99,7	98	99,7	98	98	100	6
Antalya(JQ388626)	7	89,8	98	99,1	97,8	98,3	98		98	97,8	98	98	99,1	98	99,1	98	98	99,1	98	97,8	98	99,1	99,4	98	97,8	98	98	98,3	98,3	98,3	97,8	98,3	98	7
Aydin(JQ388632)	8	89,6	97,8	98,3	99,1	99,7	99,4	98		99,1	99,4	99,4	98,3	99,4	98,9	99,4	98,3	98,3	100	97,5	99,4	98,3	98,6	99,4	97,5	99,4	99,4	99,7	98	99,7	98	98	99,4	8
Balikesir(JQ388634)	9	89,3	97,5	98	98,9	99,4	99,1	97,8	99,1		99,1	99,1	98	99,1	98,6	99,1	98	98	99,1	97,2	99,1	98	98,3	99,1	97,2	99,1	99,1	99,4	97,8	97,8	99,1	97,8	99,1	9
Bilecik(JQ519910)	10	90,1	97,8	98,3	99,7	99,7	100	98	99,4	99,1		100	98,3	100	98,9	100	98,3	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6	100	97,5	100	100	99,7	98	99,7	98	98	100	10
Bursa(JQ388642)	11	90,1	97,8	98,3	99,7	99,7	100	98	99,4	99,1	100		98,3	100	98,9	100	98,3	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6	100	97,5	100	100	99,7	98	99,7	98	98	100	11
Canakkale(JQ388644)	12	90,1	98,3	100	98	98,6	98,3	99,1	98,3	98	98,3	98,3		98,3	99,4	98,3	98,3	100	98,3	98	98,3	99,4	99,7	98,3	98	98,3	98,3	98,6	98,6	98,6	98	98,6	98,3	12
Edirne(JQ388648)	13	90,1	97,8	98,3	99,7	99,7	100	98	99,4	99,1	100	100	98,3		98,9	100	98,3	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6	100	97,5	100	100	99,7	98	99,7	98	98	100	13
Erzurum(JQ388650)	14	90,7	98,9	99,4	98,6	99,1	98,9	99,1	98,9	98,6	98,9	98,9	99,4	98,9		98,9	98,9	99,4	98,9	98,6	98,9	99,4	99,7	98,9	98,6	98,9	98,9	99,1	99,1	99,1	98,6	99,1	98,9	14
Giresun(JQ388652)	15	90,1	97,8	98,3	99,7	99,7	100	98	99,4	99,1	100	100	98,3	100	98,9		98,3	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6	100	97,5	100	100	99,7	98	99,7	98	98	100	15
Hatay(JQ388654)	16	90,7	98,3	98,3	98	98,6	98,3	98	98,3	98	98,3	98,3	98,3	98,3	98,9	98,3		98,3	98,3	98	98,3	98,3	98,6	98,3	98	98,3	98,3	98,6	98,6	98,6	99,1	98,6	98,3	16
Istanbul(JQ388660)	17	90,1	98,3	100	98	98,6	98,3	99,1	98,3	98	98,3	98,3	100	98,3	99,4	98,3	98,3		98,3	98	98,3	99,4	99,7	98,3	98	98,3	98,3	98,6	98,6	98,6	98	98,6	98,3	17
Izmir(JQ388662)	18	89,6	97,8	98,3	99,1	99,7	99,4	98	100	99,1	99,4	99,4	98,3	99,4	98,9	99,4	98,3	98,3		97,5	99,4	98,3	98,6	99,4	97,5	99,4	99,4	99,7	98	99,7	98	98	99,4	18
K.maras(JQ388664)	19	90,4	98,6	98	97,2	97,8	97,5	97,8	97,5	97,2	97,5	97,5	98	97,5	98,6	97,5	98	98	97,5		97,5	98	98,3	97,5	98,3	97,5	97,5	97,5	98,9	97,8	98,9	98,9	97,5	19
Kirkilareli(JQ519920)	20	90,1	97,8	98,3	99,7	99,7	100	98	99,4	99,1	100	100	98,3	100	98,9	100	98,3	98,3	99,4	97,5		98,3	98,6	100	97,5	100	100	99,7	98	99,7	98	98	100	20
Kocaeli(JQ519922)	21	90,7	98,3	99,4	98	98,6	98,3	99,1	98,3	98	98,3	98,3	99,4	98,3	99,4	98,3	98,3	99,4	98,3	98	98,3		99,7	98,3	98	98,3	98,3	98,6	98,6	98,6	98	98,6	98,3	21
Konya(JQ519923)	22	90,4	98,6	99,7	98,3	98,9	98,6	99,4	98,6	98,3	98,6	98,6	99,7	98,6	99,7	98,6	98,6	99,7	98,6	98,3	98,6	99,7		98,6	98,3	98,6	98,6	98,9	98,9	98,9	98,3	98,9	98,6	22
Kutahya(JQ519931)	23	90,1	97,8	98,3	99,7	99,7	100	98	99,4	99,1	100	100	98,3	100	98,9	100	98,3	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6		97,5	100	100	99,7	98	99,7	98	98	100	23
Manisa(JQ519935)	24	90,4	98	98	97,2	97,8	97,5	97,8	97,5	97,2	97,5	97,5	98	97,5	98,6	97,5	98	98	97,5	98,3	97,5	98	98,3	97,5		97,5	97,5	97,8	98,3	97,8	97,8	98,3	97,5	24
Osmaniye(JQ519940)	25	90,1	97,8	98,3	99,7	99,7	100	98	99,4	99,1	100	100	98,3	100	98,9	100	98,3	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6	100	97,5		100	99,7	98	99,7	98	98	100	25
Sakarya(JQ519941)	26	90,1	97,8	98,3	99,7	99,7	100	98	99,4	99,1	100	100	98,3	100	98,9	100	98,3	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6	100	97,5	100		99,7	98	99,7	98	98	100	26
Samsun(JQ519945)	27	89,8	98	98,6	99,4	100	99,7	98,3	99,7	99,4	99,7	99,7	98,6	99,7	99,1	99,7	98,6	98,6	99,7	97,8	99,7	98,6	98,9	99,7	97,8	99,7	99,7		98,3	100	98,3	98,3	99,7	27
Sanliurfa(JQ519949)	28	90,9	99,1	98,6	97,8	98,3	98	98,3	98	97,8	98	98	98,6	98	99,1	98	98,6	98,6	98	98,9	98	98,6	98,9	98	98,3	98	98	98,3		98,3	98,9	99,4	98	28
Sinop(JQ519953)	29	89,8	98	98,6	99,4	100	99,7	98,3	99,7	99,4	99,7	99,7	98,6	99,7	99,1	99,7	98,6	98,6	99,7	97,8	99,7	98,6	98,9	99,7	97,8	99,7	99,7	100	98,3		98,3	98,3	99,7	29
Sivas(JQ519957)	30	90,4	98,6	98	97,8	98,3	98	97,8	98	97,8	98	98	98	98	98,6	98	99,1	98	98	98,9	98	98	98,3	98	97,8	98	98	98,3	98,9	98,3		98,9	98	30
Tekirdag(JQ519959)	31	90,9	99,1	98,6	97,8	98,3	98	98,3	98	97,8	98	98	98,6	98	99,1	98	98,6	98,6	98	98,9	98	98,6	98,9	98	98,3	98	98	98,3	99,4	98,3	98,9		98	31
Tokat(JQ519961)	32	90,1	97,8	98,3	99,7	99,7	100	98	99,4	99,1	100	100	98,3	100	98,9	100	98,3	98,3	99,4	97,5	100	98,3	98,6	100	97,5	100	100	99,7	98	99,7	98	98		32
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	

	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	5															
Nigeria75-1 (HQ197753)	ASQTG	DERTV	RGTG	PRQAQV	SFLQHK	TDEGES	PTPAT	REEVKAA	IPNGS	SEGRD	TKRTR	SGKPR	GETPG	PLLP	PEIMQ	EDEL	SRESS	QNP	REAQ	RSAA	EALF	R	LQAMAK	I	L	EDQ	EEGEI
Adana (JQ519908)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..R..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Afyon (JQ388618)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Agri (JQ519909)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	I..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..
Amasya (JQ388620)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..
Ankara (JQ388622)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..
Antalya (JQ388626)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Aydin (JQ388632)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..
Balikesir (JQ388634)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..
Bilecik (JQ519910)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..
Bursa (JQ388642)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..
Canakkale (JQ388644)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Edirne (JQ388648)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..
Erzurum (JQ388650)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Giresun (JQ388652)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..
Hatay (JQ388654)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..R..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..
Istanbul (JQ388660)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Izmir (JQ388662)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..
Kahramanmaraş (JQ388664)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	T..S..	..E..	R..Q..	P..R..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Kirklareli (JQ519920)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..
Kocaeli (JQ519922)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Konya (JQ519923)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Kutahya (JQ519931)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..
Manisa (JQ519935)	..A..	..AA..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	S..	..E..	R..Q..	R..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Osmaniye (JQ519940)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..
Sakarya (JQ519941)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..
Samsun (JQ519945)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..
Sanliurfa (JQ519949)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..R..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Sinop (JQ519953)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..
Sivas (JQ519957)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	T..	..E..	R..Q..	P..R..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..
Tekirdag (JQ519959)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..R..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Tokat (JQ519961)	..A..	..A..	..A..	..A..	..G..	..SA..	..G..	..E..	R..Q..	P..RS..	..SQ..	L..P..	V..	..G..	..P..	V..	..G..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	R..

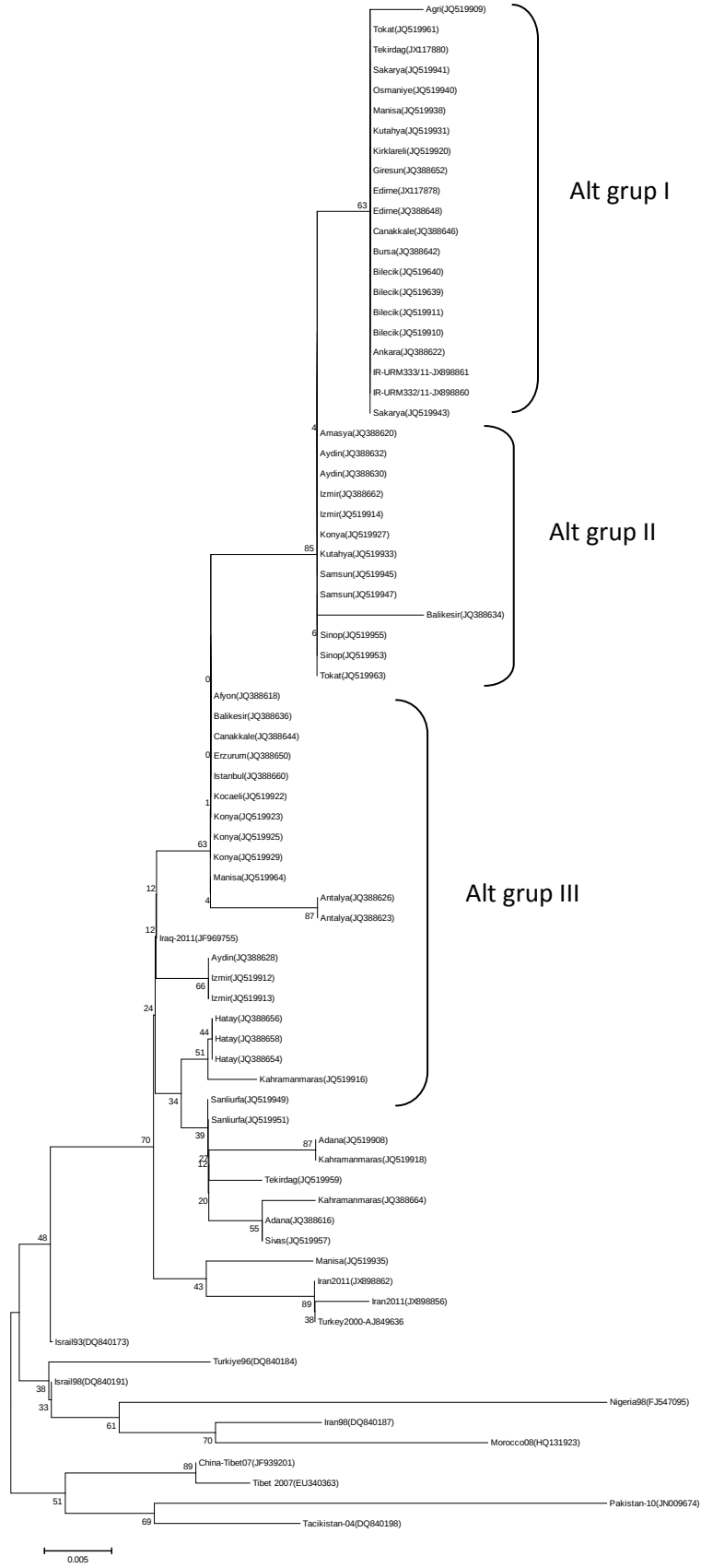
Şekil 3.16. N gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Nigeria/75/1 dizini ile aminoasit düzeyinde karşılaştırılması

Çizelge 3.20. N gen kısmi dizinlerinin kendi aralarında ve Nigeria/75/1 dizini arası aminoasit yüzde benzerlik oranları

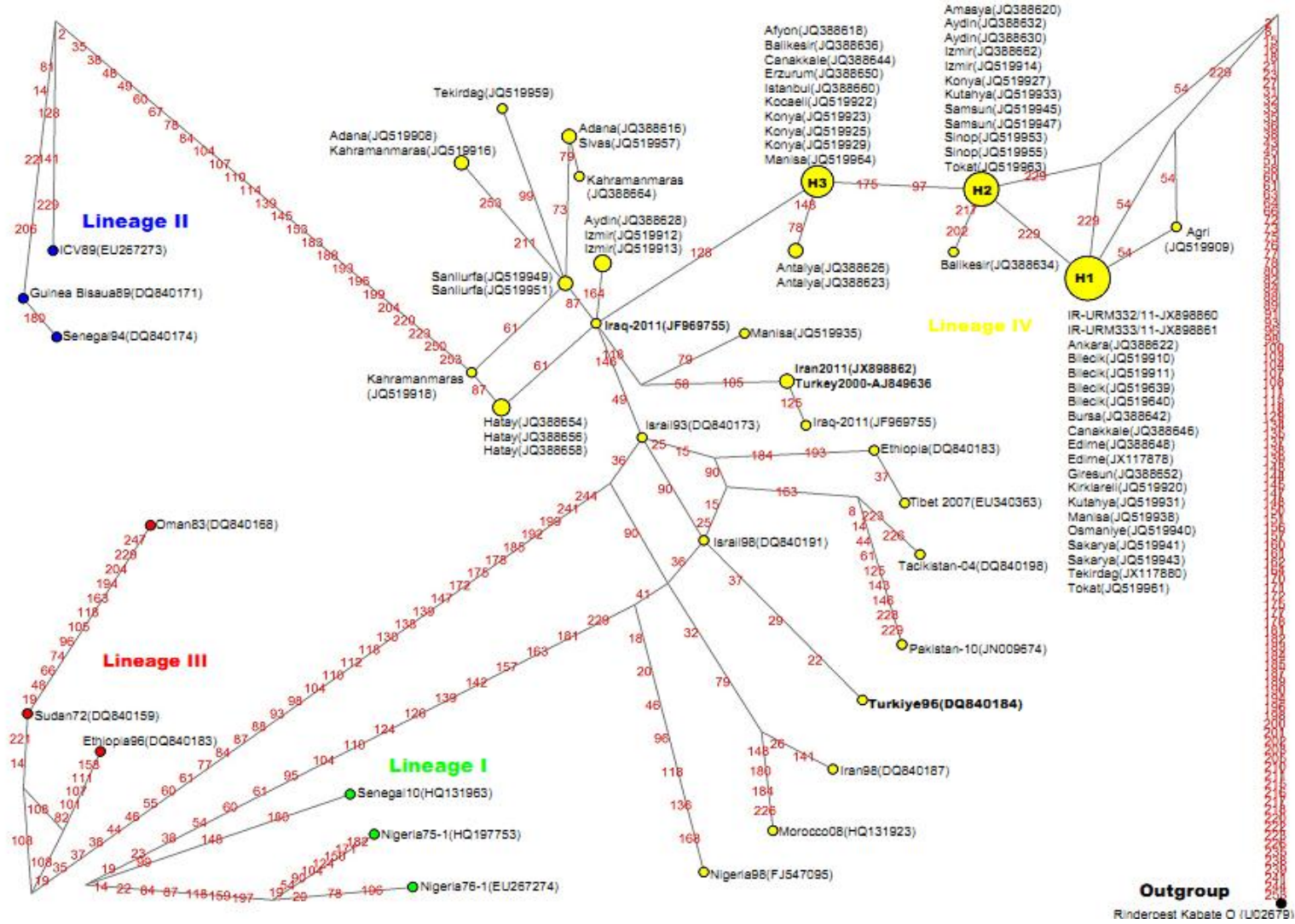
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
Nigeria75-1(HQ197753)	1		86	85,2	83,6	84,4	84,4	85,2	84,4	84,4	84,4	84,4	85,2	84,4	85,2	84,4	84,4	85,2	84,4	84,4	84,4	85,2	85,2	84,4	85,2	84,4	84,4	84,4	86	84,4	83,6	86	84,4	1
Adana(JQ519908)	2	86		99,1	97,5	98,3	98,3	99,1	98,3	98,3	98,3	98,3	99,1	98,3	99,1	98,3	98,3	99,1	98,3	98,3	98,3	99,1	99,1	98,3	97,5	98,3	98,3	100	98,3	97,5	100	98,3	2	
Afyon(JQ388618)	3	85,2	99,1		98,3	99,1	99,1	100	99,1	99,1	99,1	99,1	100	99,1	100	99,1	97,5	100	99,1	97,5	99,1	100	100	99,1	96,7	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	96,7	99,1	99,1	3
Agri(JQ519909)	4	83,6	97,5	98,3		99,1	99,1	98,3	99,1	99,1	99,1	99,1	98,3	99,1	98,3	99,1	97,5	98,3	99,1	95,9	99,1	98,3	98,3	99,1	95	99,1	99,1	99,1	97,5	99,1	96,7	97,5	99,1	4
Amasya(JQ388620)	5	84,4	98,3	99,1	99,1		100	99,1	100	100	100	100	99,1	100	99,1	100	98,3	99,1	100	96,7	100	99,1	99,1	100	95,9	100	100	100	98,3	100	97,5	98,3	100	5
Ankara(JQ388622)	6	84,4	98,3	99,1	99,1	100		99,1	100	100	100	100	99,1	100	99,1	100	98,3	99,1	100	96,7	100	99,1	99,1	100	95,9	100	100	100	98,3	100	97,5	98,3	100	6
Antalya(JQ388626)	7	85,2	99,1	100	98,3	99,1	99,1		99,1	99,1	99,1	99,1	100	99,1	100	99,1	97,5	100	99,1	97,5	99,1	100	100	99,1	96,7	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	96,7	99,1	99,1	7
Aydin(JQ388632)	8	84,4	98,3	99,1	99,1	100	100	99,1		100	100	100	99,1	100	99,1	100	98,3	99,1	100	96,7	100	99,1	99,1	100	95,9	100	100	100	98,3	100	97,5	98,3	100	8
Balikesir(JQ388634)	9	84,4	98,3	99,1	99,1	100	100	99,1	100		100	100	99,1	100	99,1	100	98,3	99,1	100	96,7	100	99,1	99,1	100	95,9	100	100	100	98,3	100	97,5	98,3	100	9
Bilecik(JQ519910)	10	84,4	98,3	99,1	99,1	100	100	99,1	100	100		100	99,1	100	99,1	100	98,3	99,1	100	96,7	100	99,1	99,1	100	95,9	100	100	100	98,3	100	97,5	98,3	100	10
Bursa(JQ388642)	11	84,4	98,3	99,1	99,1	100	100	99,1	100	100	100		99,1	100	99,1	100	98,3	99,1	100	96,7	100	99,1	99,1	100	95,9	100	100	100	98,3	100	97,5	98,3	100	11
Canakkale(JQ388644)	12	85,2	99,1	100	98,3	99,1	99,1	100	99,1	99,1	99,1	99,1		99,1	100	99,1	97,5	100	99,1	97,5	99,1	100	100	99,1	96,7	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	96,7	99,1	99,1	12
Edirne(JQ388648)	13	84,4	98,3	99,1	99,1	100	100	99,1	100	100	100	100	99,1		99,1	100	98,3	99,1	100	96,7	100	99,1	99,1	100	95,9	100	100	100	98,3	100	97,5	98,3	100	13
Erzurum(JQ388650)	14	85,2	99,1	100	98,3	99,1	99,1	100	99,1	99,1	99,1	99,1	100	99,1		99,1	97,5	100	99,1	97,5	99,1	100	100	99,1	96,7	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	96,7	99,1	99,1	14
Giresun(JQ388652)	15	84,4	98,3	99,1	99,1	100	100	99,1	100	100	100	99,1	100	99,1	100		98,3	99,1	100	96,7	100	99,1	99,1	100	95,9	100	100	100	98,3	100	97,5	98,3	100	15
Hatay(JQ388654)	16	84,4	98,3	97,5	97,5	98,3	98,3	97,5	98,3	98,3	98,3	98,3	97,5	98,3	97,5	98,3		97,5	98,3	96,7	98,3	97,5	97,5	98,3	95,9	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	99,1	98,3	98,3	16
Istanbul(JQ388660)	17	85,2	99,1	100	98,3	99,1	99,1	100	99,1	99,1	99,1	99,1	100	99,1	100	99,1	97,5		99,1	97,5	99,1	100	100	99,1	96,7	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	96,7	99,1	99,1	17
Izmir(JQ388662)	18	84,4	98,3	99,1	99,1	100	100	99,1	100	100	100	100	99,1	100	99,1	100	98,3	99,1		96,7	100	99,1	99,1	100	95,9	100	100	100	98,3	100	97,5	98,3	100	18
K.maras(JQ388664)	19	84,4	98,3	97,5	95,9	96,7	96,7	97,5	96,7	96,7	96,7	96,7	97,5	96,7	97,5	96,7	96,7	97,5	96,7		96,7	97,5	97,5	96,7	97,5	96,7	96,7	96,7	98,3	96,7	97,5	98,3	96,7	19
Kirklareli(JQ519920)	20	84,4	98,3	99,1	99,1	100	100	99,1	100	100	100	100	99,1	100	99,1	100	98,3	99,1	100	96,7		99,1	99,1	100	95,9	100	100	100	98,3	100	97,5	98,3	100	20
Kocaeli(JQ519922)	21	85,2	99,1	100	98,3	99,1	99,1	100	99,1	99,1	99,1	99,1	100	99,1	100	99,1	97,5	100	99,1	97,5	99,1		100	99,1	96,7	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	96,7	99,1	99,1	21
Konya(JQ519923)	22	85,2	99,1	100	98,3	99,1	99,1	100	99,1	99,1	99,1	99,1	100	99,1	100	99,1	97,5	100	99,1	97,5	99,1	100		99,1	96,7	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	96,7	99,1	99,1	22
Kutahya(JQ519931)	23	84,4	98,3	99,1	99,1	100	100	99,1	100	100	100	100	99,1	100	99,1	100	98,3	99,1	100	96,7	100	99,1	99,1		95,9	100	100	100	98,3	100	97,5	98,3	100	23
Manisa(JQ519935)	24	85,2	97,5	96,7	95	95,9	95,9	96,7	95,9	95,9	95,9	95,9	96,7	95,9	96,7	95,9	95,9	96,7	95,9	97,5	95,9	96,7	96,7	95,9		95,9	95,9	95,9	97,5	95,9	95	97,5	95,9	24
Osmaniye(JQ519940)	25	84,4	98,3	99,1	99,1	100	100	99,1	100	100	100	99,1	100	99,1	100	98,3	99,1	100	96,7	100	99,1	99,1	100	95,9		100	100	98,3	100	97,5	98,3	100	25	
Sakarya(JQ519941)	26	84,4	98,3	99,1	99,1	100	100	99,1	100	100	100	100	99,1	100	99,1	100	98,3	99,1	100	96,7	100	99,1	99,1	100	95,9	100		100	98,3	100	97,5	98,3	100	26
Samsun(JQ519945)	27	84,4	98,3	99,1	99,1	100	100	99,1	100	100	100	100	99,1	100	99,1	100	98,3	99,1	100	96,7	100	99,1	99,1	100	95,9	100	100		98,3	100	97,5	98,3	100	27
Sanliurfa(JQ519949)	28	86	100	99,1	97,5	98,3	98,3	99,1	98,3	98,3	98,3	98,3	99,1	98,3	99,1	98,3	98,3	99,1	98,3	98,3	98,3	99,1	99,1	98,3	97,5	98,3	98,3	98,3		98,3	97,5	100	98,3	28
Sinop(JQ519953)	29	84,4	98,3	99,1	99,1	100	100	99,1	100	100	100	100	99,1	100	99,1	100	98,3	99,1	100	96,7	100	99,1	99,1	100	95,9	100	100	100	98,3		97,5	98,3	100	29
Sivas(JQ519957)	30	83,6	97,5	96,7	96,7	97,5	97,5	96,7	97,5	97,5	97,5	96,7	97,5	96,7	97,5	99,1	96,7	97,5	97,5	97,5	96,7	96,7	97,5	95	97,5	97,5	97,5	97,5	97,5		97,5	97,5	30	
Tekirdag(JQ519959)	31	86	100	99,1	97,5	98,3	98,3	99,1	98,3	98,3	98,3	98,3	99,1	98,3	99,1	98,3	98,3	99,1	98,3	98,3	98,3	99,1	99,1	98,3	97,5	98,3	98,3	100	98,3	97,5		98,3	31	
Tokat(JQ519961)	32	84,4	98,3	99,1	99,1	100	100	99,1	100	100	100	99,1	100	99,1	100	98,3	99,1	100	96,7	100	99,1	99,1	100	95,9	100	100	100	98,3	100	97,5	98,3		32	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	



Şekil 3.17. N gen kısmi dizinlerinin filogenetik ilişkisi



Şekil 3.18. N gen kısmi dizinlerinin komşu ülke dizinleri ile olan filogenetik ilişkisi



Şekil 3.19. N gen kısmi dizinlerinin network analizi

4. TARTIŞMA

PPR, ülkemizin de içinde bulunduğu geniş bir coğrafyada küçük ruminantlarda önemli ekonomik kayıplara neden olan bir enfeksiyon olarak varlığını sürdürmektedir. Hastalıkla mücadele kapsamında ülkemiz de dahil olmak üzere birçok ülkede aşılama kampanyaları uygulanmaktadır. Ancak buna rağmen PPR, küçük ruminant yetiştiriciliği için hala büyük bir risk faktörü olarak varlığını korumaktadır (Diallo ve ark., 2007). OIE eski sınıflandırmasında PPRV enfeksiyonuna Liste A'da yer verirken, yeni sınıflandırmada ekonomik olarak önemli ihbarı mecburi hastalık şeklinde revize etmiştir. OIE ve FAO başarı ile tamamlanan RP eradikasyon programında olduğu gibi, PPRV enfeksiyonunun da global kontrolü ve ardından eradikasyonu üzerinde durmaktadır. Eradikasyonun ilk basamağını kesin ve güvenilir teşhis oluşturmaktadır. Etkili bir teşhis metodu olmadan duyarlı populasyonlarda enfeksiyonun önemini ve değişkenliğini belirlemek mümkün değildir; bu durum eradikasyon programlarını başarısız kılmaktadır (Banyard ve ark., 2010).

Hastalığın erken klinik teşhisi, benzer semptomlar ile seyreden diğer hastalıklar ile karışabilmesinden dolayı güçtür. Bu yüzden mücadele programlarının hızlı, spesifik ve duyarlı teşhis metotları ile desteklenmesi çok önemlidir. Bu amaçla laboratuvarlarda değişik teşhis teknikleri kullanılmaktadır. Bunlardan virusun hücre kültürlerinde izolasyonu teknik olarak zor ve zaman alıcı olması ve ayrıca morbillivirusların konakçıları dışında dayanıklı olmamaları nedeniyle rutin teşhis aracı olarak çok uygun değildir (Kwiatek ve ark., 2010). Immunocapture ELISA (Libeau ve ark., 1994) ve antigen-competition ELISA (Raj ve ark., 2008) metotları PPRV enfeksiyonunun hızlı ve spesifik teşhisi için kullanılsa da, elverişsiz örnekler ile çalışıldığında yetersiz kalabilmekte ve yanlış sonuçlar verebilmektedirler. Sözü edilen tüm bu tekniklerin dezavantajlarından dolayı PPRV enfeksiyonunun, gen tabanlı hızlı ve spesifik teşhisi için Forsyth ve Barrett (1995) tarafından geliştirilen ve F genin 777-1148. nt.'leri arasında kalan 372 bp'lik bölgeyi amplifiye ederek,

PPRV enfeksiyonunun ayırıcı teşhisini yapan RT-PCR metodu büyük ilgi görmüş ve sonraki çalışmalar için öncülük etmiştir (Balamurugan ve ark., 2010; Kerur ve ark., 2008). Daha sonraki yıllarda değişik araştırmacılar tarafından füzyon (F), nükleoprotein (N) ve matrix (M) proteinlerini kodlayan genleri hedef alan RT-PCR metotları dizayn edilmiştir (Balamurugan ve ark., 2006; Couacy-Hymann ve ark., 2002).

Bu bilgiler ışığında planlanan bu çalışmada, Türkiye'nin değişik bölgelerinde yetiştirilen koyun ve keçilerde PPRV enfeksiyonunun prevalansının belirlenmesi ve enfeksiyonla ilgili olarak güncel verilere ulaşılması ve enfeksiyonun rutin teşhisinde kullanılan Fusion (F) gene dayalı RT-PCR tekniği ile Nükleoprotein (N) gen bölgesini hedef alarak yapılan konvansiyonel ve Real-Time RT-PCR tekniklerinin karşılaştırılması ve enfeksiyonun teşhisinde hızlı, spesifik ve duyarlı metotların ortaya konulmasına çalışılarak, enfeksiyonun kontrol/eradikasyonuna katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, 2010-2012 yılları arasında Türkiye'nin 50 ilinde görülen şüpheli PPR olgularından sağlanan 374 doku, 193 kan ve 7 nasal swap olmak üzere toplam 574 hayvana (473 koyun/101 keçi) ait örnek PPRV nükleik asit varlığı yönünden rutin teşhisinde kullanılan virusun F genini hedef alan konvansiyonel ve N gen bölgesini hedef alan konvansiyonel/rRT-PCR metotları ile kontrol edilmiştir. Üç metot birlikte değerlendirildiğinde kontrol edilen örneklerin %45,8'i (263/574) pozitif olarak belirlenmiştir. Pozitiflik oranları yıllara göre değerlendirildiğinde, 2010 yılında %45,9; 2011 yılında %45,7 ve 2012 yılında %45,9 olarak dağılım göstermektedir. 2010 yılında Avrupa Birliği destekli başlatılan küçükbaş hayvanların küpelenmesi ve PPR'a karşı aşılama projesi kapsamında 2012'ye kadar geçen süreç içerisinde hastalığın insidansında herhangi bir azalmanın olmadığı görülmektedir. Bu durumun dizin analizlerinde tespit edilen yüksek orandaki benzerlik dikkate alındığında, kullanılan aşı suşundan çok kontrolsüz hayvan hareketleri ve aşılama kampanyalarındaki olası aksaklıklarla bağlantılı olabileceği kanısına varılmıştır. Örneklenen türler bazında pozitiflik değerleri, koyunlarda %46,3

ve keçilerde %43.5 olarak bulunmuştur. Pozitiflik değerleri yıllara göre incelendiğinde koyunlarda %46.0-47.1, keçilerde %42.8-44.0 arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir.

Elde edilen bu sonuçlara göre, PPRV enfeksiyonunun Türkiye’de ilk tespitinden bu yana yapılan serolojik ve virolojik çalışmalarla (Albayrak, 2007; Gürçay ve ark., 2013; Özkul ve ark., 2002; Tatar, N. 1998; Toplu ve ark., 2012; Yeşilbağ ve ark., 2005) da ortaya konulduğu üzere, alınan tedbirlere rağmen enfeksiyonun giderek yaygınlaştığı bir kez daha görülmüştür.

Bu çalışmada, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Viral Teşhis Laboratuvarında PPRV enfeksiyonunun rutin teşhisinde kullanılan F gen bölgesini hedef alan konvansiyonel RT-PCR metodu (Özkul ve ark., 2002), N gen bölgesini hedef alan konvansiyonel RT-PCR (Kerur ve ark., 2008) ve rRT-PCR (Kwiatek ve ark., 2010) metotlarıyla karşılaştırılmıştır. Konvansiyonel RT-PCR metotları kullanılarak 574 PPRV enfeksiyonu şüpheli örnekten %35,5 i (204/574) F gen RT-PCR ile, %39,3 ü (226/574) N gen RT-PCR ile pozitif olarak tespit edilmiştir. Saha örneklerine ek olarak, çalışmada kullanılan F ve N genlerini hedef alan konvansiyonel RT-PCR metotlarının performanslarını karşılaştırmak amacıyla pozitif kontrol örnek 10 katlı dilüsyonları hazırlanarak test edilmiştir. Test sonunda N gen bölgesini hedef alan konvansiyonel RT-PCR metodu 10^{-6} dilüsyonda, F geni hedef alan konvansiyonel RT-PCR metodu ise 10^{-4} dilüsyonda pozitif sonuç vermiştir. Bu sonuçlara göre, N gen RT-PCR’in F gen RT-PCR metodundan 2 log daha duyarlı olduğu söylenebilmektedir. Bu sonucun, Kerur ve ark. (2008), Choudhary ve ark. (2009) ve Munir ve ark. (2012)’nin çalışmalarında elde ettikleri sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmüştür. Ghosh ve ark. (1995) N primerlerinin, F primerlerinden daha duyarlı olmasını, PPRV replikasyonu sırasında N gen transkriptlerinin, F gen transkriptlerinden daha fazla sentezlenmesine bağlamaktadırlar.

Konvansiyonel RT-PCR ile elde edilen sonuçlar doku, kan ve swap olmak üzere örnek bazında incelendiğinde ise, örnekler F gen için sırasıyla %31,8 (119/374), %41,9 (81/193) ve %57,1 (4/7) oranında pozitif olarak bulunurken, N gen için sırasıyla %34,7 (130/374), %47,6 (92/193) ve %57,1 (4/7) oranında pozitif olarak tespit edilmiştir. Her iki RT-PCR sonuçları sensitivite bakımından karşılaştırıldığında, kullanılan örnekler açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. Buna göre; alınan örnekler bazında en az doku örneği, ardından kan örneği ve en çok da swap örneğinin RT-PCR’da pozitiflik verdiği belirlenmiştir. Çalışma süresince kan ve swap örnekleri klinik olarak PPR şüphesi ile getirilen ve genellikle hastalığın akut döneminde olan hastalardan alınırken, doku örnekleri hem PPR şüpheli hem de değişik sebeplerle ölmüş ve üzerinden belirli bir zaman geçmiş kadavralardan alınmıştır. Bu nedenle, sonuçlardaki farklılığın örneklerin alınma zamanı ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. PPRV enfeksiyonunun teşhisinde alınan örneklerin uygunluğunun değerlendirildiği çalışmalarda (Lefevre ve Diallo,1990; Durajoiye ve Lefevre, 1996; Diallo ve ark., 1995), ölmüş ya da ileri derecede ishalin şekillendiği hayvanlardan alınan örneklerin yeterli miktarda virus içermemesi nedeniyle teşhis için uygun olamayacağı ve özellikle örneklerin canlı hayvanlardan viremi fazında ve sekonder etkenler olaya karışmadan alınması gerektiği vurgulanmaktadır. Forsyth ve Barrett (1995) RT-PCR tekniği ile defibrine kan örneklerinde %27,7 (5/18), konjunktival swap örneklerinde %20 (1/5), lenf yumrusunda %25 (5/20), dalakta %20 (1/4) oranında viral nükleik asit tespit etmelerine rağmen, akciğerde (0/1), oral swap (0/5) ve nasal swap örneklerinde (0/1) viral nükleik asit tespit edemediklerini bildirmişler ve nekropsi örneği olarak özellikle lenf yumrusunun diğer örneklerle göre daha çok tercih edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Albayrak (2007), RT-PCR ile nekropside alınan lenf yumrusu, dalak ve akciğer örneklerinden sırasıyla %50 (5/10), %22,58 (7/31) ve %17,03 (7/41), klinik enfekte hayvanlardan sağlanan nasal swap ve konjunktival swap örneklerinden sırasıyla %25 (5/20) ve %10 (2/20) oranında pozitiflik saptarken, defibrine kan ve oral swap örneklerinde viral nükleik asit tespit edilmediğini bildirmiştir. Bu veriler Forsyth ve Barrett (1995) tarafından da bildirildiği gibi, lenf yumrularının teşhis materyali olarak en değerli nekropsi materyali olduğunu ve bunun yanı sıra dalak ve akciğer örneklerinin de tanısal değerinin yüksek olduğunu,

canlı hayvanlardan sağlanan materyaller için ise nasal ve konjunktival swap örneklerinin teşhis materyali olarak daha değerli olduğunu ortaya koymuştur. Gürçay ve ark. (2013) Doğu Anadolu bölgesinde keçilerde PPRV enfeksiyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada lenf nodülü, nazal/oral swap, kan, akciğer ve dalak örneklerinde sırasıyla %54, %66, %45, %46 ve %46 oranında pozitiflik tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacıların nazal/oral swap örneklerinde elde ettikleri yüksek pozitiflik oranı, canlı hayvanlardan alınan nasal/konjunktival swap örneklerinin teşhis materyali olarak daha değerli olduğu savını desteklediği gibi, tez çalışmasında konvansiyonel RT-PCR metotları ile elde edilen pozitiflik oranları ile de uyumluluk arz etmektedir.

PCR sonrasında elde edilen ürünler, dizin ve filogenetik analizlere izin verecek yeterli büyüklükte olmasına rağmen, konvansiyonel RT-PCR'ın yüksek verimli otomatik teşhis platformlarına entegre edilememesi, hastalıkların daha etkin kontrolü için istenmeyen bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır (Grant ve ark. 2009). Konvansiyonel RT-PCR metotları zaman ve iş gücü kaybına sebep olabilmekte, jel görüntülemesi gerektirdiğinden ve kontaminasyon riski taşıdığından yüksek verimlilik gerektiren çalışmalar için her zaman kullanılamamaktadırlar. Buna karşılık, tek tüpte amplifikasyon ve analiz işlemlerini tamamlayan rRT-PCR tekniği konvansiyonel RT-PCR tekniğine göre kontaminasyon riskinin daha az olması, RNA'nın kantitasyonuna izin vermesi, daha hızlı ve daha sensitif olması gibi çok sayıda avantaja sahiptir (Bao ve ark., 2008; Kwiatak ve ark., 2010). Bu durum rRT-PCR tekniğinin viral hastalıkların değerlendirilmesinde ve teşhisinde önemini ortaya koymaktadır. Bu öneme istinaden son zamanlarda rRT-PCR tekniği, *Paramyxoviridae* ailesindeki virusların tespiti amacıyla yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Grant ve ark. 2009). Bu amaçla çeşitli rRT-PCR metotları geliştirilmiştir (Grant ve ark. 2009; Hummel ve ark., 2006). PPR virusun spesifik teşhisinde N gen bölgesini hedef alan üç rRT-PCR metodu Kwiatak ve ark. (2010), Batten ve ark. (2011) ve Bao ve ark. (2008) tarafından, M gen bölgesini hedef alan bir rRT-PCR metodu da Balamurugan ve ark. (2010) tarafından geliştirilmiştir. Bao ve ark. (2008) tarafından geliştirilen rRT-PCR metodunun, PPR virusun II., III. ve IV. genetik hatlarını başarıyla tespit edebildiği gösterilmiştir. Bao ve ark. (2008)

tarafından geliştirilen rRT-PCR metodunun Çin’de patlak veren PPR salgınında Wang ve ark. (2009) tarafından enfeksiyonun teşhisinde başarıyla kullanıldığı bildirilmiştir. Özellikle son yıllarda, N proteini kodlayan gene dayalı rRT-PCR metodunun PPRV enfeksiyonun hızlı teşhisini sağlamasının yanı sıra oldukça duyarlı olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Bao ve ark., 2008; Choudhary ve ark., 2009; Kwiatak ve ark., 2010; Kerur ve ark., 2008; Maganga ve ark., 2013).

Bu çalışmada Kwiatak ve ark.’nın (2010) geliştirmiş oldukları ve PPR virusunun 4 farklı genetik hattını tespit edebilen primer-prob seti kullanılmıştır. Ancak metodun laboratuvarında optimizasyonu sırasında prob, araştırmacı tarafından bildirilenden farklı olarak FAM-TAMRA şeklinde işaretlenerek kullanılmıştır. Primer-prob seti, PPR virusun teşhisinde yüksek spesifiteye ulaşmak amacıyla morbillivirus N gen bölgesinin en az korunmuş kısmı olan C terminal ucunu hedef almaktadır. PPRV N proteinin C-terminal bölgesinin dizininin değişken olması, PPR virusunu genetik olarak farklı 4 hat (lineages I–IV) altında gruplandırmaya izin vermektedir. Ancak diğer morbilliviruslardan PPR virusunu ayırmak için bu değişken bölgeden primerlerin ve probun dizayn edilmesi bir problem olarak ortaya çıkabilmektedir. PPRV grupları içinde primer/prob bağlanmalarında uyumsuzlukların birikmesi ya da artması (accumulation of mismatches) hatalı teşhis ile sonuçlanabilmektedir. Çalışmada kullanılan oligonükleotid dizinler, testin spesifitesini optimize etmek için N gen bölgesinin 1438-1534. nt.’leri arasındaki yüksek değişken bölgesini kapsamaktadır (Kwiatak ve ark., 2010). Çalışmada kullanılan rRT-PCR tekniğinin minimum tespit limiti 4,5 cDNA kopya/reaksiyon ve CT değeri 34,30 olarak tespit edilmiştir. CT değerleri ile cDNA konsantrasyonları arasındaki ilişki $9.37/4,5 \times 10^8$ - $34,30/4,5 \times 10^0$ değerler arasında lineer olarak belirlenmiştir. Standart sapma değeri $R^2 = 0.987$ olarak hesaplanmış ve böylelikle testin tekrarlanabilir olduğu görülmüştür. Testin efficiency değeri %100 olarak hesaplanmıştır. Kullanılan ısı protokolü ortalama 90 dakika gibi bir sürede sonuç verebildiğinden ve yukarıda bahsedilen sonuçlarla birlikte konvansiyonel RT-PCR metotları ile karşılaştırıldığında hızlı teşhis için uygun olarak kabul edilmiştir. Batten ve ark. (2011) çalışmalarında minimum tespit limitini IV. genetik hatta yer alan PPRV için 10 RNA kopya/reaksiyon ve CT değerini 34.08, Kwiatak ve ark. (2010)

ise 16 RNA kopya/reaksiyon ve CT değerini 35.17 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada, PPRV enfeksiyonu şüphesiyle alınan toplam 574 saha materyali rRT-PCR metodu ile test edilmiş ve tüm örneklerin minimum tespit limiti ve CT değerleri ile viral RNA varlığı kantitatif olarak belirlenmiş olup, %44,4 (255/574) oranında PPRV nükleik asiti tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler Kwiatak ve ark. (2010) ve Batten ve ark. (2011) verileri ile de uyumlu olarak PPRV enfeksiyonunun teşhisinde rRT-PCR'nin tanısai değeri ortaya koymaktadır.

Çalışmada kullanılan konvansiyonel ve rRT-PCR tekniklerinin performanslarını karşılaştırmak amacıyla PPRV RNA'sı içeren standart pozitif kontrol örneğin 10 katlı dilüsyonları hazırlanmış ve RT-PCR testleri yapılmıştır. rRT-PCR tekniğinin minimum tespit limiti 10^{-6} dilüsyon olarak tespit edilirken, konvansiyonel N ve F gen RT-PCR tekniklerinin minimum tespit limiti sırasıyla 10^{-6} ve 10^{-4} dilüsyonları olarak belirlenmiştir. Şekil 3.5 incelendiğinde, N gen bölgesini hedef alan konvansiyonel RT-PCR testi ile 10^{-6} dilüsyonda elde edilen PPRV spesifik bandın çok zayıf olduğu ve ancak dikkatli bakıldığında tespit edilebildiği görülmüştür. Bu yüzden N gen konvansiyonel RT-PCR metodu ile elde edilen 10^{-6} dilüsyonuna ait bant değerlendirilmeye alınmamıştır. Bu sonuçlara göre çalışmada kullanılan rRT-PCR tekniğinin sensitivitesinin, konvansiyonel N gen RT-PCR tekniğinden 1 log, F gen RT-PCR tekniğinden ise 2 log daha fazla olduğu görülmüştür. Tez çalışması süresince RT-PCR metotlarının saha örneklerindeki performanslarına bakıldığında, çalışılan 574 örnekten N gen rRT-PCR ile % 44,4; N ve F gen konvansiyonel RT-PCR ile sırasıyla %39,3 ve 35,5 oranında pozitiflik elde edildiği ve sonuçların kendi içinde uyumlu olduğu görülmüştür.

Bao ve ark. (2008), N gen bölgesini hedef alan rRT-PCR ve konvansiyonel RT-PCR tekniklerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, rRT-PCR'ın minimum tespit limitini 10^{-5} ile konvansiyonel RT-PCR'dan 1 log daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Kwiatak ve ark. (2010), PPR virusun 4 farklı genetik hattını temsil eden virusların 10 katlı dilüsyonları ile rRT-PCR ve konvansiyonel RT-PCR metotlarını karşılaştırdıkları çalışmalarında, rRT-PCR metodunun konvansiyonel

RT-PCR metodundan 1-3 log daha duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada kullanılan N gen bölgesini hedef alan rRT-PCR tekniği ile elde edilen sonuçların, diğer araştırmacıların elde ettikleri sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmüştür. Buna göre N gen bölgesini hedef alan rRT-PCR'ın saha örneklerinde PPRV enfeksiyonunun teşhisinde ve kantitasyonunda, konvansiyonel tekniklere göre daha duyarlı, spesifik ve hızlı bir teknik olduğu sonucuna varılmıştır.

PPRV enfeksiyonunun hızlı ve spesifik tespiti için 1995'ten beri çeşitli RT-PCR metodları geliştirilmiş olmasına rağmen, enfeksiyonun doğrulanmasında dizin analizi gold standart olarak kalmaya devam etmiştir (Zhao ve ark., 2009). Dizin analizleri virusun hareketinin takibi açısından kullanışlı bir tekniktir. PPR virusun serotipleri yoktur, ancak dizinlerin filogenetik analiz ile birbirinden net bir şekilde ayrılmış hatları mevcuttur. Filogenetik analize dayalı bilgiler yeni çıkan salgınların etkeni olan virusun kaynağını göstermesi açısından çok önemlidir. Örneğin 2008 yılında Fas'ta çıkan salgının etkeni, filogenetik analizler sonucu Kuzey Afrika'da görülen ve IV. genetik hata ait PPRV olduğu anlaşılmıştır. Zira Batı Afrika'da sirküle olan virusların I. ve II. genetik hatta ait oldukları bilinmektedir. Bununla birlikte bahsedilen virusun Orta Doğu ve Sudan'dan gelmiş olma ihtimali de bulunmaktadır. Bu bölgelerde sirküle olan viruslar da yine IV. genetik hatta aittirler (Baron ve ark., 2011).

Bu bilgilerden hareketle bu çalışmada ayrıca, elde edilen virusların her iki gen bölgesi yönünden moleküler karakterizasyonları gerçekleştirilmiş ve Türkiye'de sirküle olan virusların genetik yakınlıkları epidemiyolojik anlamda irdelenmiştir.

Bu amaçla, PPRV yönünden pozitif olarak tespit edilen ve illeri temsil eden virusların dizinleri ile gen bankasında mevcut olan diğer PPRV dizinleri arasındaki genetik benzerlik ve farklılığı ortaya koymak için F ve N gen düzeyinde nükleotid ve aminoasit karşılaştırmaları yapılmıştır. Çalışmada elde edilen 53 adet F gen kısmi dizinlerinin, Turkey1996 dizini ile 6032. nt'de G→A ve 6041. nt'de A→G şeklinde

iki, Turkey2000 dizini ile 5849.nt'de C→T, 5999.nt'de G→A ve 6083.nt'de C→T şeklinde üç nükleotid değişiminin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Turkey1996 dizini, Turkey2000 dizini ile karşılaştırıldığında, 5849.nt'de C→T, 5999.nt'de G→A, 6032.nt'de G→A, 6041. nt'de A→G ve 6083.nt'de C→T olmak üzere beş nükleotid değişikliğinin olduğu tespit edilmiştir. Buna göre Turkey1996 dizininde, Turkey2000 dizinine göre varolan 5 nükleotid değişiminden sadece ikisinin, bu çalışmada elde edilen dizinlere aktarılmış olduğu görülmüştür. Bu nükleotid değişimlerine ilişkin olarak, F gen kısmi dizinlerinin kendi aralarındaki benzerlik oranları %98,2-100, Turkey1996 ile %98,2-99,3 ve Turkey2000 ile % 97,9-98,9 olarak tespit edilmiştir.

F gen kısmi dizinleri gerek kendi aralarında, gerekse Turkey1996 ve Turkey2000 dizinleri ile aminoasit bazında karşılaştırıldığında, herhangi bir aminoasit değişiminin olmadığı belirlenmiştir. Bu bağlamda F gen kısmi dizinlerinin kendi aralarındaki aminoasit benzerlik oranları %97,8-100, Turkey1996 ve Turkey2000 dizini ile %98,9-100 olarak tespit edilmiştir.

Kul ve ark. (2007) tarafından Kırıkkale ilinde, 15 farklı sürüden, 15 koyun ve 6 keçi örneğinin kullanıldığı bir çalışmada PPR'ın patolojik ve virolojik bulguları tanımlanmıştır. Bahsedilen çalışmada RT-PCR sonucu elde edilen F genine ait 488 bp'lik genom fragmentinin nükleotid dizilimleri, 2004 yılında tam dizin analizi yapılan Turkey2000 dizini ile yüksek genetik benzerlik göstermiştir. Bununla birlikte elde edilen dizinlerde Turkey2000 dizinine göre 5999 (G→C) ve 6083 (C→T) pozisyonlarında sabit 2 mutasyon tespit edilmiştir. F geninin antijenik kararlılığını gösteren aminoasit dizinlerinde ise değişiklik gözlenmemiştir. Kul ve ark. (2007)'nin sonuçları ile bu çalışmada elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, bahsedilen 2 pozisyonundaki nükleotid değişimlerine ek olarak bir (5849.nt'de C→T) nükleotid değişimin daha olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca araştırmacıların 5999. nt'de G→C şeklinde tespit ettikleri değişim, bu çalışmada G→A şeklinde meydana gelmiştir. Aminoasit düzeyinde bakıldığında ise, her iki çalışmada da herhangi bir değişim tespit edilmeyerek tam bir uyumun olduğu belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında 1996 yılında dizin analizi ile nükleotid dizilimleri ortaya konulan virusun ilgili gen

bölgesindeki evrimsel sürecin devam ettiği hem 2004 ve 2007 yılındaki çalışmalar ile hem de bu çalışma ile daha net ortaya konulmuştur.

F gen kısmi dizinlerinin Nigeria/75/1 aşısı suşu ile nükleotid bazında yapılan karşılaştırmalarında, 28 adet nükleotid değişimi tespit edilmiştir. Nükleotidlerdeki değişimlere ilişkin olarak çalışmada elde edilen dizinlerin kendi aralarında %98,3-100, Nigeria/75/1 aşısı suşu ile %91,3-92,4 oranında benzer oldukları görülmüştür. Sözü edilen dizinlerin aminoasit düzeyinde yapılan karşılaştırmalarında, 5854. (T→C)/5855. (C→T) ve 6120. (A→G)/6122. (T→C) nükleotidlerde meydana gelen değişimlerin sırasıyla V→A ve S→G şeklinde iki aminoasit değişimine neden olduğu tespit edilmiştir. F gen kısmi dizinleri kendi aralarında ve Nigeria/75/1 dizini ile aminoasit düzeyinde karşılaştırıldığında, sırasıyla %98,3-100 ve %97,5-98,3 oranında bir benzerliğin olduğu gözlenmiştir. Ayrıca tüm dizinlerde PPRV F gen cleavage site bölgesinin korunmuş olduğu tespit edilmiştir. PPRV F gen cleavage site bölgesi aminoasit dizini (G-R-R-T-R-R) bölgenin korunmuşluğunu ifade etmektedir (Bailey ve ark., 2005). F gen cleavage site bölgesinin iyi korunmuş olması, şüpheli PPR salgınlarında PPR virusun erken ayırıcı teşhisinin F gen primerleri kullanılarak yapılmasına imkan tanıyabildiği gibi, aşılama ve kontrol programlarının iyileştirilmesine de katkıda bulunabilmektedir (Esmailizad ve ark., 2011).

F gen kısmi dizinler ve hatları temsil eden referans dizinler ile birlikte filogenetik ağaç oluşturulduğunda, Türkiye’de sirküle olan PPR viruslarının IV. genetik hat içinde yer aldığı görülmüştür. Komşu ülkelerde sirküle olan ve değişik yollarla ülkemize giren ya da girmesi muhtemel PPR virusları ile çalışmada elde edilen F gen kısmi dizinleri arasındaki uzaklıkların daha net görülmesi amacıyla Şekil 3.11’de gösterilen ikinci bir filogram daha çizilmiştir. Şekil 3.11’deki filogram incelendiğinde, ülkemizde sirküle olan virusların F gen kısmi dizinlerine göre temelde 3 alt grupta toplandığı tespit edilmiştir. Alt grup II’de Egypt09 (FR667557), alt grup III’de Turkey2000 (AJ849636) dizinlerinin yer aldığı tespit edilmiştir. Alt grup II incelendiğinde, ağırlıklı olarak Güneydoğu illerinden elde edilen dizinler ve Egypt09 (FR667557) dizininden oluştuğu görülmüştür. Bununla birlikte alt gruplar

kendi içlerinde de incelendiğinde, Türkiye'nin değişik bölgelerinden elde edilen dizinlerin varlığı dikkat çekmektedir. Alt grupların bu karışık yapısının ülke içindeki hayvan hareketlerini resmetmesi açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Egypt09 (FR667557) dizininin aksine, alt gruplar içine girmemesine rağmen Irak suşlarının diğer komşu ülke dizinlerine göre ülkemizde sirküle olan virüslara daha yakın olduğu tespit edilmiştir. Egypt09 (FR667557) Iraq2009 (AY948429), Iraq2000 (FN995439) ve Iraq2002 (FN995440) dizinlerinin filogramdaki yerleşimleri birlikte değerlendirildiğinde, ülkemizin güney ve güneydoğu sınırındaki kontrolsüz hayvan hareketlerini ortaya koyması açısından bu yakınlık önemli olarak değerlendirilmiştir.

Network analizi, virüsler arasındaki evrimsel süreci incelemek amacıyla kullanılan bir yöntem olup, genetik yakınlıkları fazla olan dizinleri "haplogrup" adı altında sınıflandırmaktadır. Bu analiz yöntemiyle hem bireysel hem de grup bazında farklılık arzeden nükleotidler adet ve lokasyon olarak gösterilebilmektedir (Munir ve ark., 2012). Çalışmada elde edilen F gen kısmi dizinlerinin evrimsel sürecini incelemek amacıyla yapılan network analizinde, tüm dizinlerin sarı renkle ifade edilen IV. genetik hat içerisinde olduğu görülmüştür. Filogenetik analizde ağırlıklı olarak alt grup III içinde yer alan dizinler haplogrup 3 (H3), alt grup II içinde yer alan dizinler haplogrup 2 (H2) ve alt grup I içinde yer alan dizinler ise haplogrup 1 (H1) içinde yer almıştır. H2 ile H3 arasında iki adet (69 ve 282); H3 ile H1 arasında da bir adet nükleotid (138) farklılığı gözlenmiştir. Çalışmada elde edilen dizinlerin büyük bir kısmını içeren H3 ile Iraq2009 (AY948429) arasında bir adet (280), Iraq2000 (FN995439) arasında iki adet (240, 78), Iraq2002 (FN995440) arasında beş adet (240, 19, 22, 23, 24), Turkey2000 (AJ849636) arasında üç adet (51, 201, 285) ve Iran2010 (FN995204) arasında dört adet nükleotid (234, 45, 27, 182) farklılığı tespit edilmiştir. Filogenetik analizde olduğu gibi network analizinde de Iran2010 (FN995204) dizininin aşısı suşu Nigeria75/1'e 18 adet nükleotid farklılığı ile en yakın dizin olduğu gözlenmiştir. Coğrafik olarak bakıldığında Şekil 3.11'deki filogram ile uyumlu bir şekilde network analizinde de Irak dizinlerinin Türkiye'de sirküle olan virüslara çok yakın olduğu görülmüştür. Özellikle güneydoğu illerinden elde edilen dizinlerin Egypt09 (FR667557) dizini ile aynı haplogrup içinde yer alması, bölgedeki hayvan hareketlerini resmetmesi açısından değerli bulunmuştur. Network analizine

coğrafi olarak bakıldığında doğudan batıya bir evrimsel sürecin varlığı dikkat çekmektedir.

Çalışmada elde edilen 60 adet virusun N gen kısmi dizinleri, Turkey2000 dizini ile nükleotid düzeyinde karşılaştırıldığında 1415. (G→T), 1460. (G→A) ve 1473. (T→C) nükleotidlerde değişiklik olduğu tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak aminoasit değişimine neden olmasına rağmen, tüm dizinlerde gözlenmeyen 1452. (A→C), 1482. (C→T), 1529. (G→A), 1583. (C→T) ve 1615. (A→G) nükleotidlerde değişimler gözlenmiştir. N gen kısmi dizinlerinde meydana gelen bu nükleotid değişimlerine ilişkin olarak, dizinlerin kendi aralarında %97,2-100, Turkey2000 dizini ile %97,5-98,9 oranında benzer oldukları görülmüştür. N gen kısmi dizinleri kendi aralarında ve Turkey2000 dizini ile aminoasit düzeyinde karşılaştırıldığında sırasıyla %94,2-100, % 94,2-98,3 oranında benzer bulunmuştur.

Nigeria/75/1 aşısı ile N gen kısmi dizinleri arasında nükleotid bazında yapılan karşılaştırmalarda 35 adet nükleotid değişimi tespit edilmiştir. N gen kısmi dizinlerinde meydana gelen bu nükleotid değişimlerine ilişkin olarak, çalışmada elde edilen dizinler kendi aralarında %97,5-100, Nigeria/75/1 aşısı ile %89,3-90,9 oranında benzer bulunmuştur. Nigeria/75/1 aşısı ile N gen kısmi dizinleri aminoasit düzeyinde karşılaştırıldığında, 19 adet aminoasit değişimi olduğu tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak dizinlerin kendi aralarında ve Nigeria/75/1 dizini ile aminoasit düzeyinde sırasıyla %95-100 ve %83,6-86 oranında benzer oldukları saptanmıştır.

N gen kısmi dizinleri baz alınarak yapılan filogenetik analizde, Türkiye’de sirküle olan PPR viruslarının IV. genetik hat içinde yer aldığı görülmüştür. Komşu ülkelerde sirküle olan PPR virusları ile çalışmada elde edilen N gen kısmi dizinleri arasındaki uzaklıkların daha net görülmesi amacıyla oluşturulan filogram incelendiğinde, ülkemizde tespit edilen virusların temelde 3 alt grupta toplandığı gözlenmiştir. Alt gruplar kendi içinde incelendiklerinde, genel olarak tüm grupların

Türkiye'nin değişik illerinden elde edilen virusları içerdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle, bir alt grubun belirli bir bölgeyi temsil etmediği görülmüştür. Ancak aynı illerden elde edilen virusların filogramda birbirleri ile yakın oldukları gözlenmiştir. Türkiye'nin yakın komşu ülkeleri olan İran ve Irak'tan elde edilen dizinlerin, Türkiye dizinleri ile daha yakın ilişkili oldukları tespit edilmiştir. Aynı illerden elde edilen dizinlerin birbirlerine olan yakınlıkları dikkate alınarak filogram incelendiğinde, Türkiye dizinlerine yakın olan komşu ülkelere elde edilen dizinler dikkat çekmektedir. Komşu ülke dizinleri ile ilgili tespit edilen bu yakınlık bir kez daha kontrolsüz hayvan hareketlerini akla getirmektedir.

N gen kısmi dizinlerinin evrimsel sürecini incelemek amacıyla yapılan network analizinde, çalışmada elde edilen tüm dizinlerin sarı renkle ifade edilen IV. genetik hat içinde yer aldığı görülmüştür. Filogenetik analizle uyumlu bir şekilde ağırlıklı olarak alt grup I içinde yer alan dizinlerin haplogrup 1 (H1), alt grup II içinde yer alan dizinlerin haplogrup 2 (H2) ve alt grup III içinde yer alan dizinlerin haplogrup 3 (H3) içinde yer aldığı tespit edilmiştir. H2 ile H3 arasında iki adet (97 ve 175); H2 ile H1 arasında da bir adet nükleotid (229) farklılığı gözlenmiştir. Iraq-2011 (JF969755), IR-URM332/11 (JX898860) ve IR-URM333/11 (JX898861) dizinleri diğer ülke dizinlerine göre Türkiye dizinlerine en yakın dizin olarak tespit edilmiştir. Söz konusu bu üç dizinden özellikle IR-URM332/11 ve IR-URM333/11 dizinleri 2011 yılında İran'ın Batı Azerbaycan Eyaletinin Urumiye şehrinden elde edilmiştir. Coğrafi olarak Urumiye, Ağrı ili ile sınır komşusudur. Network analizde Türkiye'nin değişik illerinden dizinlerin bulunduğu H1 içinde yer alan Urumiye dizinleri ile Ağrı ilinden elde edilen dizin arasında bir nükleotid (54) ve yine birçok ilden dizinleri kapsayan H2 arasında da bir nükleotidlik (229) değişim olduğu tespit edilmiştir. Iraq-2011 (JF969755) dizini ile ilgili olarak network analiz incelendiğinde, güneydoğu illerinden elde edilen dizinler ile arasında 1-3 arasında değişen nükleotid farklılıklarıyla yine yakın bir ilişkinin olduğu tespit edilmiştir.

Gerek İran ve gerekse Irak dizinlerinin, çalışmada elde edilen dizinler ile olan genetik ilişkilerinden viral bir geçişin olduğunu söylemek mümkündür. Özellikle F

gen network analizinden bu geçişin doğudan batıya doğru olduğu kanısına varılmıştır.

F gen kısmi dizin analizleri Türkiye’de sirküle olan virusların yüksek oranda homolog (%98-100) olduklarını ve bu gen bölgesinde hızlı genetik değişimlerin olmadığını ortaya koymuştur. Kerur ve ark. (2008)’nın sonuçlarıyla uyumlu bir şekilde çalışmada elde edilen sonuçlar PPRV N gen bölgesinin mutasyonlara F gen bölgesine göre daha açık olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, N gen filogenetik analizlerinin PPR virusun epidemiyolojisini, F gen analizlerine göre daha iyi ortaya koyduğunu bildirilen Shaila ve ark.(1996) nın çalışması ile uyumlu bulunmuştur.

F ve H glikoproteinleri eksternal glikoproteinler olup, PPR virusuna karşı konakta bağışıklığın devamını sağlayan nötralizan antikorların oluşumundan sorumludur. Subunit aşılarda üretimi için her iki glikoprotein umut verici aday konumundadırlar (Esmailizad ve ark., 2011). İmmunojen özelliklerinden dolayı yüzey proteinlerinde meydana gelen mutasyonların aşılama kampanyalarının başarı şansını düşürebileceği ortadadır. Bu sebepten aşı üretiminde yerel suşların kullanılması genel olarak başarı şansını arttıran bir faktördür. Ülkemizde PPRV aşı suşu olarak F gen dizin analizlerine göre I. genetik hatta yer alan Nigeria/75/1 kullanılmaktadır. PPR virusun önemli antijenik determinantlardan biri olan F proteinine ait kısmi gen dizin analizleri, Türkiye’de sirküle olan virusların IV. genetik hatta yer aldığını ancak, aşı suşuna göre önemli derece bir mutasyonun olmadığını göstermiştir. Kısmi gen dizin analizlerinden elde edilen verileri genelleyecek olursak, aşılama kampanyalarındaki olası başarısızlıkların kullanılan aşı suşundan çok, diğer bir antijenik determinant olan H gen bölgesindeki olası mutasyonlar ile kontrolsüz hayvan hareketleri, aşı uygulanması sırasında gerçekleşen bir dizi olumsuzluklar gibi diğer faktörlerden kaynaklanabileceği akla gelmektedir. Bu çalışmada, virusun önemli nötralizan antikor yanıtına neden olan iki bölgeden biri olan F proteinini kodlayan gen bölgesi düzeyinde genetik karakterizasyon yapılmış ancak H proteinini kodlayan gen bölgesi araştırılmamıştır. İlerde

planlanabilecek çalışmalarda, bu bölgenin incelenmesi aşılarda etkinliğinin genetik düzeyde sorgulanmasında yardımcı olabilecektir.

Virusun N proteini viral genomun 3' ucunda yer aldığından replikasyon sırasında en fazla bulunan proteindir. Enfeksiyon sırasında fazla sentezlenmesinden dolayı, N proteini çok immunojen olmasına rağmen, N proteinine karşı gelişen immunitenin hayvanları PPRV enfeksiyonuna karşı koruyamadığı ortaya konmuştur (Munir, 2012). Bu nedenle Nigeria/75/1 aşı suşu ile bu çalışmada tespit edilen viruslar arasında N geni nükleotid düzeyinde saptanan %89,3-90,9 ve aminoasit düzeyinde saptanan %83,6-86 oranlarındaki benzerlikler, Türkiye (lineage 4) ve Nigeria (lineage 1) viruslarının farklı genetik hatta ait olmasına bağlanmıştır.

Salgınların epidemiyolojisini anlamak için PPR viruslarının genetik karakterizasyonunu yapmak önemlidir. Ülkeye değişik kaynaklardan hastalığın girişi, endemik bir virus popülasyonunun olduğu ihtimalini ortaya çıkartmaktadır. Bu olasılığı değerlendirmek ve ülkedeki PPR viruslarının karakterizasyonuna imkan vermek için, düzenli yapılan serolojik taramalara ek olarak dizin analizlerinin de yapılması önerilmektedir.

PPRV enfeksiyonu, koyun ve keçi yetiştiriciliği açısından dünyanın birçok ülkesinde devamlı uluslararası bir korku kaynağı olarak varlığını devam ettirmektedir. Ülkedeki hayvan varlığına ve ekonomisine büyük kayıplar verebilen bir hastalığın eradikasyonu modern çiftlik hayvanı endüstrilerinin gelişimi açısından önemlidir. Ülkemizin Avrupa ve Asya arasında köprü vazifesi görmesi, Asya ülkeleri, Ortadoğu ve Afrika'da görülen yaygın PPR salgınları ve kontrolsüz hayvan hareketleri, hastalığın Türkiye'de görülme ve Avrupa'ya geçiş ihtimalini arttırmaktadır. Bu sebeple, PPRV enfeksiyonunun eradikasyonu ile güvenli gıda temini ve hastalıktan kaynaklanan ticari engellerin kaldırılması ülke ekonomisine katkı sağlayacaktır. Ayrıca, Avrupa Birliği'ne uyum çalışmalarının kısa sürede tamamlanabilmesi için veteriner hizmetleri alanında mücadele ve koruma

hizmetlerinin daha verimli yürütülmesi de gerekmektedir. Bu bakımdan, PPR'nin teşhisi ve etkin bir mücadelenin yapılması oldukça önemlidir.

Ülkemizde, enfeksiyon çıkışının ardından yapılan aşılama uygulamaları, sınır kontrollerinin yapılamaması, aşılamamanın istenilen düzeyde olmaması, aşının depolama ve nakli sırasında oluşabilen problemler ve benzeri nedenlerle başarılı olamamış ve bunlara bağlı olarak PPR salgınları daha da artarak görülmeye devam etmiştir. 2010 yılında başlatılan ve 3 yıllık olarak belirlenen bir Avrupa Birliği projesi dahilinde enfeksiyon çıkışı beklenmeden kuzu ve oğlaklara bir kez olacak şekilde PPR aşısının yapılması ve aşılanan hayvanlara kulak numaraları takılması planlanmıştır. Bu amaç için biri Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığına bağlı, ikisi özel aşı firmasına ait laboratuvarlarda üretilen toplam 30 milyon doz aşı ülke geneline dağıtılmış ve periyodik aşılamalara başlanmıştır.

Dünya genelinde PPRV ve diğer morbilliviruslar ile ilgili devam eden bilimsel araştırmalar, bu virusların kontrolüne yönelik daha etkin ve güvenli mekanizmaların geliştirilmesine önderlik edecektir. Dünyanın birçok bölgesinde ve gelişmekte olan ülkelerde sürdürülebilir tarım için PPR büyük bir ekonomik yük olarak varlığını devam ettirmektedir. Bu açıdan RP'in başarıyla tamamlanan eradikasyon çalışmasında izlenen yol, PPRV enfeksiyonunun kontrol/eradikasyonu için de düşünülmelidir. Yeni aşılarda geliştirilmesi ve DIVA aşılarda gereksinimlerini karşılayan teşhis yöntemleri ile PPRV eradikasyon çalışmaları ekonomik hale getirilebilir. Uygun araçların kullanımıyla ve RPV eradikasyon programındakine benzer bir yol izlenerek, PPR'nin dünya genelinde eradikasyonuna yönelik denemeler gerçekçi bir amaç haline gelebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile,

Türkiye’de PPRV enfeksiyonunun varlığı/yaygınlığı bir kez daha ortaya konmuştur. Ülkemizde farklı bölgelerde yer alan illerde enfeksiyonun tespit edilmiş olması enfeksiyonun giderek yaygınlaştığını göstermektedir.

Pozitiflik oranları yıllara göre değerlendirildiğinde, 2010-2012 yılları arasında yapılan aşılama rağmen, hastalığın insidansında herhangi bir azalmanın olmadığı görülmektedir.

Örneklenen türler bazında incelendiğinde koyun ve keçilerde pozitiflik değerlerinin birbirlerine yakın olduğu tespit edilmiştir.

Uygun teşhis metotlarının seçimi, enfeksiyonun kontrol/eradikasyonunun ilk basamağını oluşturmaktadır. Son zamanlarda, PPRV enfeksiyonunun hızlı teşhisi için sensitivitesi ve spesifitesi yüksek rRT-PCR metotları geliştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan rRT-PCR metodunun, konvansiyonel RT-PCR metotlarına göre daha hızlı, spesifik ve sensitif olduğu görülmüştür. Bu yüzden klinik örneklerde PPRV nükleik asidinin tespitinde rRT-PCR metodu laboratuvara adapte edilebilir olarak değerlendirilmiştir.

F ve N gen kısmi dizin analizlerine göre ülkede sirküle olan virus, Orta Doğu ve Güney Asya’da sirküle olan virusların da dahil olduğu IV. genetik hat içinde yer almaktadır.

Çalışma sonunda değişik illerden alınan örneklerden elde edilen dizin analizi verileri, Türkiye’deki PPR viruslarının homoloji gösterdiğini ve benzer bir evrimsel yol takip ettiğini göstermektedir.

Ülkemizde aşı suşu olarak kullanılan Nigeria/75/1, F gen dizin analizine göre I. genetik hat içinde yer alırken, Türkiye’de sirküle olan viruslar aynı gen bölgesine göre IV. genetik hat içinde yer almaktadırlar. Ancak aşı suşu ile sirküle olan virusların karşılaştırmalı kısmi dizin analizlerinde, F gen bölgesinde tespit edilen yüksek orandaki benzerlik aşının koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu yüzden aşılama kampanyalarındaki başarısızlıkların tespitinde aşı suşu haricinde, diğer bir antijenik determinant olan H gen bölgesindeki olası mutasyonlar ile diğer faktörlerin (soğuk zincir, aşı kullanım hataları vb.) dikkate alınması gerektiği öne çıkmaktadır. Bu nedenle ileride planlanabilecek çalışmalarda, H gen bölgesinin de incelenmesi aşının etkinliğinin genetik düzeyde sorgulanmasında yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Salgınların epidemiyolojisini anlamak için PPR viruslarının genetik karakterizasyonunu yapmak önemlidir. Ülkeye değişik kaynaklardan hastalığın girişi endemik bir virus popülasyonunun olduğu ihtimalini ortaya çıkartmaktadır. Bu olasılığı değerlendirmek ve ülkedeki PPR viruslarının karakterizasyonuna imkan vermek için, düzenli yapılan serolojik taramalara ek olarak antijenik yönden dizin analizlerinin de yapılması önerilmektedir.

Doğu ve Güneydoğu Anadolu’nun coğrafik yapısının kontrolsüz hayvan hareketlerine izin vermesinden dolayı, ülke içerisine salgın hastalıkların yayılımının engellenmesi çok güçtür. Bu yüzden, ekonomik açıdan önemli diğer hastalıklarla birlikte PPR virusun ülkeye girişini ve yayılışını engellemeye yönelik tedbirler alınmalıdır.

Dünyanın bir çok bölgesinde ve gelişmekte olan ülkelerde sürdürülebilir tarım için PPR büyük bir ekonomik yük olarak varlığını devam ettirmektedir. Bu açıdan RP'in başarıyla tamamlanan eradikasyon çalışmasında benimsenen yol, PPRV enfeksiyonunun kontrol/eradikasyonu için de düşünülmelidir.

Yeni aşılarda geliştirilmesi ve DIVA aşılarda gereksinimlerini karşılayan teşhis yöntemleri ile PPRV eradikasyon çalışmalarının ekonomik hale getirilebileceği düşünülmektedir.

ÖZET

Peste des Petits Ruminants Virus (PPRV) Enfeksiyonunun Epidemiyolojisinin N ve F Genlerine Dayalı Farklı PCR Teknikleri ile Araştırılması

Bu çalışmada, Türkiye'nin değişik bölgelerinde yetiştirilen 6 ay yaşın üzerindeki koyun ve keçilerden PPRV enfeksiyonu şüphesi ile alınan kan, nasal swap örnekleri ile Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Viral Teşhis Laboratuvarına gelen doku örnekleri (lenf yumrusu, akciğer, rektum, ince barsak ve dalak) virolojik kontrol amacıyla RT-PCR testlerine tabi tutulmuştur. Virolojik kontrol amacıyla alınan toplam 574 örnekten viral nükleik asit tespiti F ve N gen bölgelerini hedef alan konvansiyonel RT-PCR ve N gen bölgesini hedef alan Real-Time RT-PCR ile yapılmıştır. Konvansiyonel F gen RT-PCR ile %35,5 (204/574), konvansiyonel N gen RT-PCR ile %39,3 (226/574) ve Real Time N gen RT-PCR ile %44,4 (255/574) oranında pozitiflik elde edilmiştir. Üç metod birlikte değerlendirildiğinde ise PPRV enfeksiyonunda pozitiflik oranı %45.8 olarak tespit edildi.

Konvansiyonel RT-PCR testleri sonunda elde edilen pozitif örneklerden illeri temsil edecek şekilde seçilen örneklerden 53 adet F gen ve 60 adet N gen kısmi dizin analizleri yapılmış ve gen bankası ulaşım numaraları JQ388615-JQ388664, JQ519907-JQ519965, JX117877-JX117880 olarak 3 grup altında alınmıştır. Yapılan filogenetik analiz sonrasında, her iki gen bölgesine göre ülkede sirküle olan PPR viruslarının IV. genetik hatta yer aldığı görülmüştür. F gen kısmi dizin analizleri sonunda elde edilen dizinlerin nükleotid düzeyinde kendi aralarında, Turkey2000 ve Nigeria/75/1 dizini ile sırasıyla %98,2-100, %97,9-98,9 ve %91,3-92,4 değişen oranlarda benzer oldukları tespit edilmiştir. N gen kısmi dizin analizleri sonunda ise dizinlerin nükleotid düzeyinde kendi aralarında, Turkey2000 ve Nigeria/75/1 dizini ile sırasıyla %94,2-100, %94,2-98,3 ve %89,3-90,9 değişen oranlarda benzer oldukları tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar ışığında PPRV enfeksiyonunun ülkede endemik olduğu bir kez daha ortaya konmuş; enfeksiyonun teşhisinde rRT-PCR tekniğinin, kullanılan konvansiyonel tekniklere göre etkinliği gösterilmiş, hayvan hareketlerinin sınırlandırılmasının zorluğuna dikkat çekilerek enfeksiyondan korunmada en etkili yolun duyarlı populasyonların aşılması olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Türkiye, Keçi, Koyun, PPRV, Real-Time RT-PCR, Network analiz, Dizin analizi

SUMMARY

Investigation of Peste des Petits Ruminants Virus (PPRV) Infection Epidemiology Using N and F Genes Targeted Different PCR Methods

In this study, blood and swab samples taken from PPRV infection suspicious sheep and goat older than 6 months housed different regions in Turkey and tissue samples (lymph node, lung, rectum, small intestine, spleen) submitted to Pendik Veterinary Control Institute were tested with RT-PCR for virological control. Viral nucleic acid was detected with RT-PCR targeted F and N gene regions and with Real time RT-PCR targeted N region from 574 samples. Positivity ratios were 35,5% (204/574) with F gene targeted RT-PCR, 39,3% (226/574) with N gene targeted RT-PCR and 44,4% (255/574) with N gene targeted Real time RT-PCR accordingly. When the three methods considered together the positivity rate of samples were found as 45,8% (263/574).

From the positive samples detected with conventional RT-PCR, 53 samples of F gene and 60 samples of N gene were selected to represent the provinces and partially sequenced and classified under 3 groups with gene bank accession numbers JQ388615-JQ388664, JQ519907-JQ519965, JX117877-JX117880. After phylogenetic analysis, the circulating PPR virus was located in lineage IV according to the two gene regions. F gene partial sequence analysis at nucleotide level showed ratios of 98,2-100%, 97,9-98,9%, 91,3-92,4% resemblance among themselves, Turkey2000 and Nigeria/75/1 sequences respectively. N gene partial sequence analysis at nucleotide level showed resemblance ratios of 94,2-100%, 94,2-98,3%, 89,3-90,9% among themselves, Turkey2000 and Nigeria/75/1 respectively.

With these results we conclude that; PPRV infection is endemic in our country, method of rRT-PCR is more effective than conventional PCR and considering animal

transportation restriction difficulties the most convenient method of protection is vaccination of the sensitive population.

Keywords: Turkey, Goat, Sheep, PPRV, Real-Time RT-PCR, Network analysis, Sequence analysis

KAYNAKLAR

- ABDOLLAHPOUR, G., ROOFI, A., NAJAFI, J., SASANI, F., SAKHAIE, E. (2006). Clinical and paraclinical findings of a recent outbreak of Peste des petits ruminants in Iran. *J. Vet. Med.* **B53**:14-16.
- ABU ELZEIN, E. M. E., HOUSAWI, F. M. T., BASHAREEK, Y., GAMEEL, A. A., AL-AFALEQ, A. I., ANDERSON, E. C. (2004). Severe PPR infection in Gazelles kept under semi-free range conditions in Saudi Arabia. *J. Vet. Microbiol.* **B51(2)**: 68-71.
- ABUBAKAR, M., ASHIQ, S., ZAHOR, A. B., ARSHED, M. J., BANYARD, A. C. (2011). Diagnosis and control strategies for peste des petits ruminants virus: Global and Pakistan perspectives. *Pak Vet J*, **31(4)**: 267-274.
- AKTAŞ, M. S., OZKANLAR, Y., ŞİMŞEK, N., TEMUR, A. VE KALKAN, Y. (2011) Peste Des Petits Ruminants In Suckling Lambs Case Report, *Israel Journal Of Veterinary Medicine*, **66** (1).
- ALBAYRAK, H. (2007). Karadeniz bölgesinde koyunlarda Peste des Petits Ruminants (PPR) enfeksiyonunun Epidemiyolojisi. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
- ALÇIĞIR, G., VURAL, S. A., TOPLU, N. (1996). Türkiye’ de kuzularda Peste des petits ruminants virus enfeksiyonunun patomorfolojik ve immunohistolojik ilk tanımı. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Der.* **43**:181-189.
- AL-MOSLIH, M. (2012). Serodiagnosis of Peste des Petits Ruminants Virus, Serological Diagnosis of Certain Human, Animal and Plant Diseases, Publisher: InTech, Published: March 21, 2012 under CC BY 3.0 license, in subject Infectious Diseases, DOI: 10.5772/2140
- AWA, D. N., NGAGNOU, A., TEFANG, E., YAYA, D., NJOYA, A. (2002). Post vaccination and colostral peste des petits ruminants antibody dynamics in research flocks of Kirdi goats and Foulbe sheep of North Cameroon. *Prev. Vet. Med.* **55**: 265-271.
- BAILEY, D., BANYARD, A., DASH, P., OZKUL, A., BARRETT, T. (2005). Full genome sequence of peste des petits ruminants virus, a member of the Morbillivirus genus. *Virus Research.* **110**: 119-124
- BALAMURUGAN, V., SEN, A., VENKATESAN, G., YADAV, V., BHANOT, V., BHANUPRAKASH, V., SINGH, R. K. (2010). Application of Semi-quantitative M Gene-Based Hydrolysis Probe (TaqMan) Real-Time RT-PCR

Assay for the Detection of Peste des petits ruminants Virus in the Clinical Samples for Investigation into Clinical Prevalence of Disease. *Transboundary and Emerging Diseases*. **57**: 383–395.

BALAMURUGAN, V., SEN, A., VENKATESAN, G., BHANOT, V., YADAV, V., BHANUPRAKASH, V., SINGH, R. K., (2012). Peste des petits ruminants virus detected in tissues from an Asiatic lion (*Panthera leo persica*) belongs to Asian lineage IV, *Vet. Sci.* **13**(2): 203-206.

BALAMURUGAN, V., SEN, A., SARAVANAN, P., SINGH, R. P., SINGH, R. K., RASOOL, T. J., BANDYOPADHYAY, S. K. (2006). One-step multiplex RT-PCR assay for the detection of peste des petits ruminants virus in clinical samples. *Vet. Res. Commun.* **30**(6): 655–666.

BANDELT, H. J., FORSTER, P., RÖHL, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **6**: 37– 48.

BANYARD, A. C., PARIDA, S., BATTEN, C., OURA, C., KWIATEK, O., LIBEAU, G. (2010). Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control. *Journal of General Virology*, **91**: 2885-2897.

BANYARD, A. C., GRANT, R. J., ROMERO, C. H., BARRETT, T., (2008). Sequence of the nucleocapsid gene and genome and antigenome promoters for an isolate of porpoise morbillivirus. *Virus Research*, **132**: 213–219.

BAO, J., LI, L., WANG, Z., BARRETT, T., SUO, L., ZHAO, W., LIU, Y., LIU, C., LI, J. (2008). Development of one-step real-time RT-PCR assay for detection and quantitation of Peste des Petits Ruminants virus. *J. Virol. Methods*, **148**: 232–236.

BARRETT, T. (1999). Morbillivirus infections, with special emphasis on morbillivirus of carnivores. *Vet. Microbiol.* **69**: 3-13.

BARRETT, T., BANYARD, A.C., DIALLO, A. (2005). Molecular biology of the morbilliviruses. In: *Molecular biology of the morbillivirus*. Barrett, T, Pastoret, PP, Taylor, WP (Eds), Academic Press, Elsevier, Amsterdam, pp: 31-67.

BARRETT, T., BANYARD, A. C., DIALLO, A. (2006). Molecular biology of the morbilliviruses. In *Rinderpest and peste des petits ruminants virus*, pp. 31–56. Edited by T. Barrett, P. P. Pastoret & W. P. Taylor. London: Academic Press, Elsevier

BARON, M. D., PARIDA, S., OURA, C. A. L. (2011). Peste des petits ruminants: a suitable candidate for eradication? *Veterinary Record*, **169**: 16-21.

- BATTEN, C. A., BANYARD, A. C., KING, D. P., HENSTOCK, M. R., EDWARDS, L., SANDERS, A., BUCZKOWSKI, H., OURA, C. L., BARRETT, T. (2011). A real time RT-PCR assay for the specific detection of Peste des petits ruminants virus, *Journal of Virological Methods*, **171**: 401–404.
- BERHE G, MINET, C., LE GOFF, C., BARRETT, T., NGANGNOU, A., GRILLET, C., LIBEAU, G., FLEMING, M., BLACK, D. N., DIALLO, A. (2003). Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste-des-petits-ruminants virus and capripoxvirus infections. *J. Virol.* **77**: 1571-1577.
- BLIXENKRONE-MOLLER, M., BOLT, G., JENSEN, T. D., HARDER, T., SVANSSON, V. (1996). Comparative analysis of the attachment protein gene (H) of dolphin morbillivirus. *Virus Res.* **40(1)**: 47–55.
- BROWN, C. C., MARINER, J. A., OLENDER, H. S. (1991). An immunohistochemical study of the pneumonia caused by peste des petis ruminants virus. *Vet. Pathol.* **28**: 166-170.
- CATTANEO, R., REBMANN, G., BACZKO, K., TER MEULEN, V., BILLETER, M. A. (1987). Altered ratios of measles virüs transcripts in diseased human brains. *Virology*, **160**: 523–526.
- CHARD, L. S., BAILEY, D. S., DASH, P., , BANYARD, A. C., BARRETT T. (2008). Full genome sequences of two virulent strains of peste-des-petits ruminants virus, the Cote d’Ivoire 1989 and Nigeria 1976 strains, *Virus Research*, **136**: 192–197.
- CHATTOPADHYAY, A., RAHA, T., SHAILA, M. S. (2004). Effect of single amino acid mutations in the conserved GDNQ motif of L protein of Rinderpest virüs on RNA synthesis invitro and invivo. *VirusRes.* **99(2)**: 139–145.
- CHAUHAN, H. C., CHANDEL, B. S., KHER, H. N., DADAWALA, A. I., AGRAWAL, S. M. (2009). Pesti des petits ruminants virus infection in animals, *Veterinary World*, **2(4)**: 150-155.
- CHEN, W., HU, S., QU, L., HU, Q., ZHANG, Q., ZHI, H., HUANG, K., BU, Z. (2010). A goat poxvirus-vectored peste-des-petits-ruminants vaccine induces long-lasting neutralization antibody to high levels in goats and sheep. *Vaccine*, **28**: 4642-4750.
- CHOUNDRY, P., JHALA, M. K., KANANI, A. N. (2009). Incidence of PPR Virus in Gujarat by s-ELISA and Molecular Detection by F, N and H Gene Based RT-PCR, *RVJI*, **5(1-2)**:1-4.

- COEN, M. D., RAMIG F. R. (2000). Fundamental Virology, Chapter 23 *Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication*. pp.:689-717.
- COUACY-HYMAN, E., ROGER, F., HURARD, C., GUILLOU, J. P., LIBEAU, G., DIALLO, A. (2002). Rapid and sensitive detection of the peste des petits ruminants virus by a polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods*. **100**: 17-25.
- DE ALMEIDA, R. S., KEITA, D., LIBEAU, G., ALBINA, E. (2007). Control of ruminant morbillivirus replication by small interfering RNA. *J Gen Virol*, **88**: 2307-2311.
- DHAR, P., SREENIVASA, B. P., BARRETT, T., CORTEYN, M., SINGH, R. P., BANDYOPADHYAY, S. K. (2002). Recent epidemiology of peste des petits ruminants virus (PPRV). *Vet. Microbiol*. **88(2)**: 153-159.
- DIALLO, A. (1988). Rinderpest and peste des petits ruminants; constant threats to animal farming in many developing countries. *Impact Sci. Society*. **150**: 179-192.
- DIALLO, A., BARRETT, T., BARBRON, M., SUBBARAO, S. M., TAYLOR, W. P. (1989). Differentiation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses using specific cDNA clones. *J Virol Methods*, **23**: 127-136.
- DIALLO, A. (1990). Morbillivirus group: genome organisation and proteins. *Vet. Microbiol*. **23**: 1585-163.
- DIALLO, A., BARRETT, T., BARBRON, M., MEYER, G., LEFEVRE, P. C. (1994). Cloning of the nucleocapsid protein gene of peste-des-petits-ruminants virus-relationship to other morbilliviruses. *J. Gen. Virol*. **75**: 233-237.
- DIALLO, A., LIBEAU, G., COUACY-HYMAN, E., BARBRON, M. (1995). Recent developments in the diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants. *Vet. Microbiol*. **44**: 307-317.
- DIALLO, A. (2003). Control of peste des petits ruminants virus: Classical and New Generation Vaccines. *Dev. Biol. (Basel)*, **114**: 113-119.
- DIALLO, A. (2004). Vaccination for the control of peste des petits ruminants. *Dev Biol (Basel)*, **119**: 93-98.
- DIALLO, A. (2006). Control of Peste des Petits Ruminants and Poverty Alleviation. *J Vet Med*. **B53**: 11-13.

- DIALLO, A., MINET, C., LE GOFF, C., BERHE, G., ALBINA, E., LIBEAU, G., BARRETT, T. (2007). The threat of peste des petits ruminants: progress in vaccine development for disease control. *Vaccine*, **25**: 5591-5597.
- DIOP, M., SARR, J., LIBEAU, G. (2005). Evaluation of novel diagnostic tools for peste des petits ruminants virus in naturally infected goat herds. *Epidemiol. Infect.* **133**: 711-717.
- DURAJOIYE, V. A., LEFEVRE, P. C. (1996). Peste des petits ruminants. In: OIE Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines. Third Edd. Chapter 2.1.5.p.: 77-84.
- ESMAELIZAD, M., JELOKHANI-NIARAKI, S., KARGAR-MOAKHAR, R. (2011). Phylogenetic analysis of peste des petits ruminants virus (PPRV) isolated in Iran based on partial sequence data from the fusion (F) protein gene, *Turk J. Biol.* **35**: 45-50.
- EZEIBE M. C., OKOROAFOR O. N., NGENE A. A., EZE J. I., EZE I. C., UGONABO J. A. (2008). Persistent detection of peste de petits ruminants antigen in the faeces of recovered goats. *Trop Anim Health Prod.* **40(7)**: 517-519.
- FAO, (2009). EMPRES Transboundary Animal Diseases Bulletin. No: 33.
- FAO, (1999). Recognizing Peste des Petits Ruminants, A Field Manual. [Erişim: <http://www.fao.org/docrep/003/x1703e/x1703e00.htm>]. Erişim Tarihi: 20/09/2012
- FARAJİ MAJARASHİN, A. R. (2013) İran’da koyun ve keçilerde Peste des Petits Ruminants Virus (PPRV) enfeksiyonunun epidemiyolojisi, Ankara Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., et all. (1990) *Field Virology*, Second Edition, Chapter 34 *Paramyxoviridae* and Their Replication, pp.: 945-958.
- FORSYTH, M. A., BARRETT, T. (1995). Evaluation of polymerase chain reaction for the detection on characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus Res.* **39**: 151-163.
- FORSTER, P., TORRONI, A., RENFREW, C., RÖHL, A. (2001). Phylo genetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. *Mol. Biol. Evol.* **18**: 1864–1881.

- GARGADENNEC, L., LALANNE, A. (1942). La peste des petits ruminants. Bulletin des Services Zoo Technique et des Epizootie de l'Afrique Occidentale Française **5**: 16-21.
- GEBREEZIABHER, B. (2006). Development of Dual Vaccines for the Control of Peste des Petits Ruminants and Capripox Infections of Small Ruminants. PhD thesis. Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- GEORGE, A. A. (2002). Comparative evaluation of different gene targets for PCR diagnosis of PPR. M.V.Sc. Thesis, Deemed University IVRI, Izatnagar, India.
- GEORGE A., DHAR P., SREENIVASA B. P., SINGH R. P., BANDYOPAHYAY S. K. (2006). The M and N genes based simplex and multiplex PCRs are better than the F or H gene based simplex PCR for peste des petits ruminants virus. Acta. Virol. **50**: 217-222.
- GHOSH, A., JOSHI, V. D., SHAILA, M. S. (1995). Characterization of an in vitro transcription system from rinderpest virus. Vet. Microbiol. **44**: 165–173.
- GIBBS, E. P. J., TAYLOR, W. P., LAWMAN, M. J. P., BRYANT, J. (1979). Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus morbillivirus. Intervirology. **11**: 268-274.
- GOPILO, A. (2005). Epidemiology of Peste des Petits Ruminants virus in Ethiopia and molecular studies on virulence. PhD thesis. Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- GOVINDARAJAN, R., KOTEESWARAN, A., VENUGOPALAN, A. T., SHYAM, G., SHAGUNA, S., SHAI LA, M. S., FRAMACHANDRAN, S. (1997). Isolation of pestes des petits ruminants virus from an outbreak in Indian buffalo (*Bubalus bubalis*). Vet. Rec. **141**: 573–574.
- GRANT, R. J., BAYAND, A. C., BARRETT, T., SALIKI, J. T., ROMEO, C. H. (2009). Real-time RT-PCR assays for the rapid and differential detection of dolphin and porpoise morbillivirus. J. of Virol. Meth. **156**: 117-123.
- GUR, S., ALBAYRAK, H. (2010). Seroprevalance of Peste des Petits Ruminants (PPR) in Goitered Gazelle (*Gazella subgutturosa subgutturosa*) in Turkey, Journal of Wildlife Diseases, **46(2)**: 673–677.
- GÜRÇAY, M., KIZIL, O., BAYDAR, E. (2013). Peste Des Petits Ruminants (PPR) Virus Infection in Goats in the Eastern Anatolia of Turkey. Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University, **19 (Suppl-A)**: A93-A98.

- GÜL, Y., KIZIL, Ö., İSSİ, M. (2006). Bir kuzuda saptanan subklinik küçük ruminant vebası (peste des petits ruminants, (PPR) olgusu. Fırat Üniversitesi Sağ. Bil. Dergisi, **20(3)**: 245-247.
- GÜLYAZ, V., ÇELEN, N., ÖZKUL, A. (2005). Koyun ve keçi vebası (peste des petits ruminants, ppr virüs izolasyonu, patojenitesi ve vero hücre kültürlerinde attenüasyonu çalışmaları. Pendik Vet. Mik. Derg. **36(1-2)**.
- HALL, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. **41**: 95-98.
- HAMDY, F. M., DARDIRI, A. H., NDUAKA, O., BREESE, S. R. JR., IHEMELANDU, E. C. (1976). Etiology of the stomatitis pneumcenteritis complex in Nigerian dwarf goats. Can. J. Comp. Med. **40**: 276-284
- HOFFMANN, B., KORTHASE, C., ESCHBAUMER, M., BEER, M. (2012). Fatalities in wild goats in kurdistan associated with peste des petits ruminants virus. Transbound Emerg Dis **59 (2)**, 173-176
- HUMMEL, K. B., LOWE, L., BELLINI, W. J., ROTA, P. A., (2006). Development of quantitative gene-specific real-time RT-PCR assays for the detection of measles virüs in clinical specimens. J. Virol. Methods **132 (1-2)**:166–173.
- HUSSAIN M., IRSHAD, H., KHAN, M. Q. (2008). Laboratory Diagnosis of Transboundary Animal Diseases in Pakistan. Trans Emerg Dis, **55**: 190-195.
- KAWAOKA, Y., (ed). (2004). Biology of negative strand RNA virusus: The power of reverse genetics. p: 71-72
- KERUR, N., JHALA, M. K., JOSHI, C. G. (2008). Genetic characterization of Indian peste des petits ruminants virus (PPRV) by sequencing and phylogenetic analysis of fusion protein and nucleoprotein gene segments. Res Vet Sci. **85(1)**: 176-83.
- KWIATEK, O., MINET, C., GRILLET, C., HURARD, C., CARLSSON, E., KARIMOV, B., ALBINA, E., DIALLO, A., LIBEAU, G. (2007). Peste des petits ruminants (PPR) outbreak in Tajikistan. J Comp Path, **136**: 111–119.
- KWIATEK, O., KEITA, D., GIL, P., FERNANDEZ-PINERO, J., JIMENEZ CLAVERO, M. A., ALBINA, E., LIBEAU, G. (2010). Quantitative one-step real-time RT-PCR for the fast detection of the four genotypes of PPRV. J Virol Methods, **165**: 168–177.

- KUL, O., KABAKCI, N., ATMACA, H. T., ÖZKUL, A. (2007). Natural Peste Des Petits Ruminants virüs Infection: Noval Pathologic Finding Resembling Other Morbillivirus Infections. *Vet Pathol*, **44(4)**: 479-86.
- KUMAR, C. S., RAJ, G. D., THANGAVELU, A., SHAILA, M. S. (2007). Performance of RT-PCR-ELISA for the detection of peste des petits ruminants virus. *Small Rumin. Res.* **72**: 200-208.
- LAMB, R. A., KOLAKOFSKY, D. (2001). *Paramyxoviridae*: the viruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, third ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp.1305–1340.
- LEFEVRE, P. J., DIALLO, A. (1990). Peste des petits ruminants. *Rev. Sci. Tech. Off .int. Epiz.* **9(4)**: 951-965.
- LI L., BAO J., WU X., WANG Z., WANG J., GONG M., LIU C., LI J. (2010). Rapid detection of peste des petits ruminants virus by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Virol. Methods*, **170 (1–2)**: 37–41.
- LIBEAU, G., DIALLO, A., COLAS, F., GUERRE, L. (1994). Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture ELISA. *Vet. Rec.* **134(12)**, 300-304.
- LIBRADO, P., ROZAS, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.
- McILHATTON, M. A., CURRAN, M. D., RIMA, B. K. (1997). Nucleotide sequence analysis of the large (L) genes of phocine distemper virüs and canine distemper virüs (corrected sequence). *J.Gen.Virol.* **78**: 571–576.
- MACLACHLAN, N. J., DUBOVI, E. J. (2011). Fenner's Veterinary Virology, Fourth Edition, Chapter 17, *Paramyxoviridae*, pp. 300-325.
- MAGANGA, D. G., VERRIER, D., ZERBINATI, R. M., DROSTEN, C., DREXLER, J. F., LEROY, E. M. (2013). Molecular typing of PPRV strains detected during an outbreak in sheep and goats in south-eastern Gabon in 2011. *Virology Journal*, **10**:82.
- MAHAPATRA, M., PARIDA, S., EGZIABHER, B. G., DIALLO, A., BARRETT, T. (2003). Sequence analysis of the phosphoprotein gene of peste des petits ruminants (PPR) virus: editing of the gene transcript. *Virus Res.* **96(1-2)**: 85–98.

- MITRA-KAUSHIK, S., NAYAK, R., SHAILA, M. S. (2001). Identification of a cytotoxic T-cell epitope on the recombinant nucleocapsid proteins of Rinderpest and Peste des petits ruminants viruses presented as assembled nucleocapsids. *Virology*, **279**: 210-20.
- MINET, C., KWIATEK, O., KEITA, D., DIALLO, A., LIBEAU, G., ALBINA, E. (2009). Morbillivirus infections in ruminants: rinderpest eradication and peste des petits ruminants spreading towards the north. *Virologie*, **13**: 103-113.
- MUNIR, M., ZOHARI, S., SAEED, A., KHAN, Q.M., ABUBAKAR, M., LEBLANC, N., BERG, M. (2012). Detection and Phylogenetic Analysis of Peste des Petits Ruminants Virus Isolated from Outbreaks in Punjab, Pakistan. *Transboundary and Emerging Diseases*. **59**: 85-93
- MURPHY, F., A., PAUL, E., GIBBS, J., HORZINEK, MARIAN, C., STUDDERT, MICHAEL, J. (1999). *Veterinary Virology*, 3rd Edition, Academic Press.
- MUTHUCHELVAN, D., SANYAL, A., SREENIVASA, B. P., SARAVANAN, P., DHAR, P., SINGH, R. P., SINGH, R. K., BANDYOPADHYAY, S. K. (2006a). Analysis of the matrix protein gene sequence of the Asian lineage of peste-des-petits ruminants vaccine virus. *Vet. Microbiol.* **113**: 83-87.
- MUTHUCHELVAN, D., SANYAL, A., BALAMURUGAN, V., DHAR, P., BANDYOPADHYAY, S. K. (2006b). Sequence Analysis of the Nucleoprotein Gene of Asian Lineage Peste des Petits Ruminants Vaccine Virus, *Veterinary Research Communications*, **30**: 957-963.
- MUTHUCHELVAN, D., SANYAL, A., SARKAR, J., SREENIVASA, B. P., BANDYOPADHYAY, S. K., (2006c). Comparative nucleotide sequence analysis of the phosphoprotein gene of peste des petits ruminants vaccine virus of Indian origin. *Archives of Virology*, **150(12)**: 2467-2481.
- OIE, (1999). Office International des Epizooties (OIE) OIE disease information 1999;12:137.
- OIE, (2008). [Erişim: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Countryreports]. Erişim Tarihi: 20.09.2012
- OIE, (2012). Peste des Petits ruminants, Terrestrial Manual 2012. Chapter 2.7.11. [Erişim: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.11_PPR.pdf]. Erişim Tarihi: 20.09.2012

- ÖZKUL, A., AKÇA, Y., ALKAN, F., BARRETT, T., KARAOĞLU, T., DAĞALP, S. B., ANDERSON, J., YEŞİLBAĞ, K., ÇOKÇALIŞKAN, C., GENÇAY, A., BURGU, İ. (2002). Prevalence, Distribution and Host Range of Peste des petits ruminants virus, Turkey. *Emerg. Infect. Dis.* **8(7)**: 708-712.
- PEEPLES, M. E. (1991). Paramyxovirus M protein. Pulling it all together and taking it on the road. In: Kingsbury, D.W. (Ed.), *The Paramyxoviruses*. Plenum Press, New York, pp.:427-456.
- RAJ, G. D., RAJANATHAN, T. M., KUMAR, C. S., RAMATHILAGAM, G., HIREMATH, G., SHAILA, M. S. (2008). Detection of peste des petits ruminants virus antigen using immunofiltration and antigen-competition ELISA methods. *Vet. Microbiol.* **129(3-4)**: 246-251.
- ROGER, F., GUEBRE, Y. M., LIBEAU, G., DIALLO, A., YIGEZU, L. M., YILMA, T. (2001). Detection of antibodies of rinderpest and peste des petits ruminants viruses (*Paramyxoviridae*, Morbillivirus) during a new epizootic disease in Ethiopian camels (*Camelus dromedarius*). *Revue de Med. Vet.* **152(3)**: 265-268.
- ROSSITER, P. B., TAYLOR, W. P. (1994). Peste des petits ruminants. In: infectious diseases of livestock. Coetzter, JAW (ed), Vol II, Oxford Printing Press, Cape town, South Africa. pp: 758-765.
- SARAVANAN, P., SINGH, R. P., BALAMURUGAN, V., DHAR, P., SREENIVASA, B. P., MUTHUCHELVAN, D., SEN, A., ALEYAS, A. G., SINGH, R. K., BANDYOPADHYAY, S. K. (2004). Development of an N gene-based PCR-ELISA for detection of Peste-des-petits-ruminants virus in clinical samples. *Acta Virol.* **48**: 249-255.
- SCOTT G. R. (1981). Rinderpest and peste des petits ruminants. In: Gibbs EPJ, ed. *Virus Diseases of Food Animals*, Vol II. Academic Press, London, UK, pp: 401-432.
- SCOTT, G. R. (1990). Peste des petits ruminants (Goat plaque) virus. In: *Virus Infections of Ruminants*. Eds: Z. Dinter, B. Morein, Elsevier Science Publisher, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, chapter, 33 p.: 355-361.
- SETH, S., SHAILA, M. S. (2001). The Fusion Protein of Peste des Petits Ruminants virus Mediates Biological Fusion in the Absence of Hemagglutinin±Neuraminidase Protein, *Virology*, **289(1)**:86-94.
- SHAILA, M. S., PURUSHOTHAMAN, V., BHAVSAR, D. A., VENUGOPAL, K., VENKATESAN, R. A. (1989). Peste des petits ruminants of sheep in India. *Vet. Record.* **125**: 602.

- SHAILA, M. S., SHAMAKI, D., FORSYTH, M., DIALLO, A., GOATLEY, L., KITCHING, P., BARRETT, T. (1996). Geographic distribution and epidemiology of peste des petits ruminants. *Virus Res.* **43**: 149-153.
- SINGH, R. P., SARAVANAN, P., SREENIVASA, B. P., SINGH, R. K., BANDYOPADHYAY, S. K. (2004). Prevalence and distribution of peste des petits ruminants virus infection in small ruminants in India. *Revue Scientifique et Technique*, **23**: 807-819.
- STEINFELD, H., GERBER, P., WASSENAAR, T., CASTEL, V., ROSALES, D. E., HAAN, M. (2006). *Livestock's Long Shadow*, 1st Ed. FAO, Rome.
- SUJATHA, K., SHANTHI, G., SELVAM, N. P., MANOHARAN, S., PERUMAL, P. T., RAJENDRAN, M. (2009). Synthesis and antiviral activity of 4,4'-(arylmethylene)bis(1H-pyrazol-5-ols) against peste des petits ruminant virus (PPRV). *Bioorg Medicinal Chem Letter*, **19**: 4501-4503.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. (2011). MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol and Evol*, **28**: 2731-2739.
- TATAR, N. (1998). Koyun ve keçilerde küçük ruminantların vebası ve sığır vebası enfeksiyonlarının serolojik ve virolojik olarak araştırılması. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- TAYLOR, W. P. (1979). Protection of goats against peste des petits ruminants with attenuated rinderpestvirus. *Res.Vet.Sci.* **27**: 321-324.
- TAYLOR, W. P. (1984). The distribution and epidemiology of peste des petits ruminants. *Prev. Vet. Med.* **2**: 157-166.
- TOPLU, N. (2004). Characteristic and non-characteristic pathological findings in peste des petits ruminants (PPR) of sheep in the Ege district of Turkey. *J Comp Pathol*, **131**:135–141.
- TOPLU, N., OĞUZOĞLU, T. Ç., ALBAYRAK, H. (2012). Dual infection of fetal and neonatal small ruminants with Border Disease Virus and Peste des Petits Ruminants Virus (PPRV): Neuronal tropism of PPRV as a novel findings. *J. Comp. Path.* **146**: 289-297.
- WANG, Z., BAO, J., WU, X., LIU, Y., LI, L., LIU, C., SUO, L., XIE, Z., ZHAO, W., ZHANG, W., YANG, N., LI, J., WANG, S., WANG, J. (2009). Peste des petits ruminants virus in Tibet, China. *Emerg. Infect. Dis.* **15**: 299-301.

WOHLSEIN, P., SALIKI, J. (2006). Rinderpest and peste des petits ruminants –the diseases: clinical signs and pathology. In Rinderpest and Peste des Petits Ruminants. Eds T.Barrett, P-P. Pastoret, W.P. Taylor. Academic Press. Pp 68-85.

YEŞİLBAĞ, K., YILMAZ, Z., GÖLCÜ, E., ÖZKUL, A. (2005). Peste des petits ruminants outbreak in western Turkey. Vet . Rec. **157(9)**: 260-261.

ZHAO, W., YANG, S., HAN, J., JIANG, M., LI, H., ZHANG, N., LI, Q. (2009). Confirmed Diagnosis by RT-PCR and Phylogenetic Analysis of Peste des Petits Ruminants Viruses in Tibet, China, Virologica Sinica, **24(6)**: 573-578.

BLAST. [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>] Erişim tarihi: 30.05.2013

DnaSP v5. [Erişim: <http://www.ub.edu/dnasp/>] Erişim tarihi:30.05.2013

Expasy.org. [Erişim: [http:// www.expasy.org/ viral zone/all_ by_ species/556.html](http://www.expasy.org/viral_zone/all_by_species/556.html)], Erişim tarihi:20.09.2012

Network. [<http://www.fluxus-engineering.com>] Erişim tarihi:30.05.2013

EK 1:Hayvan deneyleri yerel etik kurul kararı**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu**

24/03/2010

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :24/03/2010
TOPLANTI NO :2010-59
DOSYA NO :2010-255
KARAR NO :2010-59-298

Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim öğretim üyelerinden Prof.Dr.Seval Bilge Dağalp'in araştırma yürütücüsü olduğu, Dok.Öğr.Ahmet Sait ile ortak çalışmaları olan "PPRV enfeksiyonunun tespitinde N genine dayalı RT-PCR tekniklerinin rutin tanıda kullanılan F genine dayalı PCR tekniği ile karşılaştırılması ve tespit edilen virusların F ve N proteini kodlayan genlerinin moleküler karakterizasyonu" başlıklı çalışmaları Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre uygun bulunarak onaylanmasına, katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

ASLININ AYNIDIR
24/03/2010



Prof.Dr.Hakan YARDIMCI
Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel
Etik Kurulu Başkanı



12



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Genel Sekreterlik

Sayı : B.30.2.ANK.0.70.00.00/

Konu:

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Ankara

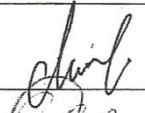
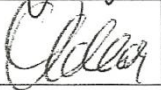
24/03/2010

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :24/03/2010
TOPLANTI NO :2010-59
DOSYA NO :2010-255
KARAR NO :2010-59-298

Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim öğretim üyelerinden Prof.Dr.Seval Bilge Dağalp'in araştırma yürütücüsü olduğu, Dok.Öğr.Ahmet Sait ile ortak çalışmaları olan "PPRV enfeksiyonunun tespitinde N genine dayalı RT-PCR tekniklerinin rutin tanıda kullanılan F genine dayalı PCR tekniği ile karşılaştırılması ve tespit edilen virusların F ve N proteini kodlayan genlerinin moleküler karakterizasyonu" başlıklı çalışmaları Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre uygun bulunarak onaylanmasına, katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

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

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

EK- 2: Standart Genetik Kodlar

	T	C	A	G	
T	TTT Phe TTC Phe TTA Leu TTG Leu	TCT Ser TCC Ser TCA Ser TCG Ser	TAT Tyr TAC Tyr TAA TAG	TGT Csy TGC Csy TGA TGG Trp	T C A G
C	CTT Leu CTC Leu CTA Leu CTG Leu	CCT Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAT His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGT Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg	T C A G
A	ATT Ile ATC Ile ATA Ile ATG Met	ACT Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAT Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGT Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg	T C A G
G	GTT Val GTC Val GTA Val GTG Val	GCT Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAT Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GTT Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly	T C A G

Ek-3: Aminoasitler ve Sembolleri

A	Ala	Alanin
C	Cys	Sistein
D	Asp	Aspartik Asit
E	Glu	Glutamik Asit
F	Phe	Fenilalanin
G	Gly	Glisin
H	His	Histidin
I	Ile	İzolösün
K	Lys	Lizin
L	Leu	Lösün

M	Met	Metionin
N	Asn	Asparjin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arjinin
S	Ser	Serin
T	Thr	Tironin
V	Val	Valin
W	Trp	Triptofan
Y	Tyr	Tirozin

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Ahmet
 Soyadı : SAİT
 Doğum yeri ve tarihi : Balıkesir – 15.04.1980
 Uyruğu : T.C.
 Medeni durumu : Evli
 İletişim adresi ve telefonu : Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Batı Mah.
 Ankara Cad. No:1 Pendik, İstanbul
 0543 376 44 97

II- Eğitimi

1999-2004: Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
 1994-1997: Selimiye Veteriner Sağlık Meslek Lisesi
 1991-1994: Buğdaylı Köyü Ortaokulu
 1987-1991: Büyüksoğuklar Köyü İlkokulu

Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları

2002: Veteriner Hekim
 1997: Veteriner Sağlık Teknisyeni

IV- Mesleki Deneyimi

2003- 2013: G.T.H.B. Pendik Veteriner Kontrol Enst. (Vet. Hekim)
 2002- 2003: G.T.H.B. Artvin İl Müd. (Vet. Hekim)
 1998- 2002: G.T.H.B. Kırıkkale İl Müd. (Vet. Sağ. Tek)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Morbilliviruslar ve Viral Zoonoz Hastalıklar

Yayınları

1. ÜNSAL BACA, A., SAİT, A., ERDEM, A., ATIL, E. (2011). Doğu Karadeniz Bölgesinde Malignant Catharral Fever Olgusu. Pendik Mikrobiyoloji Dergisi. 38(1):18-21

Bildiriler

1. AYSEL UNSAL BACA, SUAT GURBUZ, **AHMET SAİT**, The Situation of PPR in Marmara Region of Turkey, 3rd Annual Meeting EPIZONE, Antalya, Turkey, pg.185, 12-15 May 2009
2. AYSEL UNSAL BACA, BİRSEN AKCADAG, SELMA IYISAN, HİKMET UN, **AHMET SAİT**, FEVZİYE FUCULAR, NESRİN TURAN, Pathogenicity of Avian Influenza Viruses Isolated from Marmara region, 3rd Annual Meeting EPIZONE, Antalya, Turkey, pg.191, 12-15 May 2009
3. Seval BİLGE DAGALP, **Ahmet SAİT**, Alireza FARAJI, Mahur TURAN, Aykut OZKUL, Peste des Petits Ruminants in Turkey, Global Peste des Petits Research Alliance meeting. 29-30 April 2013. Nairobi, Kenya

Projeler

1. Unsal Baca A, **Sait A.** ‘‘Diagnosis of Peste des Pestits Ruminants(PPR) using Molecular techniques’ Part of Co-ordinated Project of IAEA: The early and sensitive diagnosis and control of Peste des Petits ruminants (PPR), IAEA contract no: 14514. 2007
2. Seval BİLGE DAĞALP, **Ahmet SAİT**. ‘‘PPRV enfeksiyonunun epidemiyolojisinin N ve F genlerine dayalı farklı PCR teknikleri ile araştırılması’’ A.Ü. BAP 10B3338012 (Yardımcı Araştırmacı)
3. **Ahmet SAİT**, Seval BİLGE DAĞALP. ‘‘PPRV enfeksiyonunun epidemiyolojisinin N ve F genlerine dayalı farklı PCR teknikleri ile araştırılması’’ TAPGEM/HSYGAD/12/A07/P02/07 (Proje Lideri)

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Monoklonal antikor üretimi ve teşhiste kullanımı, Leicester Üniversitesi, İngiltere, Ocak-Şubat 2010