

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**ÜÇ GÜN HASTALIĞI VİRUSU TÜRKİYE
İZOLATININ TÜM GENOM
SEKANSLANMASI VE BU VİRUSA KARŞI
DNA AŞISI GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Hasan ABAYLI

2018

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Şükrü TONBAK

Viroloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan BULUT

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Hakan BULUT

Prof. Dr. Burhan ÇETİNKAYA

Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR

Prof. Dr. Şükrü TONBAK

Dr. Öğr. Üyesi Engin BERBER



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Arş. Gör. HASAN ABAYLI

Tarih: 13.09.2018

İmza:

Prof. Dr. Hakan BULUT

Viroloji Anabilim Dalı

ELAZIG-2018

TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora öğrenimim süresince danışmanlığımı üstlenen, her konuda desteğini ve tecrübesini esirgemeyen, bu alanda yetişmemde büyük emeği bulunan tez danışmanım

Prof. Dr. Hakan BULUT’a,

Bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım

Prof. Dr. Şükrü TONBAK’a,

Yetiştirip emek vererek bugünlere ulaşmamı sağlayan

Değerli Aileme,

Desteklerini her zaman hissettiğim

Prof. Dr. Kezban ŞAHNA’ya,

İstatistik çalışmalarında yardımını esirgemeyen değerli arkadaşım

Arş. Gör. Dr. Yasin BAYKALIR’a,

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesindeki tüm asistan arkadaşlarıma,

Tez çalışmasının yapılmasında maddi destekte bulunan **FÜBAP**’ birimine ve maddi destekleri ile çalışmanın olgunlaşıp doktora tezi haline dönüşmesini sağlayan **TÜBİTAK**’a

Teşekkürlerimi sunarım...

Bu çalışma **TOVAG 114O668** nolu proje ve **FÜBAP VF.16.27** nolu projelerden sağlanan maddi desteklerle yapılmıştır.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
1. ÖZET	xvi
2. ABSTRACT	xviii
3. GİRİŞ	1
3.1. DNA Aşıları	2
3.1.1. DNA Aşısının İmmun Yanıtı Uyarım Mekanizması	4
3.1.2. DNA Aşısının Avantaj ve Dezavantajları	6
3.1.3. DNA Aşı Etkinliğinin Artırılması	9
3.1.3.1. Enjeksiyon Bölgesi ve Miktarı	9
3.1.3.2. Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Transfer Sistemleri	10
3.1.3.3. Geleneksel Adjuvanlar ve İmmunostimülanlar	13
3.1.3.4. Ekspresyon Seviyesinin Artırılması	14
3.1.4. Klinik Denemeler	16

3.1.4.1.	Rhabdovirüs Rekombinant Aşı Denemeleri	18
3.2.	Bovine Ephemeral Fever Virüs ve Hastalığı.....	20
3.2.1.	Kökeni ve Dünya Üzerindeki Dağılımı	20
3.2.2.	Hastalığın Türkiye’deki Durumu	23
3.2.3.	Sınıflandırma.....	25
3.2.4.	Yapı ve Viral Genom Özellikleri	27
3.2.5.	Proteinler ve Fonksiyonları	31
3.2.6.	Antijenik Özellikler, Genetik ve Antijenik Varyasyonlar.....	34
3.2.7.	Çoğalma Stratejisi	37
3.2.8.	Bovine Ephemeral Fever Patogenez, Seroloji ve Patolojisi.....	39
3.2.9.	Bovine Ephemeral Fever Epidemiyolojisi	43
3.2.9.1.	Bulaşma Yolları	43
3.2.9.2.	Hastalığın Yayılımını Etkileyen Faktörler.....	43
3.2.9.2.1.	Konak	44
3.2.9.2.2.	İklim Koşulları	46
3.2.9.2.3.	Rüzgar	47
3.2.9.2.4.	Virülens	48
3.2.9.2.5.	Vektör Popülasyonu	49
3.2.9.2.6.	Rezervuar.....	50
3.2.10.	Ekonomik Önemi	51
3.2.11.	Teşhis	52

3.2.12. Tedavi.....	53
3.2.13. Korunma ve Kontrol	54
3.2.13.1. Aşılar	55
3.2.13.1.1. Canlı Atenüe Aşılar	57
3.2.13.1.2. İnaktif Aşılar.....	58
3.2.13.1.3. Subunit Aşılar.....	60
3.2.13.1.4. Rekombinant Aşılar.....	60
4. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	64
4.1. Bovine Ephemeral Fever Virüsün Tam Genom Sekanslaması	64
4.1.1. Vero E6 Adapte BEFV RNA İzolasyonu.....	64
4.1.2. Sekanslanacak Bölgelerin RT-PCR ile Çoğaltılması.....	65
4.2. BEFV G ve N Gen Bölgelerinin Moleküler Klonlaması	70
4.2.1. Fare Beyni Adapte BEFV'nin Vero E6 Hücrelerinde Üretimi	70
4.2.2. BEFV RNA İzolasyonu	71
4.2.3. RT-PCR ile İnzört Bölgelerin Çoğaltılması ve Saflaştırılması.....	72
4.2.4. İnzört Bölgelerin Ekspresyon Vektörüne Ligasyonu ve Kimyasal Transformasyonu.....	76
4.2.5. Koloni Tarama Yöntemi ile Kimyasal Transformasyonun Doğrulanması	77
4.2.6. Rekombinant pcDNA4-G ve pcDNA4-N Plazmidlerin Saflaştırılması ve Ligasyonun Doğrulanması	78

4.3. Vero E6 Ökaryotik Hücrenin Rekombinant pcDNA4-G ve pcDNA4-N Plazmidleri ile Transfeksiyonu.....	80
4.3.1. Geçici Transfeksiyon	80
4.3.2. Kalıcı (Stabil) Transfeksiyon	81
4.4. Rekombinant pcDNA4-G ve pcDNA4-N Plazmidlerin Vero E6 Hücresinde Ekspresyonlarının Gösterilmesi.	82
4.4.1. Ekspresyonların RT-PCR ile Gösterilmesi	82
4.4.2. Ekspresyonların İmmunoperoksidaz Testi ile Gösterilmesi	83
4.5. Rekombinant Protein Pürifikasyonları.....	85
4.5.1. Rekombinant Proteinlerin SDS-PAGE ve Vestern Blot Analizi	86
4.5.1.1. Akrilamid Jel ve Solüsyonların Hazırlanması	86
4.5.1.2. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez	87
4.5.1.3. Vestern Blot Analizi	88
4.6. İmmünizasyonda Kullanılacak Materyallerin Hazırlanması.....	89
4.7. İmmünizasyonlar.....	91
4.8. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testinde Kullanılacak BEFV'nin Titresinin Belirlenmesi	92
4.9. Deney Gruplarının Antikor Ölçümleri	93
4.9.1. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi (PRNT)	93
4.9.2.1. BEFV G ELISA	94
4.9.2.2. N Protein ELISA.....	95

4.10. İstatistik ve Hesaplamalar	96
4.11. Vestern Blotlamada pcDNA4-G ve N İmmun Fare Serumları ile BEFV G ve BEFV N Proteinlerin Gösterilmesi	97
5. BULGULAR	98
5.1. Bovine Ephemeral Fever Virüs Tam Genom Sekans Analizi.....	98
5.2. Bovine Ephemeral Fever Virüsün Vero E6 Hücrelerinde Üretimi	103
5.3. Bovine Ephemeral Fever Virüs Glikoprotein ve Nükleoprotein İnzört Bölgelerin RT-PCR ile Çoğaltılması.....	104
5.4. pcDNA4-G ve pcDNA4-N Rekombinant Vektörlerin Kimyasal Transformasyonu.....	105
5.5. Rekombinant Vektörlerin PCR-Koloni Tarama Yöntemiyle Tespit Edilmesi.....	106
5.6. Geçici Transfekte Vero E6 Hücrelerin Zeocin Seleksiyonu	108
5.7. Transfekte Hücrelerin İmmunoperoksidaz Testi.....	109
5.8. Rekombinant Proteinlerin SDS-PAGE ve Vestern Blot Analizi	112
5.9. Bovine Ephemeral Fever Virüs G protein ELISA	114
5.10. Rekombinant N Protein ELISA	117
5.11. Bovine Ephemeral Fever Virüs Plak Test.....	119
5.12. Deney Grupları Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi	121
5.13. pcDNA4-G ve pcDNA4-N İmmun Serum Vestern Blot Analizi.....	124
6. TARTIŞMA	125

7. KAYNAKLAR	138
8. ÖZGEÇMİŞ	148



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Çeşitli aşı formülasyonlarının etkinliği	8
Tablo 2. Lisanslı DNA aşıları	17
Tablo 3. BEFV tam genom çoğaltılmasında kullanılan kısmi primerler.....	66
Tablo 4. BEFV tam genom kısmi primerleri ile PCR adımı	68
Tablo 5. Random primer-templeyt karışımı	72
Tablo 6. Reaksiyon solüsyonları	73
Tablo 7. BEFV G ve N gen bölgelerini çoğaltmada kullanılan primerler.....	73
Tablo 8. BEFV G ve N genlerinin çoğaltılması için PCR adımı	74
Tablo 9. Ligasyon doğrulamada kullanılan ekspresyon vektörüne ait primerler...	79
Tablo 10. Vektöre ait primerler ile PCR adımı	79
Tablo 11. Oligo(dT) primer-templeyt karışımı	83
Tablo 12. BEFV Türkiye izolatu (KY012742) ile Avustralya (AF234533) ve Çin (KC788421) izolatu arasındaki nükleotit ve amino asit eşleştirilmesi	99

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Plazmid DNA aşısının genel yapısı	3
Şekil 2. BEF'in tarihsel olarak rapor edildiği veya bilindiği ülkeler	21
Şekil 3. Mevcut BEFV'nin muhtemel kökeni ve yayılma yolu	23
Şekil 4. BEFV virion yapısı	28
Şekil 5. BEFV ve diğer ephemerovirüslerin (KIMV, ARV, OBOV, KOTV, KOOLV ve YATV) genom organizasyonu	31
Şekil 6. Moleküler klonlama çalışmasında kullanılan pcDNA4/HisMax [®] TOPO [®] TA ekspresyon vektörü haritası	75
Şekil 7. BEFV G ve N inzört genlerin ligasyonu	76
Şekil 8. Gen bankası veri tabanındaki BEFV G gen bölgelerinin nükleotit dizileri kıyaslanarak oluşturulan filogenetik ağaç	100
Şekil 9. Farklı ülkelerde ortaya çıkan BEFV'nin G yüzey proteini üzerindeki antijenik bölgelerin (G1, G2 ve G3) amino asit dizilimlerinin hizalanması	101
Şekil 10. SimPlot paket programı kullanılarak oluşturulan Türkiye, Çin ve Avusturalya izolatlarının tam genom nükleotit dizilerinin benzerlik grafik analizi ile kıyaslaması	102
Şekil 11. Fare beyni adapte 2012/TR/ADYMN BEFV izolatının Vero E6 hücresi enfeksiyonu	103
Şekil 12. BEFV enfekte Vero E6 lizat RNA'sı RT-PCR sonuçları	104
Şekil 13. Rekombinant plazmidleri taşıyan transforme TOP10 kompeten hücre kolonileri	105
Şekil 14. Rekombinant vektörle transforme bakteri hücrelerinden elde edilen kolonilerde G ve N genlerinin varlığının PCR koloni tarama ile doğrulanması	106

Şekil 15. Geçici transfekte (pcDNA4-G) Vero E6 hücreleri Zeocin seleksiyonu	108
Şekil 16. pcDNA4-G transfekte Vero E6 hücrelerinde BEF G1 monoklonal antikor kullanılarak yapılan immunoperoksidaz testi.	109
Şekil 17. pcDNA4-N transfekte Vero E6 hücrelerinde 6X-His-Tag monoklonal antikor kullanılarak yapılan immunoperoksidaz testi.	110
Şekil 18. pcDNA4-G transfekte Vero E6 hücrelerinde BEF G1 monoklonal antikor kullanılarak yapılan immunoperoksidaz testi.	111
Şekil 19. Pürifiye rekombinant G protein SDS-PAGE analizi.	112
Şekil 20. Pürifiye rekombinant N protein SDS-PAGE analizi	113
Şekil 21. Pürifiye rekombinant G ve N proteinleri ve yüksek BEF pozitif sığır serumuyla gerçekleştirilen Vestern blot sonuçları.	114
Şekil 22. BEFV ve pcDNA4-G immun farelere ait son serumların birey bazında BEFV G ELISA antikor ölçümleri.....	115
Şekil 23. İmmunize farelere ait serumların BEFV G ELISA antikor ölçümleri.	116
Şekil 24. BEFV ve pcDNA4-N immun farelere ait son serumların birey bazında rekombinant N protein ELISA antikor ölçümleri.	117
Şekil 25. İmmunize farelere ait serumların rekombinant N protein ELISA ile antikor ölçümleri.	119
Şekil 26. Vero E6 hücresinde BEFV'nin plak titrasyon testi	120
Şekil 27. PRNT ₅₀ testi ile deney gruplarının nötralizan antikor ölçümleri.	122
Şekil 28. BEFV G ve N proteinlerin pcDNA4-G ve pcDNA4-N immunize fare serumları ile gösterildiği Vestern blot deneyi.	124

KISALTMALAR LİSTESİ

°C	:Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
bç	: Baz çifti
cDNA	: Komplementer DNA
CD	: Farklılaşma kümesi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotit trifosfat
ELISA	: Enzim ilintili immünosorbent deneyi
g	: Gram
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
mg	: Miligram
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MHC	: Majör doku uyumluluk kompleksi
ml	: Mililitre
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RT-PCR	: Tersine transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu
OD	: Optik dansite
PBS	: Fosfat tampon solüsyonu
PFU	: Plak formasyon ünite
pH	: Hidrojen iyon konsantrasyonu
nt	: Nükleotit
sa	: Saat

sn	: Saniye
Th	: Yardımcı T hücresi
tRNA	: Taşıyıcı ribonükleik asit
TNF-α	: Tümör nekroz faktör alfa
Vero E6	: Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattı



1. ÖZET

Bovine ephemeral fever (BEF) yüksek verimli sığır ve mandalarda önemli kayıplara yol açabilen, kısa süreli klinik tablo ile karakterize arboviral bir hastalıktır. Bu tez çalışmasında öncelikle, Türkiye’de 2012 yılında ortaya çıkmış BEF salgınından izole edilen bovine ephemeral fever virüs (BEFV)’ün ileri düzeyde genetik karakterizasyonu amaçlanmıştır. Ayrıca mevcut tez çalışmasında, BEFV glikoprotein (G) ve BEFV nükleoprotein (N) gen bölgelerini içeren rekombinant vektörün oluşturulması ve rekombinant vektörlerle immunize edilen BALB/c farelerinde bu proteinlere karşı humoral immun cevabın uyarımı hedeflenmiştir. Genetik karakterizasyon amacıyla BEFV tam genomunu kapsayan 600-800 bp kısmi gen bölgeleri RT-PCR ile çoğaltılmıştır. ABI 310 Genetik analiz® sisteminde çift yönlü okutulan gen ürünleri ClustalW programı ile hizalanmış ve veriler gen bankasına sunulmuştur. Filogenetik analiz işlemi MEGA5 paket programı ile gerçekleştirilmiş farklı izolatlarla benzerlikleri yönünden kıyaslanmıştır. Sonuçlar, BEFV izolatları arasındaki filogenetik ilişkilerin coğrafi konumla yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca izolatlar arasında genetik rekombinasyon durumuna rastlanmamıştır. Rekombinant vektör oluşturulması ve immunizasyon çalışması amacıyla BEFV G ve BEFV N genleri pcDNA4/HisMax® TOPO® TA ekspresyon vektörüne aktararak TOP10 kompeten hücrelerinde çoğaltılmıştır. pcDNA4-G ve pcDNA4-N plazmidleri öncelikle Vero E6 hücrelerine transfekte edilerek, Western blot ve immunoperoksidaz testleri ile protein düzeyinde ve RT-PCR testi ile mRNA düzeyinde ekspresyonları gösterilmiştir. Uygun plazmidler lipofektamin 2000 ile muamele edilerek 0., 14., 21. günlerde BALB/c farelerine kas içi uygulanmıştır.

İmmunize farelerdeki antikor yanıt plak redüksiyon nötralizasyon testi (PRNT) ve ELISA testleri ile ölçülmüştür. BEFV G ve N indirek ELISA sonuçlarına göre bu gruplardaki yedi hayvandan yalnızca ikisi cutoff düzeyini aşabilmiştir. pcDNA4-N ve pcDNA4-G immün gruba ait 450 nm absorbanstaki ortalama OD değeri plazmid kontrol grubu ile kıyaslandığında fark 30. günde istatistiki olarak anlamlı hale gelmiştir ($p<0.001$), ($p<0.05$). PRNT₅₀ sonuçlarına göre pcDNA4-G (100 µg) ile immünize farelerde 30. günde 1:20 ($p<0.05$) düzeyinde antikor yanıt alınırken BEFV (1000 PFU/0.5ml) verilen farelerde ise bu oran 1:80'e ($p<0.001$) ulaşmıştır. Sonuç olarak rekombinant proteinlerin üretimi ve rekombinant vektörler ile immünize edilen deney farelerinde humoral yanıtın uyarımı noktasında başarı sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bovine ephemeral fever virüs, üç gün hastalığı, filogenetik analiz, moleküler klonlama, DNA aşısı, antikor yanıt.

2. ABSTRACT

Whole Genome Sequence of Bovine Ephemeral Fever Virus Turkey

Isolates and Development of DNA Vaccine to the Virus

Bovine ephemeral fever (BEF) is an arboviral disease characterized by a short-term clinical picture that can lead to significant loss in high-yielding cattle and water buffalo. In this dissertation study, briefly bovine ephemeral fever virus (BEFV) which is isolated from the BEF outbreak in 2012 in Turkey genetic characterization is aimed at the advanced level. Furthermore, it was aimed to generate a recombinant vector containing BEFV glycoprotein (G) and BEFV nucleoprotein (N) gene regions and to stimulate the humoral immune response against these proteins in BALB/c mice immunized with these vectors. BEFV was amplified by RT-PCR with partial gene regions of 600-800 bp including the complete genome for genetic characterization. The amplified RT-PCR products were sequenced using both directions with the forward and reverse primers in the ABI 310 Genetic Analysis[®] System. The Gene sequences were aligned using ClustalW program and presented to the gene bank. The phylogenetic analysis process was compared for similarity with the different isolates performed by the MEGA5 software program. The results show that phylogenetic relationships between BEFV isolates are closely related to the geographical location. There was also no genetic recombination between isolates. For recombinant vector design and immunization studies, BEFV G gene and BEFV N gene were transferred to the pcDNA4/HisMax[®] TOPO[®] vector and these recombinant vectors propagated in TOP10 competent cells. pcDNA4-G and pcDNA4-N recombinant plasmids were firstly transfected into Vero E6 cells and expressions were demonstrated at

the protein level by Western blot and immunoperoxidase tests and demonstrated at the mRNA level by RT-PCR test. The suitable plasmids were treated with lipofectamine 2000 and intramuscularly administered to BALB/c mice at days 0, 14, 21. Antibody response in immunized mice was measured by plaque reduction neutralization test (PRNT) and ELISA. According to the BEFV G and N indirect ELISA, only two of the seven animals in these groups exceeded the cutoff value. When the mean OD values at 450 nm absorbance of the pcDNA4-N and the pcDNA4-G immunized mice group were compared with the plasmid control group, the difference became significant at 30 days ($p<0.001$), ($p<0.05$). According to PRNT₅₀ results, 1:20 ($p<0.05$) antibody response was obtained at 30 days in pcDNA4-G (100 µg) immunized mice, whereas this ratio was 1:80 ($p<0.001$) in mice given BEFV (1000 PFU/0.5ml). As a result, recombinant proteins were successfully produced and stimulation of the humoral response was induced in experimental mice immunized with recombinant vectors.

Keywords: Bovine ephemeral fever virus, three day sickness, phylogenetic analysis, molecular cloning, DNA vaccine, antibody response.

3. GİRİŞ

Aşılama çalışmalarının geçmişi mikroorganizmaların tanımlanmasından ve hastalıkla ilişkilendirilmesinden çok daha öncesine dayanmaktadır. Tarihte bilinen ilk aşı insan çiçeğine karşı hazırlanan "Variolasyon" uygulaması ile başlamıştır. Bu uygulamada, Asya'nın bazı bölgelerindeki çiçek hastalığına yakalanmış kişilerden vezikül içeriği alınmış ve işlenerek enfekte olmayan kişilerin derisine uygulanmıştır. İstanbul'da bu yöntemin insan çiçeğinden korunma amaçlı uygulandığına tanık olan İngiliz Mary Wortley Montagu (1718), çocuğuna çiçek aşısı yaptırmak istemiş ve bu yöntemin batılı ülkelere duyulmasını sağlamıştır. İngiliz çiftçi Benjamin Jesty (1774) sığır çiçeği hastalığına yakalandıktan sonra insan çiçeğine yakalanmadığını fark etmiş benzer uygulamayı karısı ve çocukları üzerinde deneyerek başarılı netice elde etmiştir. Edward Jenner (1798) büyük çaplı çalışmalarla bu aşının etkinliğini ispatlamış böylece ilk canlı viral aşı olan çiçek aşısı "Cowpox" veya "Vaccinia" fikrini geliştirerek bilimsel olarak tıpta bir çığır açmış ve bugünkü modern immunolojinin temelini oluşturmuştur (1).

Yalın haldeki DNA'nın organizmadaki hücrelere aktarılabilirliği Ito tarafından (1960) keşfedilmiştir. Ancak, 30 yıl sonrasına kadar bu buluşun potansiyeli tam olarak fark edilememiştir. Wolff *ve ark.* (1990) beta-galaktosidaz geni taşıyan rekombinant plazmidin farelerde eksprese olduğunu ve dokudaki transgenik aktivitenin, inokülasyondan sonraki 60 gün boyunca devam ettiğini göstermiştir. Bu gelişmeler Tang *ve ark.* (1992) insan büyüme hormonu kodlayan rekombinant plazmidin enjekte edildiği farelerde antijene özgü antikor yanıtı uyardığını göstermesi ile daha farklı bir boyuta taşınmıştır. Rekombinant DNA teknolojisindeki bu gelişmeler edinsel yanıtın uyarımı adına umut verici olmuş ve

nükleik asit tabanlı aşılarda gelişimine zemin hazırlamıştır. Bu gelişmelerden sonra *DNA aşısı* kavramı ortaya çıkmış ve literatürdeki yerini almıştır (2, 3, 4).

Bovine ephemeral fever (BEF) klinik bulguların 3-4 gün gibi kısa süre sonra sona ermesiyle *üç gün hastalığı* olarak da adlandırılmaktadır. Bu hastalık yüksek verimli sığır ve mandalarda önemli verim kayıplarına ve ülkeler arası ticari kısıtlamaya yol açabilmektedir. Hastalık etkeni *Rhabdoviridae* familyasında bulunan RNA genomuna sahip bovine ephemeral fever virüsüdür (BEFV). Virüs sivrisineklerle duyarlı hayvanlara taşınmaktadır. Hastalıktan korunmada sivrisineklerle mücadele önemli ancak bir dereceye kadar etkili bir uygulama olduğundan en önemli korunma yolu aşılama değildir. Mevcut inaktif ve atenüe aşılarda kısa süreli bağışıklık oluşturmada araştırmacıları alternatiflere yönlendirmiş ve rekombinant aşılarda bunlardan biri olmuştur (5, 6, 7, 8).

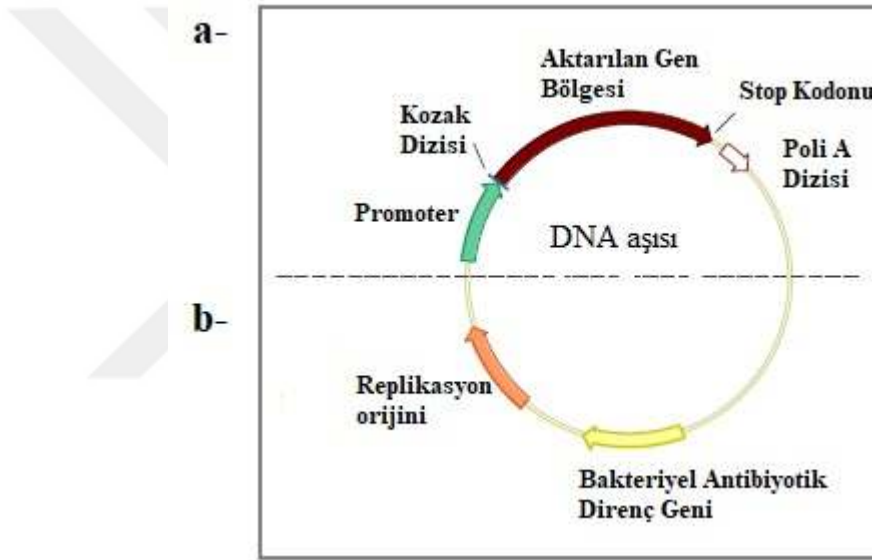
3.1. DNA Aşılarda

Plazmid DNA'sının aşı antijenlerini eksprese ederek koruyucu immün yanıtı uyarması enfeksiyöz hastalıklara yönelik aşı çalışmalarını da bu alana taşımıştır. Bu aşılarda, profilaktik amaçlı tercih edilebilmelerinin yanında kanser, alerji ve oto-immün hastalıkların tedavisine yönelik olarak da tercih edilebilmektedir. Geçmişten günümüze birçok DNA aşı denemesi yapılmış ve bunların bir kısmı halen devam etmektedir (9).

DNA aşısının temel tasarımı oldukça basittir. Bu temel, hedef gen bölgesinin ökaryotik ekspresyon vektörüne aktarılmasından oluşmaktadır. Bu temel üzerinde yapılacak modifikasyonlar immün yanıtı artırabilmekte ve netice itibarıyla aşının esnek bir yapıyı teşkil ettiği söylenebilmektedir (10). Bu yapı

genel olarak aktarılan genin veya cDNA'nın ekspresyonuna izin veren viral orijinli (insan sitomegalovirüs, rous sarkoma virüsü gibi) kuvvetli bir promotör, Kozak dizisi, stop kodonu ve poliadenilasyon (Poli A) bölgelerinden oluşmaktadır. Ayrıca ilgili plazmidin bakteride çoğalmasını sağlayacak prokaryotik replikasyon orijini ve bakteriyel seleksiyon için gerekli antibiyotik direnç genini yapısında taşımaktadır (11).

Plazmid DNA aşısının genel yapısı Şekil 1'de şematize edilmiştir.



Şekil 1. Plazmid DNA aşısının genel yapısı. **a-** Ökaryotik transkripsiyon bölgesi. **b-** Prokaryotik çoğalma bölgesi (12)

Antikorlar, vücuda giren patojenleri nötralize ederek enfeksiyonun oluşmasını önleyebilir, opsonize edebilir veya yeni oluşan ajanların diğer hücrelere girerek yayılmasını engelleyebilirler. Nötralizan antikor üretmek için en uygun hedef hücre dışı ortamdaki patojenin yüzey proteinleridir (10). Bu nedenle genel olarak, patojenlere karşı hazırlanan DNA temelli profilaktik aşılardan

nötralizan antikorları oluşturmaları istenmekte iken, enfeksiyon veya kanser tedavisinde ağırlıklı olarak hücresel immün yanıtın ortaya çıkması istenmektedir. Hücre içi mikrobiyal ajanlara karşı savaşmada (özellikle virüslere) antikor yanıtına ek olarak hücresel immün yanıtın önemini de ayrıca vurgulamak gerekmektedir (10, 13).

3.1.1. DNA Aşısının İmmün Yanıtı Uyarım Mekanizması

DNA aşılması sonrasında immunizasyon bölgesindeki somatik hücreler (miyosit, keratinosit gibi) ve antijen sunucu hücrelerin (ASH) transfekte olarak aşı plazmidini alması ilk hedeflenen ve arzulanan gelişmedir (14). Bu hücrelere zaman zaman makrofaj ve B lenfosit immün sistem hücreleri veya bazı organ ve doku hücreleri de dahil olabilmektedir (4).

Aşı proteinin üretimi, DNA aşısının transfekte hücreler içerisinde transkripsiyon ve translasyonuna dayanmaktadır. Böylece kodlanan yabancı antijenler hücre içerisinde endojen protein şeklinde üretilebilmektedir. Endojen proteinler üretildiği hücre içerisinde işlenebilirken, dışarı salınan antijenik proteinler ise antijen sunucu hücreler tarafından ekzojen protein şeklinde alınarak işlenmektedir. İşlenen peptid fragmentleri hücresel ve humoral bağışıklığın uyarımını sağlayan MHC-I ve MHC-II molekülleri aracılığıyla hücre yüzeyinde sunulmaktadır (14).

Genel anlamda DNA aşılarının üç olası immunojenite mekanizması vardır:

- i) Antijenlerin direk olarak MHC-I yolları (endojen yolla) ile antijen sunucu hücreler, miyosit veya keratinositler tarafından $CD8^+$ T hücrelerine sunulması ii) Antijen sunucu hücrelerin ekzojen antijenleri işleyerek MHC-II yolağı ile $CD4^+$ T

hücrelerine sunması iii) Transfekte somatik hücrelerin antijen sunucu hücreler tarafından fagositozu ve antijenin T hücrelerine sunumu şeklindedir (çapraz sunum) (14). Aşı plazmidi hücreye girişi esnasında bazı engellerle karşılaşmaktadır. Bunlardan ilki plazma membranıdır ve plazmidin hücreye endozomal yolla alındığı tahmin edilmektedir. İkinci engel sitoplazmadaki yüzer halde bulunan organeller ve mikrotubul ağıdır. Son engeli ise çekirdek membranı teşkil etmektedir (4).

Aşı plazmidi çekirdeğe iki yolla girebilmektedir. Bunun için ya bölünen hücrelerde çekirdek membranının ayrılmasını avantaj haline getirecek ya da nükleer por kompleksi (NPC) aracılığıyla bütün bir haldeki membrandan kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla geçecektir. İkinci durumda DNA molekülleri transkripsiyon faktörleri gibi nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) içeren polipeptitler ile ilişkili halde bulunmaktadır. Bu engelleri aşan plazmidler hücre çekirdeğine ulaştığında transkripsiyon başlamakta ve sonrasında sentezlenen mRNA'lar sitozolik ribozomlara taşınarak kodlanan proteinin translasyonunu gerçekleştirmektedir (4).

Plazmid DNA'sının mikrogram düzeyinde enjekte edilmesiyle yalnızca nanogram düzeyinde protein üretimi gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Sentezlenen proteinlerin bir kısmı proteozom kompleksi ile işlenmekte ve salınan peptitler membran transporter kompleks Tap-1 ve Tap-2 aracılığıyla endoplazmik retikulum (ER) içerisine taşınmaktadır. Endoplazmik retikulum içerisindeki peptit fragmentleri, MHC-I moleküllerine bağlanarak B₂ mikroglobulin ile ilişkili halde sitoplazmik membrana göç etmekte ve çevredeki naif T (CD8) hücrelerine sunumu gerçekleştirmektedir (15). Çözünebilir proteinin ASH'lerce alınması

sonrasında ise peptidler MHC-II ile naif T (CD4) hücrelerine sunulmakta ve böylece her iki koldan T hücre yanıtı oluşmaktadır (16).

Makrofajlar, B hücreleri ve dentritik hücreler (DH) gibi profesyonel antijen sunucu hücreler herhangi bir aşıya immun yanıt gelişmesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Somatik hücrelerin aksine ASH'ler antijeni hem MHC-I ve hem de MHC-II molekülleri ile sunabilmekte ve böylece T ve B hücre yanıtını kontrol eden yardımcı T hücrelerini (CD4⁺) uyarabilmektedir. Dentritik hücreler MHC-I ve MHC-II'yi yüksek düzeyde eksprese etmesinin dışında yanıtın başlaması için sırasıyla gerekli olan B7.1 ve B7.2 (CD80 ve CD86) uyarıcı molekülleri de eksprese ederek lenfatik organlardaki antijen spesifik T hücreleri aktive etmektedir. Eğer ASH sınıfında yer almayan miyositler DNA aşısını alırsa eksprese antijen DH'lerin çapraz sunumu ile T hücrelerine ulaştırılabilmektedir. Çapraz sunum veya çapraz uyarım; DNA aşılması ile ilişkili olabilen apoptik ve nekrotik cisimciklere karşı immun yanıtın ortaya çıkmasından sorumlu bir mekanizmadır (15).

Son yıllarda bazı çalışmalar CpG motifi (metillenmemiş fosfodiester bağlı sitozin ve guanin motifi) taşımayan plazmidlerin sitozolik DNA sensörüne bağlanarak TBK1-STING yolağını ve sonrasında tip-1 interferon üretimini yüksek oranda aktive ettiğini ortaya koymuştur (17).

3.1.2. DNA Aşısının Avantaj ve Dezavantajları

DNA aşılarının enfeksiyöz ajanlarla kontaminasyonu söz konusu olmadığından güvenli olarak kabul edilmektedir. DNA aşılması sonrasında yalnızca aşıda hedeflenen antijene karşı immun yanıt gelişmekte böylece

aşılanmış hayvanlar enfekte hayvanlardan kolayca ayırt edilebilmektedir (3). Viral enfeksiyon sonrası virüse ait proteinler hücrede üretilmekte ve proteinlerin işlenmesi de bu hücrelerde gerçekleşmektedir. Benzer şekilde DNA aşılarının hücreye alınması sonrasında kodlanan genlerin transkripsiyon ve translasyon işlemi hücrede gerçekleşmektedir. Böylece doğru katlanmaların olduğu natif yapıda viral protein üretimi gerçekleşebilmektedir. Bu özellik hedeflenen proteinde antijenik bölge değişikliğinin olmaması açısından önem arz etmektedir. DNA aşıları kolayca üretilibilmelerinin yanında, farklı türden aşılarla veya farklı gen bölgeleri ile (multivalan aşı) kombine edilebilmekte (11, 14, 15) ya da etki gücünü artıran adjuvanların çoklu gen dizilimlerini bünyesinde barındırabilmektedir (3, 12). Gen düzeyinde çalışmaya izin vererek mali açıdan yük oluşturan yüksek güvenlik seviyesindeki laboratuvarlara ihtiyacı ortadan kaldırmakta ve yüksek risk grubu hastalıklara karşı korunmada önemli rol oynayan kolostrum-maternal antikorun varlığında etkisini sürdürebilmektedir (15).

DNA aşıları rekombinant protein tabanlı aşılara göre yüksek maliyet, protein pürifikasyon gereksinimi, CD8⁺ T hücreleri zayıf uyarması gibi dezavantajları içermemekte ve adjuvanizasyon işlemi esnasında antijenin katlarında meydana gelen deformasyon problemini de ortadan kaldırmaktadır (18, 19).

DNA aşıları doğal bağışıklığın yanı sıra -antikor, yardımcı T lenfosit, sitotoksik T lenfositler- ile edinsel immun yanıtı aktifleştirerek geniş yanıt yelpazesine neden olmaktadır. Bu aşıların oldukça esnek genetik dizaynı ve basit yapıda olması nedeniyle DNA plazmidleri üzerinde kolayca değişiklikler

yapılabilmekte ve kısa sürede üretilerek ortaya çıkan pandemik tehditlere karşı koruyucu tedbirlerin alınmasını sağlayabilmektedir (12, 20).

Tümör antijenleri ile mücadele T hücresi tepkilerinin tekrar tekrar artırılmasını gerektirebilir ki, bu durum otoimmunitiyi uyarmayan ve teorik olarak sınırsız sayıda destek dozu uygulamaya elverişli DNA aşılarının kullanımına çok uygun bulunmaktadır (12, 20).

Çeşitli aşı formülasyonlarının etkinliği Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Çeşitli aşı formülasyonlarının etkinliği (21)

İmmun yanıtlar	DNA aşıları	Ölü aşı	Canlı aşı	Viral vektör
Hücrel immünite				
CD4+	+++ Güçlü Th1	+-	+-	+
CD8+	++	-	+++	+++
Humoral immünite	++	+++	+++	++
Antijen sunumu	MHC-I&II	MHC-II	MHC-I&II	MHC-I&II
Hücrel bellek yanıt	+++	+++	+++	++
Humoral bellek yanıt	++	+-	+++	++
Kolay üretim	++++	++	+	+++
Maliyet	+++	+	+	++++
Taşıma depolama	+++	+++	+	+

(+) Aşıların ilgili özellik yönünden avantaj sahibi olduğunu belirtmektedir. (+) düşük, (++) orta, (+++) iyi, (++++) çok iyi şeklinde derecelendirilmiştir.

DNA aşılarında hedeflenen antijenlerin peptid tabiatında olma zorunluluğu bulunmaktadır. Ayrıca bakteriyel ve paraziter antijenlerin translasyon sonrası farklı modifikasyon gereksinimi antijenite için engel teşkil edebilmektedir.

Genoma entegre olma riski teorik olarak mümkün olsa da bu durum henüz ispat edilmiş değildir. Otoimmün reaksiyonların gelişebilme ihtimali az da olsa bulunmaktadır (14).

Başarılı şekilde DNA aşısı geliştirmede önemli bir sorun bu aşılardaki immün yanıt uyarımının düşük seviyede olmasıdır. Düşük transfeksiyon etkinliği, yetersiz antijen ekspresyonu, konaktaki hücre içi ve hücre dışı bariyerler dahil olmak üzere birçok faktör buna katkıda bulunabilmektedir (22). Kas içi enjekte edilen plazmid DNA'sının zayıf dağılım göstermesi, yetersiz ekspresyonu ve hızlı biçimde degrade olması bu faktörlerin birkaçına örnektir (23).

3.1.3. DNA Aşı Etkinliğinin Artırılması

3.1.3.1. Enjeksiyon Bölgesi ve Miktarı

Aşılama esnasında enjeksiyon bölgesi seçimi, ortaya çıkacak yanıtın türünü ve düzeyini etkileyebilmektedir. Örneğin, aşının kas içi veya deri altı gibi yollarla verilmesi sistemik yanıtı uyarırken, aşının mukozal yüzeye verilmesi mukozal bağışıklığı da tetikleyecektir. Plazmid DNA aşısının kas içi enjeksiyonunda farelere 10-100 µg, küçük hayvanlara 100-300 µg, büyük hayvan ve insanlara ise 0.5-2.5 mg doz koruyucu yanıt için gerekli iken aynı aşının lenf içerisine 100 kat daha az miktarda uygulanması ile daha iyi bir immün yanıt ortaya çıkabilmektedir (3, 23).

DNA aşılarının deri içi ve kas içi verilmesi yaygın olarak kullanılmaktadır. Teorik olarak dermis ve epidermis yoğun biçimde farklı alttipde DH içerdiğinden dolayı DNA immunizasyonlarında deri daha umut verici görünmektedir (22). Aksine kas dokusu DH'ler ile donatılmamıştır (15, 22). Antijen sunucu hücrelerin

aşılamada hedeflenmesi aşı dozunun azaltılmasında ve yanıtın erken ortaya çıkmasına avantaj sağlayabilmektedir (22).

3.1.3.2.Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Transfer Sistemleri

Geleneksel iğne yöntemi kullanılarak yapılan DNA immunizasyonlarının dezavantajı aşı DNA'sının hücreler arası boşluğa bırakılmasıdır. Bu durum hücrelerin DNA'yı alması için kritik bir adımdır (24). Zhang *ve ark.* (2005) yaptıkları çalışmaya göre farelere kas içi enjekte edilen aşı DNA'sının 10 dk sonra %20.9'u, bir saat sonra %34'ü, bir gün sonra %86'sı ve bir hafta sonra ise %97.8'si kan dolaşımında degradasyona uğramaktadır. Ancak hücre çekirdeğine giren plazmidlerin sayısını ve çekirdeğe girmeden önce ne kadarının degrade olduğunu belirlemek zordur (25). Plazmid DNA'sının %90'dan fazlasının sitoplazmaya hiç ulaşmadığı ve sitoplazmadaki plazmidlerin yalnızca %0.1'inin eksprese edildiği çekirdeğe ulaştığı tahmin edilmektedir (26). Capecchi *ve ark.* (1980) yaptıkları çalışmaya göre plazmid DNA'sının çekirdeğe mikroyenjeksiyonu, gen aktarılan hücrelerin %50-100 oranında geni eksprese etmesini sağlarken sitoplazmaya yapılacak enjeksiyonda bu oran %0.01'den küçük bulunmuştur (27). Bu bilgilere göre kas içi gönderilen plazmid DNA'sı çeşitli sebeplerle hücreler arası boşlukta veya sitoplazmada degrade olabilmekte ve bunun sonucunda da plazmid çekirdeğe ulaşmadığı için mRNA sentezi gerçekleşmemektedir. Aşılama sonrası transfekte hücrelerde antijen üretiminin azalmasına bağlı olarak ortaya çıkacak immun yanıt da daha düşük seviyeli olmaktadır. Bu sebeple DNA aşısının etkinliğini artırmak için transfer sistemleri tercih edilebilmektedir (4).

Fiziksel DNA transfer sistemlerini; altın partikül aracılı bombardıman, elektroporasyon, jet enjeksiyon ve dövmeleme yöntemi oluşturmaktadır (28).

Partikül aracılı epidermal transfer (PMED) veya bombardıman mevcut gen tabancası teknolojisinin ticari adıdır. Bu sistemde altın partikülleri DNA aşısı plazmidleri ile kaplanmakta ve bu partiküller sıkıştırılmış helyum aracılığıyla iğnesiz şekilde derinin epidermal katmanına transfer edilmektedir (24, 29).

Yüksek basınç aracılı transfer veya jet enjeksiyon partikül bombardımanına benzer konsepttedir. Bu amaçla üretilen biojektör cihazları sıvıyı dar bir ağızdan zorlayarak yüksek basınçlı bir akış oluşturmakta ve deriye nüfuz eden aşılamaı gerçekleştirmektedir (30).

Gen tabancası plazmid DNA'ların direk olarak hücre sitoplazmasına girmesine izin vermekte ve bu sebeple aşısı etkinliğini fazlasıyla artırmaktadır. Farelerde yapılan bir çalışmanın sonucuna göre antikor veya sitotoksik T yanıtı uyarmak için gerekli çıplak plazmid DNA miktarı 10-100 µg olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada plazmidlerin gen tabancası ile verilmesiyle bu miktar 0.1-1 µg seviyesine kadar düşmüş ve daha iyi sonuçlar alınabilmektedir. Bu transfer sistemi kullanılarak küçük hayvan deneylerinde güçlü immun yanıt alınmış ve daha büyük modellerde ve insanlarda özellikle influenza, hepatit B ve malaryaya karşı umut vaat eden sonuçlar ortaya çıkmıştır (24).

Elektroporasyon (EP) işlemi iki şekilde aşılama etkinliğini değiştirebilmektedir: i) Hücre membranlarına kısa elektrik akımı uygulaması hücre membranında geçici porlar oluşturmakta ve hücreye plazmidlerin girişini kolaylaştırmaktadır. ii) Elektroporasyon uygulaması ile ortaya çıkan doku hasarı

yangıya sebep olmakta ve DH'ler makrofajlar ve lenfositlerin enjeksiyon bölgesine akın etmesini sağlayabilmektedir (24, 29). Ayrıca EP uygulaması ASH'ler dahil birçok hücrenin transfeksiyonunu artırmaktadır (24).

Kimyasal yaklaşımlarda, gen iletimi için taşıyıcı olarak sentetik veya doğal bileşikler kullanılmaktadır. Bu sistemler çok güvenli ve oldukça etkili görünmektedir. En çok çalışılan strateji, katyonik polimer (poli laktik-ko-glikolik asit, PLGA) ve katyonik lipidlerin (lipozom) kullanımındır. Bu bileşenlerin DNA'nın serum proteinleri tarafından degrade olmasını önlediği gösterilmiştir. Ayrıca aşı nanopartiküllerinin belli aralıklarla degradasyona uğrayan PLGA gibi katyonik polimerlere yerleştirilerek kullanılması ile tek enjeksiyonda çoklu doz aşılama yapılabilir (22, 23).

Lipozomlar, fosfolipid bilayer yapıdan ibaret sentetik veziküllerdir ve şimdilerde hücreye gen transferinde kullanılan en önemli tekniklerden biridir. İçerisinde DNA bulunduran lipozomlar transfer sonrası hücre membranlarından kolayca geçmekte ve endozom membranları ile kaynaşmanın ardından DNA içeriğini serbest bırakmaktadır. Aynı zamanda endozomlardan hızla kaçan lipozomlar bu yolla degradasyondan korunmaktadır. Böylece ekspresyonu artırarak immunojeniteyi desteklemektedir (12, 22). Lipozom formülasyonlarının farelerde hem hücresel hem de humoral immün yanıtı artırdığına dair deliller mevcuttur. Lipozom formülizasyonu plazmidlerin dış şartlara daha dayanıklı hale gelmesini sağlamak ve böylece aşılarda oral, nazal, damar içi, kas içi, deri altı yollar ile verilen immunojenler olarak değerlendirilebilmektedir. Mukozal bölgelere lipozomlar ile immunojenin verilmesi mukozal immün yanıtın uyarımını kolaylaştırmaktadır. Bir çalışmada intranasal olarak verilen çıplak plazmid

DNA'sının koruyucu immun yanıt oluşturmadağını lipozom plazmid DNA kompleksinin verilmesinin ise güçlü IgA antikoru uyardığını ve çelınca karşı koruma sağladığı belirtilmiştir (23).

Biyolojik transfer sistemleri (viral vektörler) rekombinant aşı teknolojisinde en sık kullanılan yaklaşım olmasına rağmen, bazı dezavantajları sebebiyle viral olmayan yaklaşımlar günümüzde daha popülerdir (12). Bu tür aşılarda dezavantajları ilerleyen bölümlerde daha geniş değerlendirilecektir. Mevcutta klinik olarak başvurulabilir olan vektör tipleri onkoretrovirüsler, lentivirüsler, adenovirüsler, adeno ilişkili virüsler, vaccinia virüs, VSV ve HSV-1 virüsleridir (12, 15).

3.1.3.3. Geleneksel Adjuvanlar ve İmmunostimulanlar

Geleneksel aşılarda geniş kullanım alanı bulan alüminyum hidroksit (Al(OH)₃) gibi adjuvan türevleri DNA aşılarında da denenmiş ancak arzulanan sonuçlar elde edilememiştir. Aşı etkinliğinin artırılmasında sitokinlere başvurulabilmektedir (29).

Sitokinler saf protein şeklinde aşıya dahil edilebileceği gibi, genetik kodlarının farklı plazmide veya aşısındaki hedef genler ile aynı plazmide aktarılması ile de aşıya dahil edilebilmektedir. Bu amaçla aşıda kemokin, sitokin veya kostimülatör moleküller tercih edilmektedir. Çalışmalar, granülosit-makrofaj koloni stimulan faktör (GM-CSF), IL-1 alfa, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinleri; IFN- γ , IL-2 ve IL-18 gibi Th1 sitokinleri; IL-4, IL-6 ve IL-10 gibi Th2 sitokinleri ve kemokin ligand-5 (CCL5) veya CCL21 gibi kemokinlerin kullanımı ile başlamış ve bunlara her geçen yıl yenileri eklenmiştir. Kostimulanların aşıya

dahil edilmesi ile edinsel yanıtın daha iyi uyarımı noktasında başarılı sonuçlar alınabilmektedir (15, 28, 29).

İnterlökin 12, Th-1 yanıtın güçlü bir uyarıcısıdır. Makaklarda test edilen HIV DNA aşısının IL-12 ilavesiyle birlikte hücresel yanıtı en az 2 kat ve hafıza yanıtı ise yaklaşık 10 kat daha fazla uyardığı görülmüştür. Diğer önemli sitokin, DH'ler gibi fagositik hücreler tarafından üretilen IL-15'dir. Bu sitokinlerin ekspresyonu hafıza CD8⁺ T hücreleri gelişimi ve devamlılığı için can alıcı öneme sahiptir (29).

Plazmid DNA'sına metillenmemiş CpG dinükleotidi gibi kısa immun stümülan DNA dizilerinin eklenmesi immunojeniteyi artırılabilir. Bakteri DNA'sında bulunan metillenmemiş sitozin-guanin motifi omurgalıların metillenmiş halde bulunmaktadır. Omurgalıların immun sisteminde metillenmemiş CpG motifi konakçı savunma mekanizmasını harekete geçiren alarm ve sinyal kodu olarak görev yapmaktadır. Böylece bu motif monosit makrofaj sistemini kolayca aktive etmekte ve IL-12, TNF- α , IFN- α ve IFN- β gibi çeşitli sitokinlerin indüksiyonu yoluyla IFN- γ üretimi ile ilişkili doğal katil hücresi aktivasyonuna yol açmaktadır. Benzer şekilde B hücre aktivasyonu ve Ig M üretimi de CpG motifi ile uyarılabilir (16, 31).

3.1.3.4. Ekspresyon Seviyesinin Artırılması

Ekspresyon vektörlerine aktarılan patojene ait genlerin memeli hücrelerinde optimal seviyede eksprese edilmesindeki önemli problemlerden biri de hiç şüphesiz patojenik mikroorganizma ve memelilerin kodon kullanımındaki farklılıklardır (12). Tüm yaşam aynı genetik kodları paylaşıyor olsa da, patojenler

ve organizmalar arasında kodonların kullanım sıklığı bakımından farklılıklar bulunabilmektedir. Bu belirli türlerin belirli kodonları daha az kullanıldığını gösterir ki bu durum translasyonun istenen seviyelere ulaşamamasına neden olmaktadır. Kodon optimizasyonu, proteinin orijinal amino asit dizisini değiştirmeksizin tRNA seviyesine göre konak kodon dizisine uyum sağlanmasından ibarettir. Ökaryotik hücrelerde daha fazla kullanılan tRNA'lara ait genetik kodların plazmid DNA'sında tercih edilmesi ile daha etkin biçimde protein sentezi gerçekleştirilebilmektedir. Antijenik dizilerin ekspresyonundaki bu artış, daha yüksek dozda antijen üretimi ve immunojenitenin artması ile sonuçlanmaktadır (12, 29).

Maksimum plazmid ekspresyonu için diğer gerekli adım mRNA optimizasyonudur. mRNA'nın transferini bozan ikincil RNA yapıları, yüksek guanin sitozin değerleri, kesim bölgeleri ve mRNA'nın erken tahribatına yol açan instabilite elementleri memeli ekspresyonuna kötü etki yaratabilmekte böylece immunojeniteyi sınırlayabilmektedir. Bu bölgelerin optimizasyonu ile daha etkin immun yanıt alınabilmektedir (29).

Benzer şekilde, DNA çekirdek hedefleme dizileri, enhancerlar, güçlü promotörler veya transkripsiyon transaktivatörlerin plazmide eklenmesi ile hücredeki hedef genin ekspresyon seviyesi etkili şekilde artırılabilir (12, 32).

Aşıların immunojenitesini artırmanın bir başka yolu da farklı tip aşıların peş peşe kullanımına dayanmaktadır (12). Bu denemelerden *DNA prime/vector boost konsepti* ilk olarak Hill ve ark. tarafından ortaya çıkarılmıştır (33). Bu

aşılama prosedüründe ilk doz DNA aşısı, destek doz olarak viral vektör tabanlı aşılar uygulanmaktadır. Böylece daha etkili ve güçlü immun yanıt alınabilmekte ve viral vektörlerin var olan antikordan etkilenme düzeyi en aza indirilmektedir. Yine bazı çalışmalarda ilk doz DNA aşısı ikinci doz adjuvanlı subunit aşısı veya inaktif aşılardan kullanımı da denenmiştir. Hücresel yanıtın uyarımında geleneksel kullanıma göre daha iyi neticeler alınmıştır (34).

3.1.4. Klinik Denemeler

İlk olarak 1993 yılında geliştirilen avian influenza virüs DNA aşısı (hemaglutinasyon geni taşıyan) kanatlılara uygulanmış ve bu aşı 17 tavuğun 16'sını yüksek patojenik virüsle yapılan deneysel enfeksiyondan korumayı başarmıştır. Bu gelişme umut verici olarak karşılanmış ve birçok patojene karşı DNA aşısı geliştirilmesi çalışmaları yapılmıştır (35). Diğer etkenlere karşı geliştirilen DNA aşıları hayal kırıklığı yaratsa da çeşitli yöntemlerle etkinliği artırma çalışmaları yeniden bu tür aşılardan üzerine dikkatleri çekmeyi başarmıştır. <https://clinicaltrials.gov/> internet adresinde beşeri tıpta şu ana kadar yapılan DNA aşı deneyleri, aşı formülasyonları ve deney sonuçları bulunmaktadır.

Veteriner hekimlik alanında da beşeri tıpta olduğu gibi birçok DNA aşı deneyleri yapılmıştır. Bunyavirüs (Kırım-Kongo kanamalı ateşi virüsü), parvovirüs, flavivirüs (sığır viral diyare virüs), retrovirüsler (reticuloendotheliosis virus, avian leukosis virus), herpesvirüsler (yalancı kuduz virüsü, Marek hastalığı virüsü, enfeksiyöz laringotrakeitis virüs, enfeksiyöz sığır rhinotrakeitis virüs, paramikzovirüsler (Rift vadisi humması virüsü, respiratorik sinsityal virüs, köpek gençlik hastalığı virüsü, küçük ruminant vebası virüsü, Newcastle hastalığı virüsü

(NDV)), pikornavirüsler (şap virüsü), rhabdovirüsler (veziküler stomatit virüsü (VSV), kuduz virüsü (RABV), enfeksiyöz hematopoetik nekrozis virüsü-IHNV gibi), ortomikzovirüsler (kuş gribi virüsü, domuz gribi virüsü) bu viral etkenlerden bazılarıdır (3, 36). Günümüze kadar lisans verilmiş DNA aşıları Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Lisanslı DNA aşıları (12)

Tip	Türler	Hedef	Ürün/Firma	Lisans tarihi/ Ülke/veriliş yolu	Etkisi
Proflaktik Aşı	At	Batı Nil V.	WestNile Innovator®/ FortDodge Animal Health	2005/USA/im	Koruyucu düzeyde antikor yanıt
Proflaktik Aşı	Somon Balığı	IHNV	Apex IHN®/Novartis Animal Health	2005/Canada/im	Doğal ve edinsel immün yanıt
Kanser İmmunterapi	Köpek	Melanoma	Oncept™ /Merial	2010/USA/ id-iğnesiz enj.	Hastalığın gelişimini önleyici, yaşama süresini arttırıcı antikor yanıt
Gen Terapi	Domuz	GHRH	LifeTide® SW5/VGX™ Animal Health	2008/ Avustralya/ EP+im	Artan produktivite ve azalan mortalite

3.1.4.1.Rhabdovirüs Rekombinant Aşı Denemeleri

Kuduz virüsüne karşı bugüne kadar birçok rekombinant aşı denemesi yapılmıştır. Maruziyet öncesi DNA aşıları maruziyet sonrası aşılarla göre daha iyi sonuçlar vermektedir. Çünkü antikor yanıtın istenen seviyeye ulaşması için yeterli zaman aralığı bulunmaktadır. DNA aşılamaalarında antikor yanıt geleneksel aşılarla göre daha geç ortaya çıktığından maruziyet sonrası aşılamaalarda başarısız sonuçlar alınabilmektedir. Nötralizan antikor üretiminin başlamasını hızlandırmak için farklı yaklaşımlar kullanılmış ve aşılama için kulak kepçesinin önemli bir bölge olduğu gösterilmiştir. Bu bölgeye yapılan enjeksiyon kas veya deriye göre çok daha güçlü ve hızlı antikor yanıt oluşturabilmiştir. Enjeksiyon bölgesi yakınlarında superfisial cervical lenf yumruları bulunması sebebiyle tek dozluk aşılama sonrasında altı gün gibi erken sürede sitotoksik T hücre yanıtı alınmış ve destek dozlar ile hücresel ve humoral yanıtta artış görülmüştür (37).

Kuduz etkenine karşı hazırlanan DNA aşılarında genel olarak nötralizan antikorların şekillendiği glikoprotein (G) hedef alınmış, ilk aşı denemelerinde dahi fare ve insan dışındaki primatlarda başarılı sonuçlar elde edilebilmiştir (37, 38).

Fekadu ve ark. (1992) farklı bir çalışma yaparak kuduz virüsü (RABV) glikoprotein, nükleoprotein (N) veya her ikisini eksprese eden rekombinant vaccinia virüs ile köpekleri aşılamıştır. Rekombinant G ve G-N aşısı ile aşılanan köpeklerde nötralizan antikor yanıt gelişmiş ve hayvanlar deneysel enfeksiyondan korunmuştur. Yalnızca RABV N aşısı uygulanan köpeklerde nötralizan yanıt oluşmamasına karşın yedi köpekten ikisi hastalıktan korunmuştur. Üç köpek ise

destek tedavi yapılmaksızın iyileşme göstermiştir. Böylece N proteinin kuduzla karşı hem korumayı hem de iyileşmeyi sağladığı bildirilmiştir (39).

Yuan *ve ark.* (2008) RABV G proteini eksprese eden rekombinant yalancı kuduz aşısını köpeklerle oral ve kas içi yollarla uygulamış ve tek doz uygulamada dahi her iki etkene karşı koruyucu yanıt sağlamayı başarmıştır. Antikor varlığının altı aydan fazla süre devam ettiğini bildirmişlerdir (40).

Cruz *ve ark.* (2008) maruziyet sonrası profilakside kuduz G geni taşıyan DNA aşısını intranasal yolla dört doz uygulamış (0., 3., 7., 14. gün) ve kas içi uyguladığı ticari aşı ile etkisini kıyaslamıştır. DNA aşısı uygulanan fare ve tavşanların tamamı hastalıktan korunurken kas içi verilen inaktif ticari aşı ise hayvanların tamamını korumada başarısız olmuştur. Aşılamadan 72 saat sonra glial ve endotel hücrelerde G protein ekspresyonu gösterilmiştir. DNA aşısı ticari aşıya göre sistemik ve mukozal yanıt oluşturma, enjeksiyona gerek duymama, düşük doz (100 µg) uygulanabilmesi yönünden avantajlı bulunmuştur (41).

Rhabdovirüs sınıfındaki VSV'ye karşı kullanılmak üzere hazırlanan VSV G proteini kodlayan DNA aşısı fare, buzağı ve atlarda test edilmiştir. Çeşitli formülasyonlar ve enjeksiyon yollarının denendiği bu çalışmada aşının nötralizan antikor üretimini uyardığı bildirilmiştir (42).

Yine bir rhabdovirüs olan IHNV'ye karşı geliştirilen IHNV G protein geni taşıyan DNA aşısının balıklarda etkili koruma sağladığı ve güvenli olduğu ispatlanmıştır. Kanada Gıda Denetim Ajansı tarafından lisans verilen bu aşı çeşitli ülkelerde kullanıma sunulmuştur (4, 12, 30).

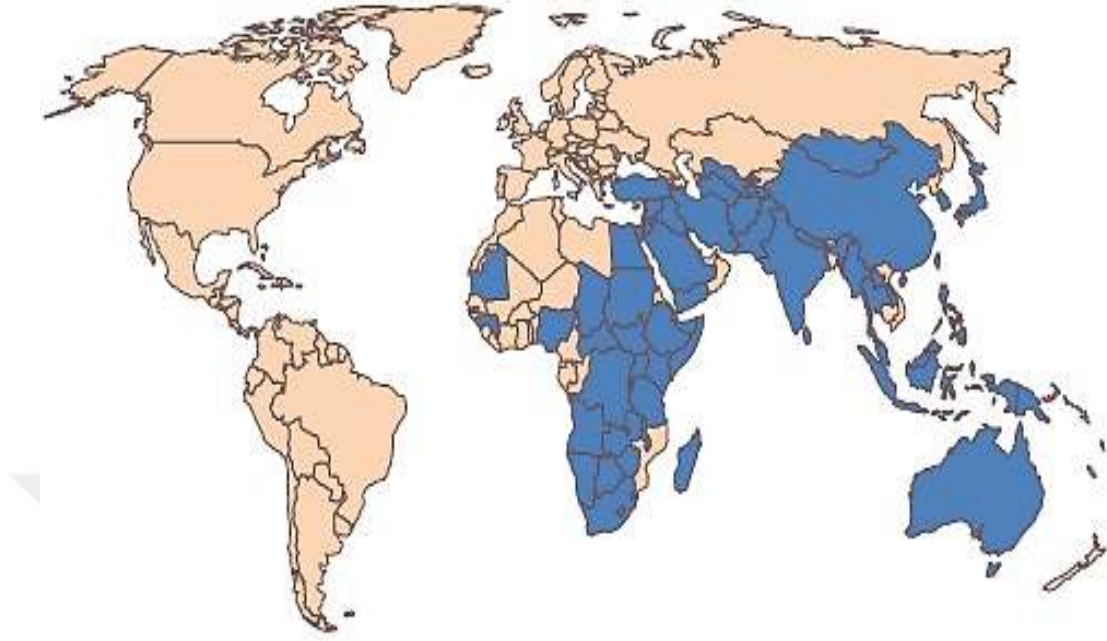
3.2. Bovine Ephemeral Fever Virüs ve Hastalığı

3.2.1. Kökeni ve Dünya Üzerindeki Dağılımı

Bovine ephemeral fever (BEF)'in eski çağ hastalıklarından biri olduğuna ve Asya ile Afrika'daki birçok bölgede endemik salgınlarla varlığını devam ettirdiğine inanılmaktadır (43).

Afrika'daki hastalığın ilk tanımlaması Scweinfurth tarafından (1878) yapılmıştır. Piot'un (1895) Mısır'da ortaya çıkan salgını detaylı olarak anlatması ilk bilimsel rapor niteliği taşımaktadır. Piot, bu hastalığı insanlardaki *Dengue fever*'a benzer bulgu göstermesinden dolayı *sığırların epizootik dengue fever*'i olarak isimlendirmiştir (44). Aynı hastalık farklı bölgelerde *üç gün hastalığı*, *stiff sickness*, *bovine epizootik fever* ve *lazy man's disease* olarak da adlandırılabilir (6). Bevan (1907), Zimbabwe'de hastalığın varlığını bildirmiş ve enfekte hayvanlardan aldığı kanı sağlıklı hayvanlara vererek ilk deneysel bulaşmayı da gerçekleştirmiştir (43, 44, 45). Hastalık daha sonra Nijerya, Kenya, G. Afrika, Endonezya, Hindistan, Mısır, Filistin, Avustralya ve Japonya'da (1949) rapor edilmiştir (6, 43). Hastalığın Güneydoğu Asya boyunca, Avustralya'dan Japonya'ya ve Afrika kıtasından Orta Doğu'ya kadar varlığı bilinmekle birlikte şu ana kadar Pasifik adaları, Avrupa (Türkiye'nin Trakya bölgesi hariç) ve Amerika'da bildirimi yapılmamıştır. Hastalığın 38° Kuzey – 36° Güney paraleli ötesine geçmediği tahmin edilmektedir (46).

BEF'in rapor edildiği ülkeler dünya haritası üzerinde Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. BEF'in tarihsel olarak rapor edildiği veya bilindiği ülkeler (Mavi renk ile gösterilmiştir) (46)

Bovine ephemeral fever virüs Uzak Doğu, Orta Doğu ve Avustralya olmak üzere üç filogenetik soya (genotipe) bölünebilmektedir. Son yapılan çalışmalarda Uzak Doğu soyunun Orta Doğu ve Avustralya soyları arasındaki homolog rekombinasyondan (BEFV G protein-füzyon bölgesinde) köken aldığına dair deliller mevcuttur. Homolog rekombinasyonun gerçekleşme tarihinin 1940'larda olduğu tahmin edilmektedir. Homolog rekombinasyon ve Bayes tahminine göre üç BEFV soyu Afrika'dan köken almakta ve Orta Doğu aracılığıyla Asya ve Avustralya'ya yayılmış olabileceği düşünülmektedir. Orta Doğudaki ilk bildirimler Filistin (1934) ve Doğu Asya'daki Çin (1934) salgınlarına aittir. Bu

veriler homolog rekombinasyon olayından önce diğer suşların bölgede olduğu ve sonrasında Uzak Doğu rekombinant suşun baskın hale geçtiğini göstermektedir. Rekombinasyon sonrası virüs çok daha güçlü adaptasyon kabiliyeti kazanmış olabileceği ihtimaller dahilindedir. Bu durum orijinal virüsün Doğu Asya'daki diğer suşlara karşı avantajlı bir evrim geçirdiğini göstermektedir. BEFV yaklaşık 1936'da Endonezya takımadaları vasıtasıyla Avustralya'ya giriş yapmıştır. Avustralya soyları Orta Doğu'yu terk etmeden önce en az iki kardeş gruba ayrılmış olduğu birinin muhtemelen doğuya doğru ve daha sonra güneye göç ederek 1936'da Avustralya'ya ulaştığı, diğerinin ise mevcut Orta Doğu soyu ile rekombinant Uzak Doğu soyunu ortaya çıkarmış olabileceği düşünülmektedir (47).

Mevcut BEFV'nin muhtemel kökeni ve yayılma yolu Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Mevcut BEFV'nin muhtemel kökeni ve yayılma yolu. Ata Afrika soyu *sarı renkle* gösterilmiştir. Mevcut üç soy ve yayılma yönleri farklı renklerle gösterilmiştir. Koyu alanlar epidemik olmayan en açık kısımlar ise mevcut virüs izolatlarını belirtmektedir. *Kırmızı:* Orta Doğu, *Yeşil* Orta Asya, *Siyah:* Avusturalya. *Kesikli ok:* Avusturalya soyuna ait alt soylar. Zaman bölgede çıkan ilk salgınları belirtmektedir. *Parentez içerisindeki iki zaman noktası* mevcut soyların ayrılma zamanını veya rekombinasyon zamanını göstermektedir (47)

3.2.2. Hastalığın Türkiye'deki Durumu

Türkiye'de ilk BEF salgını (1985) İç Anadolu, Güney ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde ortaya çıkmıştır. Türkiye'de ilk BEF raporu Girgin *ve ark.* tarafından (1986) karakteristik bulgular (kısa süreli olması, çift veya çok fazlı ateşle seyretmesi gibi) dikkate alınarak gerçekleştirilmiş ve daha sonra çeşitli serolojik ve moleküler testler ile doğrulanmıştır. BEF'in Türkiye'deki bu

bildirimlerinin ardından 4-5 yıl aralıklarla 1999, 2003, 2008 ve 2012 yıllarında yeni salgınlar ortaya çıkmıştır (46, 48).

Mellor *ve ark.* (1995) ELISA kullanarak yaptıkları çalışmada Türkiye'nin güney, güneydoğu ve batı illerindeki sığırlarda BEFV enfeksiyonunun seroprevalansını sırasıyla %2.3, %12.3 ve %9.2 olarak rapor etmişlerdir (49).

Türkiye'nin Avrupa kıtasındaki (Trakya) 21 farklı odakta toplanan (n:557) sığır serumunda BEF araştırılmış ve şehir bazında seroprevalansının %2.5 ile %15.3 arasında değiştiği tespit edilmiştir. En yüksek seroprevalans Edirne ilinde (%15.3) bulunmuş ve bunu sırasıyla Kırklareli (%13), Tekirdağ (%6.6), İstanbul (%2.8) ve Çanakkale (%2.5) illeri takip etmiştir. Genel olarak bölgedeki BEF seroprevalansı %8.04 olarak bulunmuştur (50).

Tonbak *ve ark.* (2013) hastalığın görülme zamanı olan Eylül-Kasım aylarında Adana, Adıyaman, Diyarbakır, Elazığ, Gaziantep, Hatay, Kahramanmaraş, Malatya, Mardin ve Şanlıurfa illerindeki sığırlardan 2006-2007 ve 2008 yıllarında örnekleme yapmış ve salgının görülmediği 2006 ve 2007 yıllarında toplanan kan ve serumlarda pozitiflik belirleyememiştir. Salgının çıktığı 2008 yılında Adana, Adıyaman, Kahramanmaraş, Şanlıurfa ve Hatay illerindeki hayvanlarda antijen pozitifliğine rastlanmış toplamda bu oran %16.6 olarak hesaplanmıştır. Doğu Anadolu bölgesinde pozitiflik belirlenemezken, Akdeniz bölgesinde %22.8 Güneydoğu Anadolu'da %18.4 oranında antijen pozitifliği belirlenmiştir. Bu illere ilave olarak Gaziantep ve Osmaniye illerinde de hastalığın varlığı doğrulanmıştır (7).

Albayrak ve ark. (2010) Karadeniz bölgesinin bazı illerindeki (Samsun, Sinop, Ordu, Amasya, Tokat) sığırlardan yaptığı örneklemede Samsun'da %2.5, Sinop'da %37.5, Amasya'da %27.5 ve toplamda %13.5 oranında seropozitiflik tespit etmişlerdir (51).

Resmi ve resmi olmayan kaynaklara göre 2012 yazında Akdeniz, Doğu Anadolu, İç Anadolu, Güneydoğu Anadolu, Karadeniz ve Marmara bölgelerinde BEF rapor edilmiştir (52, 53). İlk vakalar Haziran 2012'de Orta Doğu'ya bitişik konumdaki illerden (Adana, Şanlıurfa ve Hatay) bildirilmiş daha sonraları benzer vakalar Temmuz-Ağustos aylarında farklı bölgelerden rapor edilmeye başlanmıştır. Tonbak ve ark. (2013) Adana, Urfa ve Sakarya illerinde hastalığın varlığını doğrulamıştır (53). Ayrıca bunlara ek olarak Osmaniye, Antalya, İzmir, Mersin ve Diyarbakır'ın BEFV'den etkilenen iller arasında olduğu rapor edilmiştir (48).

Aydın ve Muğla illerinden (2012) tesadüfi toplanan serum örneklerinde ise antikor varlığına rastlanmamıştır (52).

3.2.3. Sınıflandırma

Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesinin (ICTV) raporuna göre sınıflandırma hiyerarşisi Takım, Aile (alt aile), Cins ve Tür olarak tanımlanmıştır (54). Mononegavirales takımında *Rhabdoviridae*, *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Pneumoviridae* ve *Paramyxoviridae* ailesi bulunmaktadır. *Rhabdoviridae* ailesi 11 cins içermekte ve bunlara yeni cins önerileri yapılmaya devam etmektedir. Bu aile içerisinde sıcak kanlı hayvanlarda hastalık oluşturan virüsler Lyssavirus, Vesiculovirus ve Ephemerovirus cinsi içerisinde sınıflandırılmıştır. Aynı aile

içerisindeki Novirhabdovirus, Perhabdovirus ve Spirovirus cinsinde listelenmiş virüsler balıklarda hastalık oluşturmaktadır. Bu ailede Tupavirus domuz ve kuşlarda, Tibrovirus sivrisinek ve sağlıklı sığırlarda, Ledantevirus yarasa, insan ve rodentlerde, Cytorhabdovirus ve Nucleorhabdovirus bitkilerde, Sigmavirus insektlerde identifiye edilen, insan ve hayvanlar için önem arz etmeyen diğer rhabdovirüs cinslerini teşkil etmektedir (55).

Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi 2015 yılı raporuna göre Ephemerovirus genusunda Adelaide river ephemerovirus (ARV), bovine fever ephemerovirus, Berrimah ephemerovirus, Kimberley ephemerovirus, Koolpinyah ephemerovirus, Kotonkan ephemerovirus, Obodhiang ephemerovirus, Yata ephemerovirus türleri bulunmaktadır (56). Bu raporda Ephemerovirus cinsi içerisindeki türlerin isimlendirilmesinde değişiklikler olsa da güncel literatürde halen kullanıma geçmemiştir.

Ephemerovirus cinsinde yer alan üyelerin çapraz koruma özelliği çok kısıtlı olmasına rağmen komplement fiksasyon ve indirek immun florasan (IFA) testlerinde çapraz reaksiyon oldukça yüksektir. Bu cins içerisindeki virüsler genom organizasyonları Gns (non-structural G) geni, aksesör protein genleri veya transkripsiyonel kontrol dizilerindeki farklılık dışında genel olarak benzerdir ve farklı türler arasında N protein amino asit dizilimleri %91'e kadar benzerlik gösterebilmektedir (57).

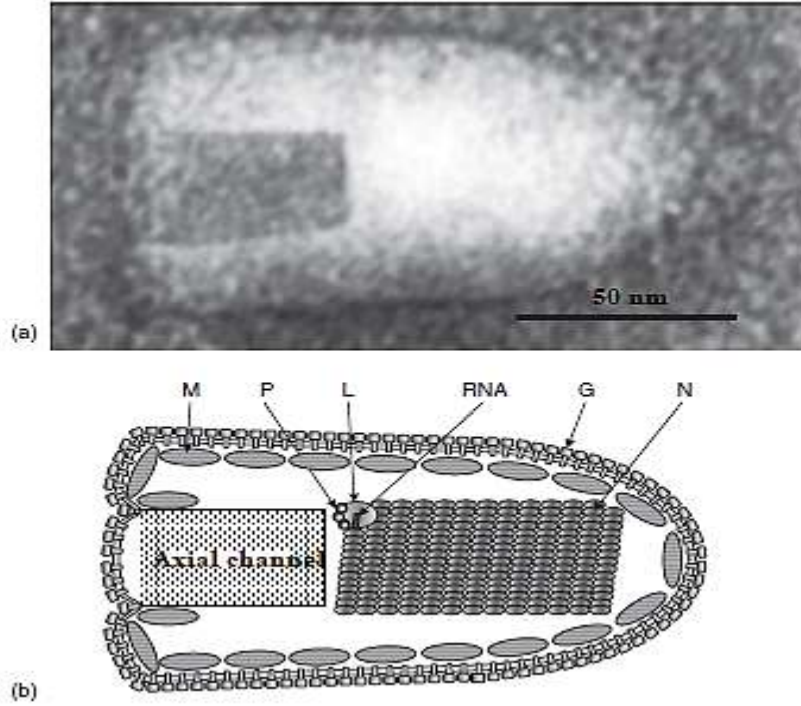
Berrimah virüs (BRMV), Adelaide river virüs (ARV) ve Koolpinyah virüsten (KOOLV) her biri Avustralya'da sağlıklı sığırlardan izole edilmiştir. Kimberley virüs (KIMV) Avustralya'daki sağlıklı sığır yanında mosquitos (*Culex*

annulirostris) ve *Culicoides* türü sineklerden (*Culicoides brevitarsis*) izole edilmiştir. Obodhiang virüs (OBOV) ve Yata virüs (YATV) Afrika'daki, Puchong virüs (PUCV) ise Malezya'daki *Mansonia uniformis* türü mosquitoslardan izole edilmiştir. Yalnızca BEFV sığırlarda hastalıkla ilişkilendirilmesine rağmen Nijerya'daki *Culicoides* türlerinden izole edilen Kotonkan virüs (KOTV) BEFV benzeri hastalık tablosu oluşturmasıyla bilinmektedir. KOTV ve OBOV N ve L genlerinin filogenetik analizi sonrası Ephemerovirus cinsine dahil edilmişlerdir (58, 59).

3.2.4. Yapı ve Viral Genom Özellikleri

Bovine ephemeral fever virüs, mermi çekirdeğini anımsatan görüntüsüyle tipik rhabdovirüs morfolojisi göstermektedir. Virionlar ($\sim 185 \text{ nm} \times \sim 75 \text{ nm}$) aynı ailedeki veziküler stomatitis virüs ve kuduz virüsüne nazaran daha konik biçime sahiptir. Helikal nükleokapsid yapıları; negatif anlamlı tek zincirli RNA'yı sıkı sıkıya saran ve aynı zamanda ribonükleoprotein kompleksin (RNP) bir parçası olan fosfoprotein (P protein) (43 kDa) ve çok fonksiyonlu enzim viral RNA polimeraz (Large protein; L protein) (180 kDa) ile ilişkili haldeki nükleoproteinden (N protein) (52 kDa) ibarettir. Nükleokapsitler matriks proteine (M protein) (29 kDa) ek olarak transmembran glikoproteini (G protein) (81 kDa) taşıyan bir hücresel membranla kaplanmıştır (46).

BEFV virion yapısı Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. BEFV virion yapısı a) Pürifiye Bovine ephemeral fever virüs negatif kontrast elektron mikroskop görüntüsü b) N, P, M, G, L yapısal proteinleri, (-) ss RNA genomu ve Aksiyel kanalın şematize görüntüsü (58)

BEFV Avustralya ve Japonya izolatlarının morfolojileri mermi çekirdeğini andırırsa da Güney Afrika izolatu koni biçimindedir. Morfolojik farklılık viral antijenite açısından herhangi bir farklılığa yol açmamaktadır (60).

Bovine ephemeral fever virüs 56°C’de 10 dakikada 37 °C’de 18 saatte ve oda ısısında 120 saatte inaktif hale geçmektedir. Virüs pH 5-9 değerinde bir saat enfektivitesini koruyabilmektedir. Düşük (2.5) ve yüksek (12.0) pH değerlerinde 10 dakikada inaktif hale geçebilmektedir. Formalin, lipid çözücü ve UV, gama veya X ışınlarına duyarlıdır. BEFV 0.22 µm büyüklüğündeki filtreden geçebilmektedir (6, 56, 61).

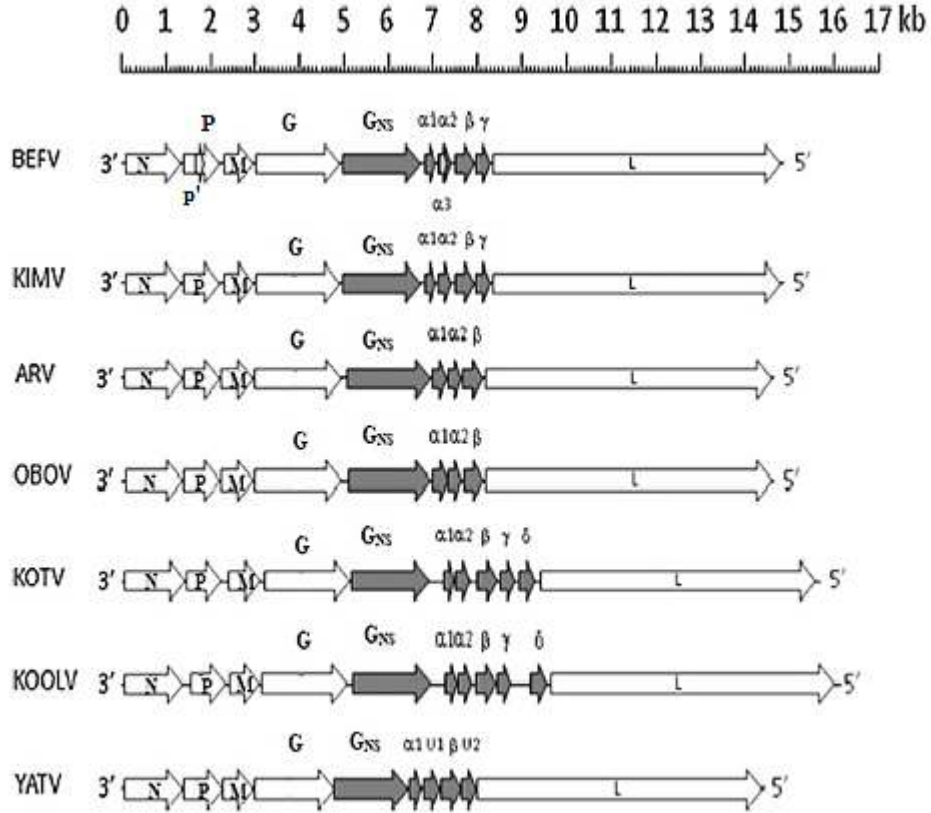
RNA virüsleri çoğalmaları esnasında virionun yaklaşık 1/3'ü uzunluğunda, tek başına enfektif olmayan, genomun bir kısmına sahip koni biçimli formları - *defektif interfere partikülleri*- oluşturabilmektedir. Helikal simetriye sahip virüslerin büyüklüğü genom uzunluğu ile doğru orantılı olacağından daha kısa genomlu virüsler de daha küçük yapıya sahip olabilmektedir. Bu partiküllerin varlığı ilk olarak von Magnus tarafından (1951) influenza virüslerde tespit edilmiş daha sonra bünyavirüs ve rhabdovirüsler (VSV, BEFV) gibi birçok virüste ortaya konmuştur. Bu partiküller, yapılarında viriona ait proteinlerin tamamını bulundurmasının yanında bu proteinlerin antijenite ve polipeptit yapıları da virion ile özdeşdir. Sadece homolog virüs varlığında çoğalma gösteren bu partiküller aynı zamanda homolog virüsün çoğalmasına da müdahale etmektedir. Plak testi yardımıyla bu partikülleri içermeyen virüs kolonilerinin elde edilmesi veya inokülümün dilüe edilerek bu partiküllerin miktarının eşik değerin altına düşürülmesiyle daha yüksek titrede virüs üretilenmektedir. Defektif partiküller homolog virüsün hücreye girişine herhangi bir müdahalede bulunmamaktadır (62, 63, 64).

Bovine ephemeral fever virüs, segmentsiz, tek iplikli (ss), negatif anlamlı (-) RNA genomuna sahiptir. Genom yapısı *Rhabdoviridae* ailesindeki diğer virüslere göre daha büyük ve karmaşıktır. Rhabdovirüslerin genel özelliklerini yansıtan 5 gen bölgesine (N-P-M-G-L) ilaveten G ve L genleri arasında yerleşim gösteren çoklu açık okuma bölgeleri (~3.4 kb) bulunmaktadır. Virüs genomu 14.900 nükleotit (nt) uzunluğunda olup, lider ve kuyruk (trailer) dizilimleri ile birlikte toplamda 12 adet gen bölgesi (3'-L-N-P-M-G-Gns- α 1- α 2- β - γ -L-t-5') içermektedir (46, 58, 65). Diğer rhabdovirüslere benzer şekilde transkripsiyon ve

replikasyonun başlamasında ve nükleoprotein kapsitlenmesinde önemli role sahip 3' lider (50 nt) ve 5' kuyruk (70 nt) dizilimlerini bulundurmaktadır. Bu dizilimler aralarında kısmi komplementer olup aynı zamanda RNA polimerazın genom veya antigenoma bağlanabilmesini sağlayan promotör görevindeki *cis*-elementlerini içermektedir (58, 59).

Her bir gen (α_1 hariç) konsensüs dizileri olarak kabul edilen transkripsiyon başlama dizilimi UUGUCC (mRNA: 5'-kep-AACAGG...) poliadenilasyon sinyali GUAC(U₇) ve bunlara ilaveten intergenik sekanslar (~26-53 nt) bulundurmaktadır (58, 66).

BEFV ve diğer ephemerovirüslerin genom organizasyonları Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. BEFV ve diğer ephemerovirüslerin (KIMV, ARV, OBOV, KOTV, KOOLV ve YATV) genom organizasyonu (59)

3.2.5. Proteinler ve Fonksiyonları

BEFV beş adet yapısal protein bir adet yapısal olmayan ve dört adet aksesuar proteinlerden oluşmaktadır (58).

Nükleoprotein geni, 431 amino asit (aa) uzunluğunda yüksek hidrofilik yapıda nükleoproteini (N) kodlamaktadır. Nükleoprotein fosforile halledir ve yüksek konsantre tuz ve deterjan ile muamele sonrasında dahi nükleokapsit yapısını sürdürmektedir. Her bir N proteini RNA'nın dokuz nükleotidini

kaplamaktadır. Bu protein genomik RNA'yı kapsitleştirerek RNAaz dirençli bir yapının oluşmasını ve transkripsiyon ile replikasyonda RNA'nın kalıp olarak kullanılabilmesini sağlamaktadır. Ayrıca N proteini, transkripsiyon aşamasından replikasyon aşamasına geçişi koordine etmektedir (6, 58, 67).

Fosfoprotein geni, 278 aa uzunluğunda yüksek hidrofilik yapıda fosfoprotein (P proteini) kodlamaktadır. Viral polimeraz kofaktörü olarak görev yapmaktadır. Esansiyel iki fonksiyonu bulunmaktadır bunlar: i) N-RNA şablonu üzerinde L proteinin doğru pozisyon almasına ve fiziksel bağlantıya aracılık etmek ii) Protein sentezi esnasında şaperon görevi üstlenerek N-P kompleksi oluşturmak ve N proteinin RNA'ya tutunmasını engellemektir. Replikasyon esnasında N proteinini bu kompleksten yeni oluşan RNA'ya aktarılmasında görev almaktadır (56, 58).

Matriks geni tarafından kodlanan matriks proteini (M protein) 691 aminoasitten oluşmaktadır. Matriks proteini virion içerisinde fosforile biçimdedir. Viral transkripsiyonun düzenlenmesi, konak hücre protein sentezinin durdurulması, apoptozisin uyarılması ve nükleokapsitin hücre membranından tomurcuklanması gibi önemli görevlere sahiptir (58).

Ephemerovirüsler, iki adet transmembran glikoproteini (Tip-1, G ve Gns) kodlayan büyük bir genomun yaygın olmayan özelliklerini paylaşmaktadır (68).

Glikoprotein geni tarafından 623 aa uzunluğunda transmembran glikoproteini (G protein) kodlanmaktadır. Glikoprotein glikozillenmemiş ağırlığı ~71 kDa'dur. Bu protein RABV ve VSV'de olduğu gibi non-iyonik (%1 Triton-X 100 v.s) deterjanlarla viriondan ayrılabilir. Glikoprotein trimer

yapıdadır ve kovalent olmayan bağlarla bir arada tutulan alt birimlerin (monomer) bir araya gelmesinden oluşmaktadır. Çoğu viral zarf proteinlerinden farklı olarak G protein, alt birimlerin hızla ayrışma ve birleşme özelliği göstermesi ile monomer ve trimer yapı arasında dinamik dengeye sahiptir. G protein, virüsün hedef reseptöre bağlanması ve viral zar ile endozom membranı arasındaki füzyon faaliyetinden sorumlu tek yüzey proteinidir. Hafif asidik pH'da füzyon faaliyetini uyarmaktadır (6, 57, 58, 66).

Yapısal olmayan G (non-structural G; Gns) geninin evrimleşme sürecinde G geninin duplikasyonu neticesinde ortaya çıktığına inanılmakta ve yapısal olarak (yüksek oranda korunmuş sistein, prolin ve glisin kalıntıları) G proteine benzerlik gösteren transmembran protein kodlamaktadır. Yapısal olmayan G proteinin moleküler ağırlığı glikozillenmiş durumda 90 kDa iken glikozillenmemiş durumda ise 68 kDa'a düşmektedir. Bu proteinin amino asit dizilimindeki bazı kısımlar G protein dizilimine homologluk arz etmektedir. (%19 özdeşlik, %36 benzerlik). Bu protein enfekte hücrelerde sentez edilip hücrel membran yüzeyinde sergilenmesine rağmen virionun yapısına katılmamakta ve fonksiyonu da bilinmemektedir (46, 58, 66, 68).

Glikoprotein ve Gns proteini yapısında sinyal bölgeleri, hidrofobik transmembran bölgeleri ve sekiz adet N-glikolizasyon bölgesi bulundurmasıyla rhabdovirüs yapısal karakterlerini taşımaktadır (66).

Yapısal olmayan G geni ile L geni arasında bulunan α_1 , α_2 , α_3 , β ve γ genleri sırasıyla α_1 (10.6 kDa), α_2 (13.2 kDa), α_3 (5.7 kDa) β (12.3 kDa) ve γ (13.5 kDa) aksesuar proteinleri kodlamaktadır. Gama geni (γ), β geninin

duplikasyonu neticesinde ortaya çıkmıştır (69). Bu proteinlerin hiçbirisi virion veya enfekte hücrede belirlenememiştir. Aksesuar proteinlerden $\alpha 1$ proteinin viroporin benzeri göreve sahip olduğu, golgi kompleksine yerleşim gösterdiği ve hücresel membranın geçirgenliğini artırarak sitopatik etkilere yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca importin β_1 ve 7 ile etkileşime girmektedir. Diğerlerinin ise fonksiyonları bilinmemektedir (58, 65, 70).

Large geni tarafından kodlanan large protein (L protein) 2144 aa uzunluğundadır. RNA sentezi ile ilişkili enzimatik aktiviteden sorumlu bir RNA bağımlı RNA polimerazdır. L protein N ve P proteinlerle birlikte viral genomun transkripsiyon ve replikasyonundan sorumlu ribonükleoprotein (RNP) kompleksi oluşturmaktadır. Large protein transkripsiyon esnasında mRNA'nın 5' ucuna kepeklenmesi, metilasyonu ve 3' ucun poliadenilasyonunu sağlamaktadır. Ayrıca protein kinaz faaliyeti bulunmaktadır (57, 58, 67).

3.2.6. Antijenik Özellikler, Genetik ve Antijenik Varyasyonlar

Nükleoprotein geni genomdan transkribe edilen ilk gen olduğundan rhabdovirüslerin birçoğunda dizilenmiş ve bu yüzden rhabdovirüsler arasında ve rhabdovirüsler ile diğer virüsler arasındaki genetik kıyaslama, evrim ve sınıflandırma çalışmalarında çok sık başvurulmuştur. Nükleoprotein dizileri, cinslerin her birinde ve tüm rhabdovirüslerde oldukça homologdur. Nükleoprotein korunmuş bölgelerini (119 amino asit) nispeten kullanarak evrensel bir rhabdovirüs filogenezi oluşturulabilmektedir (67, 71). Bovine ephemeral fever virüs N proteini üzerinde 12 adet epitopik bölge tanımlanmış ve bu bölgelerin bir kısmı RABV, VSV ve diğer ephemerovirüsler (KIMV, BERV gibi) ile çapraz

reaksiyon vermektedir. BEFV N proteinin hücresel immun yanıtın uyarılmasında önemli role sahip olduğu gösterilmiştir (72).

Komplement fiksasyon ve/veya indirek immunofloresan antikor testinde güçlü çapraz reaksiyon gösterme, nötralizasyon testinde düşük veya hiç reaksiyon vermeme, Gns genini yapısında bulundurma, aksesör genlerin sayısı, transkripsiyon kontrol dizilerinin yerleşimindeki varyasyonlar ile farklı genom organizasyon sergileme ve son olarak N protein aa diziliminin %91'e kadar benzer olması ephemerovirüs cinsinde yer alan mevcut türleri ayırma kriterleri olarak tanımlanmaktadır (56, 57, 73).

Glikoprotein nötralizan antikor üretimini uyaran tek virion proteinidir ve bu proteine karşı gelişen antikorların sığırları hastalıktan koruduğu gösterilmiştir (74). Bovine ephemeral fever virüs G proteinini üzerinde konformasyon bağımsız (linear) ve konformasyon bağımlı nötralizan ve nötralizan olmayan antijenik bölgeler bulunmaktadır (6). BEFV G proteinin yapısında 5 adet nötralizan antijenik bölge (G1, G2, G3a-G3b, G4) tanımlanmıştır. Glikoprotein 1 (G1) ve G4 epitopu linear iken G2 ve G3 epitopik bölgeleri ise konformasyonel bir yapı sergilemektedir. G1 epitopu (25 kDa) yalnızca BEFV'e özgüdür. G2, G3a-3b, G4 bölgeleri ise diğer ephemerovirüsler ile çapraz reaksiyon verebilmektedir. G4 epitopunun G proteinini üzerindeki yerleşimi halen bilinmemektedir (46, 65, 75, 76, 77, 78). Glikoprotein Gns protein ile benzer antijenik özelliklere sahip değildir ve nötralizan antikor oluşturmaz (8).

Bovine ephemeral fever virüsün dünya çapında tek serotipi bulunmasına rağmen farklı suşlar arasında antijenik değişimler olabilmektedir (79). BEFV'nin

G. Afrika, Nijerya, Avustralya, Japonya ve Çin izolatları ile kendi aralarında yapılan çapraz koruma deneyleri veya nötralizasyon testleri sonucunda önemli bir fark ortaya konulamamıştır. Ancak büyük nötralizasyon bölgelerine özgü monoklonal antikorların kullanıldığı daha sonraki çalışmalarda G1 ve G2 bölgesinin yüksek oranda korunmuş olduğu, konformasyonel G3 bölgesinin ise izolatlar arasında bazı farklılıklara sahip olduğu tespit edilmiştir (43). Avustralya'da yapılan çalışmalar, bir genelleme yapılamasa da 1973-74'ten sonraki BEFV izolatlarının G3a epitopundan yoksun olduğunu ve G3b bölgesindeki epitopun da zaman zaman kaybolduğunu göstermiştir (80). Bu sonuçlara göre, antijenik bölgenin tamamını içeren suşlar alttip-1; G3a epitopu eksik olanlar alttip-2; G3b epitopu eksik olanlar alttip-3; her ikisini de içermeyenler ise alttip-4 olarak sınıflandırılmıştır (46, 81). Avustralya'daki aşı suşları ile izolatlar arasında en az bir antijenik bölge farklılık göstermektedir (80).

BEFV G protein dış antijenik bölgesinin (G1, G2, G3-1527 nt) filogenetik analiz sonuçlarına göre dünyadaki BEFV izolatları üç ayrı soyda gruplandırılmaktadır. Bunlar, Avustralya izolatlarının yer aldığı tamamen farklı tek bir soy (lineage 1), İsrail ile bazı Türk izolatlarının yer aldığı Orta Doğu soyu (lineage 2) ve İran, Mısır, Çin, Japonya, Tayvan ve bazı Türkiye izolatları yer aldığı (lineage 3) Uzak Doğu soyu şeklinde gruplandırılmaktadır (46, 53, 82, 83). Afrika ve bazı Asya ülkelerine ait suşların dizileme verileri ise mevcut değildir (46).

3.2.7. Çoğalma Stratejisi

BEFV replikasyonu yeterince çalışılmamış olsa da genel çoğalma stratejisi diğer rhabdovirüslere benzerlik göstermektedir.

BEFV G yüzey proteini ile hücre reseptörlerine tutunmakta, klatrin aracılı ve dinamin-2 bağımlı endositoz aracılığıyla hücreye girmektedir. Endositoz aktivitesi pH'ya bağımlı şekilde gerçekleşmektedir (84). BEFV reseptöre bağlanma esnasında Cox-2'e bağımlı Src-JNK-AP1'i ve cAMP bağımsız PI3K-Akt-NF-κB'yi aktiveleştirerek, klatrin ve dinamin ekspresyonunu uyarıcı etkide bulunmaktadır. Aynı zamanda Cox-2 aracılı PGE2/EP reseptör sinyalleri ile bu uyarımları daha güçlü kılar ve hücreye girişini kolaylaştırmaktadır (85). Rab5 ve Rab7'nin de enfeksiyon gelişimi için gerekli olduğu bildirilmiştir (84). Endositik veziküller erken endozomları oluşturmak için klatrin örtüyü kaybetmektedir. Erken endozom içeriği degradasyon için geç endozomlara ve lizozomlara taşınmaktadır. Bu süreç esnasında endozomal veziküller genellikle çoklu intraluminal veziküller oluşturmak için invagine olmaktadır. Virion endositik yolak boyunca ilerleme gösterirken, düşük pH'a maruz kalır ve pH 6.5'in aşağısında G protein endozom zar ile viral zarın füzyonunu gerçekleştirmektedir. Bu füzyon olayı ile sitoplazmaya virion içi komponentler bırakılmaktadır. Sitoplazmaya salınmayan viral proteinler ise proteaz ve diğer lizozomal enzimler ile degrade olmaktadır. Viral M proteini bu salınma sonrasında nükleokapsit ile bağını kopararak viral RNA'nın transkripsiyona açık hale gelmesini sağlamaktadır (57).

Transkripsiyon işlemi parenteral genomun 3' ucundaki tek promotöre RNA polimerazın bağlanması ile başlamaktadır. RNA polimeraz viral RNA boyunca ilerlemekte her bir gen sınırında transkripsiyonu başlatma ve durdurma sinyalleri ile karşılaşmaktadır. Oluşan transkriptler bir taraftan serbest kalırken diğer taraftan aynı polimeraz molekülü her bir gen bağlantısını geçerek transkripsiyon işlemine devam etmektedir. Böylece RNA polimeraz her bir transkripsiyonda 5' ucuna kep yapısı eklenmiş, metillenmiş ve 3' ucuna poliA yapısı eklenmiş mRNA'ları oluşturmaktadır (67). Zayıflatılmış transkripsiyon, dur-başla transkripsiyon veya kesikli transkripsiyon olarak da adlandırılan bu adımda 3' uca yakın genler daha çok transkribe olmakta ve böylece fazla kullanılan proteinler (yapısal) daha çok sentezlenmektedir (55). BEFV transkripsiyonu sonrasında yalnızca monosistronik değil aynı zamanda α ($\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$) polisistronik ve β - γ bisistronik mRNA'lar da belirlenmiştir (43, 58, 69). Fosfoprotein geni ve $\alpha 2$ genleri içerisinde örtüşen genler ve farklı okuma çerçeveleri tespit edilse de oluşan transkriptlerden fonksiyonel bir protein sentezinin gerçekleşip gerçekleşmediği bilinmemektedir (46).

Yeterli miktarda protein sentezi sonrasında transkripsiyon aşamasından pozitif anlamlı anti-genomların sentezine geçiş başlamaktadır. Antigenomun 3' ucundaki promotöre bağlanan RNA polimeraz negatif anlamlı genomik RNA'yı veya ikinci transkripsiyon için kalıp RNA'yı sentezlemektedir. Transkripsiyon ile replikasyonu gerçekleştiren kompleks yapısal olarak farklılık arz etmektedir. Özellikle L-N-P kompleksi replikaz, L-P kompleksi ise transkriptaz şeklinde hareket etmektedir (57).

Glikoprotein translasyon esnasında glikolize olmakta ve glikolize hale geçtikten sonra golgi membranındaki enzimler ile modifikasyona uğrayarak hücre zarının bazolateralinde sergilenmektedir. Matriks protein ise hücre zarının sitoplazmik yüzeyi ile ilişkili halde kalmakta ve nükleokapsitle montajı takiben tomurcuklanma ile virüs salınımı gerçekleşmektedir (57).

3.2.8. Bovine Ephemeral Fever Patogenez, Seroloji ve Patolojisi

Bovine ephemeral fever önemli doku hasarına yol açmayan, yangı temelli bir hastalıktır. Hastalığın öncelikle vasküler geçirgenliğe ve ilişkili yangısal yanıtta kaynaklanan sitokin fırtınasına bağlı olduğu bildirilmektedir (6, 46). BEF'teki gerek yangısal yanıtın gerekse klinik bulguların virüsün yarattığı interferon toksisitesi neticesinde oluşabileceğine dair görüşler mevcuttur. Bu görüşün çıkış noktası enfeksiyon esnasında serumda ortaya çıkan yüksek interferon seviyesine dayanmaktadır (86).

Mackerras ve ark. lökosit fraksiyonları ile viral etkenin ilişkisini ortaya çıkarmış ve Thedoridis (1969) ise enfekte hayvanların lökositlerinde BEFV'e karşı florasan yanıt alarak etkenin nötrofillerde çoğalabileceği görüşünü desteklemiştir. Bir çalışmada inek memesinden türetilen nötrofiller atlarda karşı reaksiyon oluşturma amacıyla verilmiş ve sonrasında toplanarak buzağılardaki nötrofilleri bağlaması için kullanılmıştır. Nötrofilleri bağlanan buzağıda deneysel enfeksiyon sonrasında ne hastalık gelişmiş ne de nötralizan yanıt oluşmuştur. Sadece vireminin gösterildiği bu hayvanlar nötrofillerin normal seviyeye döndüğü anda ikinci kez etkene maruz bırakılmış ve hastalık oluşturulabilmiştir. Bu

Çalışma, BEFV patogenezinde n6trofillerin 6nemli rol oynadığını ortaya çıkarmıştır (87, 88).

Lorber ve ark. (1971) ateşli hastalıklarda yanıtın v6cutta dolaşan l6kositlerden salınan pirojenlerle orantılı olduğunu ve pirojenlerin ise karaciğer tarafından temizlendiğini belirtmiştir. BEF'deki hematolojik değişiklikler ve kısa s6reli ateş d6ř6n6ld6đ6nde, bu durum BEFV'nin l6kosit ve pirojen miktarının hızla 6st seviyeye çıkardığı ancak karaciğer hasarının minimal seviyede olması nedeniyle pirojenlerin kısa s6rede kandan temizlendiği ve ateşin d6řt6đ6 şeklinde yorumlanabilmektedir (89).

Bovine ephemeral fever ink6basyon periyodu 2-4 g6n arasında değişmektedir. Viremi aşaması 1-3 g6n devam etmektedir ve ateşin ortaya çıkışından 24 saat 6nce vir6s kanda y6ksek titrede bulunmaktadır (58). Bovine ephemeral fever 24-48 saat devam eden çift fazlı ya da çok fazlı ateşle karakterizedir (90). İlk fazdaki ateş genellikle tespit edilemez ve son faza g6re daha d6ř6kt6r (6). Ateşin pik d6zeye ulaşmasıyla 6rt6şen n6trofilik l6kositoz durumu BEF için karakteristiktir ve 4-5 g6n içerisinde n6tralizan antikorlar kanda belirlenebilmektedir (90, 91). N6tralizan antikorlar yaklaşık 10. g6nde en 6st seviyeye çıkmaktadır. Klinik bulguların başlangıcında n6trofil miktarı beş kat artış g6sterirken (12.5×10^9) buna lenfosit oranındaki %30-40 d6zeyinde azalma (lenfopeni) ($5-7 \times 10^9$) (91, 92) ve eosinopeni eşlik etmektedir (90). Plazma fibrinojen miktarı 3-4 kat artabilmekte (18 g/l) ve klinik bulguların başlamasından iki g6n sonra pik d6zeye ulaşarak 1-2 hafta içerisinde normal seviyeye d6nmektedir (90, 92).

Ateşli faz esnasında serum Ca miktarında geçici azalma (hipokalsemi) (ciddi vakalarda 2.55 mmol/L'den 1.95 mmol/L kadar) görülmektedir (90, 92). Hipokalsemi neticesinde klinik bulgular süt hummasını andırır biçimde (taşikardi, uzanma, tutukluk, kas tremorları, paraliz, tortikollis, yutma refleksi kaybı) devam etmektedir (90).

Total kalsiyum seviyesindeki azalmanın plazmadaki esansiyel olmayan yağ asitleri seviyesindeki yükselme ile ilişkili olabileceğine dair görüşler mevcuttur. Esansiyel olmayan yağ asidi miktarındaki artış hastalığın ciddi etki gösterdiği sığırlarda çok daha dikkat çekicidir. Bazı araştırmacılar ise total kalsiyum seviyesindeki değişikliğin asit baz dengesi ve kan gaz dinamiği değişiminden kaynaklandığını düşünmektedir. Bu araştırmacılara göre respirasyonun artmasıyla ortaya çıkan karbondioksit basıncındaki (pCO_2) belirgin azalma kan pH'sının yükselmesine, karaciğerdeki üre yapımını düşürerek kan amonyak seviyesinin toksik seviyeye çıkmasına sebep olmaktadır. Böylece miktarı artan amonyak bir baz oluşturmak için su ile birleşecek ve kan pH'sının daha da yükselmesine sebep olacaktır. Ayrıca biriken fazla amonyak akciğerden salınımı esnasında akciğer ödemi meydana getirecektir. BEF'te yaşanan ölümler amonyak toksisitesiyle direk olarak ilişkilendirilmemesine rağmen amonyak toksisitesi ile klinik bulgular arasında güçlü ilişki olduğuna dair deliller mevcuttur (93).

Yapılan çalışmalarda BEFV enfekte hayvanlarda beyin kökü perifer sinirlerde periferik nöropatiye rastlanmış ve lumbal, torasik, servikal spinal kordda waller dejenerasyonu varlığı gösterilmiştir. Bu bölgelerde virüsün varlığı etkenin nörotropizmini düşündürmektedir. Bazı vakalarda yatma süresinin

uzaması durumunda kas ve sinirlere yapılan basınç iskemi ve sinirlerde dejereasyonlara yol açabilmektedir (94).

Bovine ephemeral fever virüs viremi öncesi kemik iliğinde tespit edilmiş ve daha sonra etkenin kemik iliği, dalak, hemal düğüm, lenf düğümleri gibi retiküloendotelial sistem hücrelerinde ve sinovyal sıvıdaki yangısal hücrelerde gösterilmesi bu bölgelerin etkenin muhtemel replikasyon bölgeleri olabileceğini ve tropizmini düşündürmüştür. Vireminin kesilmesinin ardından bu organ veya dokuların bir süre daha (bir hafta) virüsü barındırması enfeksiyon sonrası görülen güçlü bağışıklığa da muhtemel katkı sağlamaktadır (95).

Bovine ephemeral fever'a yakalanmış hayvanlarda lenf yumruları ödemlidir ve peritonal, plöral ve perikardial boşluklarda sarı renkte fibrinöz eksudat toplanmaktadır. Fibrinöz eksudat eklem kapsülasında birikim göstererek hayvanlarda topallığa sebep olmaktadır (91). Bu enfeksiyonda virüs plasentayı geçememekte ancak gebelerde abortlara sebebiyet verebilmektedir. Abortlar sıklıkla ateşin sona ermesinden sonra ortaya çıkmaktadır (96, 97).

Hastalık deneysel olarak en az 3-6 aylık buzağılarda oluşturulabilmektedir (98). Hastalık yüksek süt verimine sahip ineklerde özellikle laktasyon döneminde veya yüksek kondüsyonlu besi sığırlarında daha şiddetli seyretmektedir (97, 99). Besi sığırlarında geçici infertilite altı aya kadar uzayabilmektedir (6). Sütçü sığırlarda haftalık süt üretimi %45-70 oranında azalma gösterebilmektedir. Bazı kaynaklarda bu oranın %90'a varabildiği belirtilmiştir. İyileşme döneminde hayvanlar 2-3 hafta içerisinde eski verimlerinin maksimum %85'ine

kavuşabilmekte ve laktasyon son dönemlerindeki hayvanlarda ise süt üretimi durabilmektedir (6, 100, 101, 102).

Sığırlarda BEFV enfeksiyonu belli belirsiz klinik bulgulardan ölüme kadar değişen geniş spektrumda ifade edilmektedir (6). Komplikasyonlar genellikle %1 civarındadır ve hayvanların birçoğu birkaç gün içerisinde iyileşme göstermektedirler (90). Ölümler pnömoni, amfizem, koma-toksikasyon, paraliz, refleks kaybı gibi komplikasyonlar veya yeterli bakım gösterilmemiş hayvanlarda dehidrasyon sebebiyle olabilmektedir (103, 104).

3.2.9. Bovine Ephemeral Fever Epidemiyolojisi

3.2.9.1. Bulaşma Yolları

Bovine ephemeral fever kan emici artropodlar ile nakledilmektedir. Hasta hayvanlardan duyarlı hayvanlara yakın temas, vücut sekresyonları, damlacık enfeksiyon veya taşıyıcılar ile bulaşma bildirilmemiştir (6, 97). Vertikal bulaşmanın gerçekleşmediği bilinen bu hastalıkta deneysel girişimler de başarısız olmuştur (105).

3.2.9.2. Hastalığın Yayılımını Etkileyen Faktörler

Hastalık başlangıçta bir veya iki sığırın etkilenmesi şeklinde sporadik olarak ortaya çıkmakta iken bunu 4-5 hafta sonra ortaya çıkan geniş endemik veya epidemik dalgalar takip etmektedir (99). Bovine ephemeral fever'in primer odaktan çevreye hızla yayılması duyarlı sığır popülasyonunun fazlalığına, vektörün yetiştirme alanlarına ve çok sayıdaki vektörün çoğalarak geniş alanlara ulaşabilmesi için uygun iklimsel ve ekolojik şartların varlığına bağlıdır (106).

Konağın göçü, hareketi ya da vektör sineklerin uygun konak ve yaşam alanı (uygun iklim, hava, nem, sıcaklık vs) aramak için uzun mesafe alması ile hastalık etkeni taşınabilmektedir. Konak-vektör hareketinde çevre, iklim, göç ve ticaretin direk olarak ilişkisi bulunmaktadır (107).

Kültür ortamında virüsün gösterdiği davranış şekli o virüsün pasaj-konak geçmişine bağlı olarak değişmektedir benzer durum saha enfeksiyonları için de geçerlidir. Bovine ephemeral fever virüsün sığır dışında henüz bilinmeyen omurgalılarda geçici enfeksiyon oluşturma ihtimali söz konusudur. Bu enfeksiyonlar sonrası vahşi konakçıya adapte olan virüs son konak sığıra taşındığında viremi safhası ve antikor üretimi görülebilsede hastalık şekillenmemektedir. Ancak vektörler vasıtasıyla hayvandan hayvana taşınmalar, ilgili virüsün virülensinde artışa yol açarak epidemilerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Buna dayanarak avirulent formun vektörler veya diğer ruminantlar arasında sürdürülebilir olduğu ve sığırlarda yayılmayı kolaylaştıran şartlar oluştuğunda, virülensi tekrar artırabildiği söylenebilir. Ortaya çıkan bu salgınlar duyarlı sığırların azalması, vektörlerin ortamdan elimine edilmesi veya virulent formun ortadan kalkmasıyla son bulabilmektedir (108).

3.2.9.2.1. Konak

Konağa ait faktörler hayvan türü, yaş, cinsiyet, duyarlılık, yetiştirme yönü, konağın göçü veya taşınması olarak sıralanabilmektedir (44, 97).

Bovine ephemeral fever sığır (*Bos taurus*, *Bos indicus* ve *Bos javanicus*) ve mandalarda (*Bubalus bubalis*) ortaya çıkmaktadır. Çin ve Hindistan'daki yaklarda (*Bos grunniens*) enfeksiyon ve klinik bulgulara dair deliller mevcuttur

konusudur (46). Türkiye'nin sınır bölgelerindeki kayıt dışı hayvan hareketleri taşınmanın diğer muhtemel sebepler arasındadır.

3.2.9.2.2. İklim Koşulları

Hastalık tropik, subtropik ve sıcak iklime sahip bölgelerde ortaya çıkmaktadır (6, 109). Hastalık aşırı iklimlerin etkisiyle ortaya çıkabilmekte, genellikle kuraklık sonrası ortaya çıkan aşırı yağışlar bunda etkili olmaktadır (46). BEF salgınları ve küresel baz da sıcaklıklar incelendiğinde Afrika (1968-1973) ve Asya'yı (1987) etkileyen iki ciddi kuraklığın BEFV popülasyonu üzerine düşük seviyeli de olsa bir dalgalanmaya yol açtığı görülmüştür. BEFV popülasyonunun 2000'li yıllarda %50 artış gösterdiği bilinmektedir ilginç bir şekilde bu değerlendirme 2001-2010 yılları arasında en yüksek sıcaklık ortalamasına sahip 10 yılın yaşandığı bilgisiyle de örtüşmektedir (47).

Normal seviyenin üzerinde seyreden yağışlar ile BEFV salgınları çoğu zaman ilişkilidir. Avustralya'da 2008 yılından sonra aşırı yaz yağışları ve yoğun şekilde sellerin görülmesi, sinek popülasyonunun ortaya çıkması için ideal şartlar sağlamış ve peş peşe yaşanan BEF salgınları buna eşlik etmiştir (111). Benzer şekilde Kenya'da alışılmadık yoğun ve uzun süreli yağış ile ilişkili olarak BEF epidemileri ortaya çıkmıştır (104).

Şiddetli yağışlar ile ilk klinik vakaların görülmeye başlaması arasında her zaman bir ilişki bulunmasına rağmen virüs nakledilmeye başlamasıyla beraber kurak bölgelerde de ortaya çıkabilmektedir. Bu durum akarsu ve dere yakınlarına kurulan çiftliklerin vektörler için uygun yaşam alanı sağlaması ile yakından

ilişkilidir. Kuraklık döneminde hastalığın su birikintisi etrafında toplanan sığırlarda rapor edilmiş olması bu görüşü destekler niteliktedir (109).

Albayrak ve ark. (2010) enfeksiyonun hem nemli-ılıman hem de karasal iklimin hüküm sürdüğü illerde görülebilmesinde ve aynı iklim kuşağında yer alan benzer konumdaki illerde hiç belirlenmemesinde mikroklimanın etkili olduğunu öne sürmüştür (51).

3.2.9.2.3. Rüzgar

Rüzgar BEF epidemilerinde önemli bir faktördür. Rüzgar, vektörlerin hareketine katkıda bulunarak virüsün uzaklara taşınmasında alternatif bir yol olabilmektedir (110).

Ruminantlardaki arbovirüslerin birçoğuna vektör görevi yapan *Culicoides* türü sineklerin alışıldık hareketleri birkaç yüz metre ile 2 km arasında olmasına rağmen rüzgarla yüzlerce kilometreye yayıldığı bilinmektedir (112).

Avustralya’da 1968-69 yılları arasında BEF’in patlak vermesinde musonal etki ve düşük basınç sisteminin etkili olduğu görülmüştür. Bu durum BEF’in 3000 km katederek Northern Territory’den Kuzey Victoria’ya yayılmasına yol açmıştır. Benzer şekilde 2008 yılında BEF vakalarının Yeni Güney Galler’in kuzey batısından iç ve güney kesimlere ulaşmasında düşük basınç sisteminin etkisi bulunmaktadır. Yine BEFV’nin Japonya ve Kore’de görülmesi, Çin’den gelen düşük seviyeli jet akımı ile ilişkilendirilmiş ve bunu her bir ülkedeki salgınlar esnasında elde edilen izolatların genetik olarak benzerlik göstermesi desteklemiştir (46).

Doğu Asya'daki çalışmalar BEF'in daha düşük enlemde yer alan bölgelerdeki (Çin) gen havuzundan tanıtıldığını ve rüzgar yardımıyla ülkeler arasında (Tayvan ve/veya Japonya) geniş çaplı bir yayılmanın olduğunu göstermiştir (112). Benzer şekilde sineklerin hava akımının etkisiyle Sahra altı Afrika bölgesinden kuzeye doğru yayılma gösterdiği bilinmektedir. Bu esnada sineklerin bünyesinde barındırdığı BEFV'yi veya diğer arboviral etkenleri Mısır, Suriye, İsrail, Lübnan, İran, Irak, Türkiye, S. Arabistan Krallığı ve Arap Yarımadası'ndaki diğer ülkelere taşınması muhtemeldir (113).

Yapılan filogenetik analiz sonuçlarına göre Türkiye izolatu (2008) ile birkaç ay sonra İsrail'de ortaya çıkan salgından elde edilen izolat arasında yüksek düzeyde genetik benzerlik bulunmuştur. Bu benzerliğin sebebini ortaya çıkarmaya yönelik çalışmalarda ileri ve geri rüzgar yörünge analizi ile bölgedeki hava akımı incelenmiş ve Türkiye'de BEF salgını görülen bölgelerdeki hava parselinin İsrail'deki salgınlardan dokuz gün önce bölgeye ulaştığını ortaya koymuştur (46).

BEF salgınları 2008'de Türkiye'nin İran ve Suriye ile komşu durumundaki güney illeri ile sınırlı kalmış iken 2012'de bu illere 1000 km uzaklıktaki Sakarya ilinde de eklenmesi öncelikle vektörlerin rüzgar yardımıyla etkeni taşımış olma ihtimalini akla getirmiştir (53). Tüm bu sonuçlar rüzgar vasıtasıyla vektörlerin bölgeye taşınmış olabileceğini destekler niteliktedir (46).

3.2.9.2.4. Virülens

Avustralya'daki sığırların belli aralıklarla düşük virülense sahip BEFV enfeksiyonu geçirdiğine dair deliller mevcuttur. Bu bölgede klinik hastalığın görülmediği dönemlerde dahi BEF seroprevalansın yüksek olduğu ve altı ay gibi

kısa süreli antikör yanıt oluşturduğu rapor edilmiştir (114). Snowdon ve ark. (1971) tarafından yapılan serolojik çalışmalar, epidemiler arası dönemde düşük patojeniteye sahip BEFV'nin varlığını ortaya koymuştur (115). Tzipori ve ark. (1975) ise düşük virülense sahip BEFV'yi izole etmeyi başarmıştır (116). Yine düşük virülensli BEFV enfeksiyonuna yönelik birçok delil bulunmaktadır. Enfeksiyonun Çin'in bazı bölgelerinde küçük ölçekli salgınlar halinde iki yılda bir, büyük ölçekli salgınların ise dört yılda bir ortaya çıktığı bilinmektedir (117).

Son yıllarda ortaya çıkan salgınlarda virüsün daha yüksek virülense sahip olduğu görüşü hakimdir. Sonuçların duyarlı hayvan popülasyonundaki artıştan, virülensten ya da mevsimlerdeki değişiklikten mi kaynaklandığı tam olarak ortaya konulamasa da Tayvan, Çin, Orta Doğu ve Avustralya'da büyük çaplı ve alışılmadık düzeyde yüksek mortaliteli BEF salgınlarına rastlanmıştır. Benzer şekilde son BEF epidemisinde (2012) Türkiye'nin birçok bölgesinden yüksek mortaliteye ilişkin raporlar (%15-20) virüsün virülensini artırmış olabileceğini düşündürmüştür (53, 111).

3.2.9.2.5. Vektör Popülasyonu

Vektör popülasyonunun artmasıyla BEF salgınları ortaya çıkabilmekte ve bu durum virüsün duyarlı sığırlara yüksek oranda taşınmasına sebep olmaktadır (118).

Mosquito (*Culex fatigans*, *Aedes aegypti*, *Culex annulirostris*) ve Culicoides (*Culicoides marksii* ve *Culicoides brevitarsis*) türlerinde laboratuvar şartlarında BEFV ile enfeksiyon oluşturulabilmiştir (90, 119). Aynı zamanda virüs salgınlar esnasında *Anopheles* ve *Culex* cinsine ait mosquito türlerinden ve

Culicoides türlerinden izole edilmiştir. Avustralya, Japonya ve İsrail’de virüsün izole edildiği *Culicoides* türleri *C. imicola*, *C. punctatus*, *C. kingi* ve *C. oxystoma* ve *C. schultzei*’dir (120).

Türkiye BEF epidemisi (2012) ile eş zamanlı olarak Akdeniz ve güneydoğu illerindeki sivrisinek popülasyonları incelenmiş ve baskın tür *C. schultzei* ardından *C. imicola* olarak bulunmuştur (121).

Tüm bu sonuçlara rağmen biyolojik vektör tam anlamıyla tespit edilmiş değildir ve bunun için ilgili vektörlerden doğal konağa nakledilmesini içeren deneylerin yapılması gerekmekte ve bu çalışma tam anlamıyla yapılmamıştır (120).

3.2.9.2.6. Rezervuar

Serolojik çalışmalar bazı hayvan türlerinin BEF’e karşı büyük oranda antikor taşıdığını göstermiştir (122).

Kenya, Tanzanya, Zimbabwe ve Güney Afrika gibi ülkelerde Afrika buffalosunu, antilop, impala, kudu, ceylan, zürafa gibi türlerde BEF nötralizan antikorları tespit edilmiştir. Diğer Afrika ülkelerinde fil, yaban domuzu ve hipopotamlarda nötralizan antikorlar bildirilmiştir. Mısır ve Somali’deki develerde de enfeksiyona dair deliller mevcuttur. Afrika vahşi yaşamındaki BEFV seroprevalansı %60 gibi yüksek bir değere çıkabilmektedir. Bu türlerin epidemiler arası periyod boyunca viral döngüye rezervuar olarak hizmet ettiği düşünülmektedir (46, 122, 123).

İsrail’de yapılan bir çalışmada 2000-2009 yılları arasında evcil ve vahşi türlerden toplanan 942 serum örneğinde BEF antikor varlığına bakılarak

muhtemel rezervuarların ortaya çıkarılması amaçlanmış ancak seroprevalansın çok düşük olması bu türlerin BEFV rezervuarı olma ihtimalinin düşük olduğunu ortaya koymuştur (122).

3.2.10. Ekonomik Önemi

Son zamanlarda BEF salgınlarındaki ölüm oranı artış gösterse de genelinde ölüm oranı düşüktür. Değerli damızlık hayvanların ölümü, sütün kalitesi ve süt verimindeki düşüş, abortlar, ticaretteki kısıtlamalar, boğalarda altı ayı bulabilen geçici kısırlık, etçi sığırlarda kondüsyon kaybı, yük hayvanlarında güç kayıpları ve tedavi masrafındaki maliyeti BEF'in sebep olduğu ekonomik kayıplar şeklinde sıralanabilmektedir (99, 124). Avustralya'da 1986 yılına kadar ortaya çıkmış büyük BEF epidemilerinin yarattığı ekonomik kayıp 100 milyon doları aşmıştır (43, 103). Ciddi BEF epidemileri esnasında Avustralya'daki ekonomik kayıplar 100-200 milyon dolara çıkabilmektedir (111). İsrail'deki BEF salgınları sonrası ekonomik kayıp laktasyondaki her bir inek için 280 dolar laktasyonda olmayan için ise 112 dolar civarında olduğu hesaplanmıştır. 1970'lerde BEF dalgasının sanayi düzeyinde sebep olduğu kayıpların bugünün piyasa değeri ile 200 milyon doları aştığı tahmin edilmektedir (58). Türkiye'de 2012 yılında ortaya çıkan ve yüksek ölüm oranıyla dikkat çeken BEF salgınında Güney ve Güneydoğu Anadolu'da bazı kaynaklara göre 20.000, bazılarına göre 50.000'den fazla sığır etkilendiği ve 2100'ü aşkın sığırın ölümü rapor edilmiştir. Etkilenen 760 civarında hayvanın ise veteriner hekimlerce kesime sevk edildiği bildirilmiştir (48).

3.2.11. Teşhis

Bovine ephemeral fever sporadik olarak ortaya çıkmakta ve genellikle klinik bulgular fark edilmemektedir. Ancak sonraları hızla yayılarak tanısı daha kolay hale gelmektedir. Hastalık aniden ortaya çıkma ve hızlı iyileşme ile karakterizedir böylece hekimler tarafından kolayca tanısı konulabilmektedir (99).

Virüs izolasyonu teşhis metotlarından biridir. BEFV için deneysel bir hayvan modeli yoktur. Eski çalışmalar daha çok virüsün duyarlı sığırlarda pasajlanmasına dayanırken bu yöntem pahalı ve elverişli olmadığı için terkedilmiştir (125). Virüs enfekte lökosit fraksiyonlarının süt emme dönemindeki (1-3 günlük) fare, hamster, ve rat beyinlerine inoküle edilmesi ile başarılı şekilde çoğaltılabilmektedir (6, 125, 126).

BEFV in vitro ortamda BHK-21, BHK21-W12, HmLu-1, HmT, Vero E6 gibi stabil hücre hatlarında çoğaltılabilmesinin yanında rat sığır hamster böbrek ve embriyo primer kültürlerinde de çoğaltılabilmektedir (61, 124, 126). Ek olarak virüs insekt hücrelerinden türetilen hücre hatlarında da (Aedes albopictus-C6/36) başarılı şekilde çoğalma göstermektedir (90, 97).

BEFV'nin laboratuvar hayvanlarına adapte edilmesi ve çok sayıda pasajlarının yapılması (altı ve üzeri) sığırlar için patojenite ve immunojenitesini hızla kaybetmesine sebep olmaktadır (98, 127, 128). Bu yüzden genel bir yaklaşım fare beynine adapte edilen ve titresini artırılan virüsün hücre hatlarına adapte edilerek geniş hacimlerde çoğaltılmasıdır (90).

Hastalığın teşhisinde kullanılmak üzere hayvanlardan ilki klinik dönemde ikincisi 2-3 hafta sonraki iyileşme döneminde olmak üzere çift serum örneği

alınarak nötralizasyon testi ile antikor titresindeki artış belirlenmektedir. Antikor titresinde en az 4 kat artış var ise hayvan pozitif olarak kabul edilir. Komplement fiksasyon, IFA testleri kullanılabilir ancak antijenik olarak yakın virüsler ile çapraz reaksiyonlar oluşabileceği için tercih edilmez. Blok ELISA testi, saf antijen ve monoklonal antikor kullanılması nedeniyle daha spesifiktir ve ticari olarak da geniş kullanım alanı bulmuştur (65, 90).

RT-PCR BEFV'nin tanı ve identifikasyonunda sık kullanılan bir moleküler testtir (44, 65).

Yine qRT-PCR ve RT-LAMP yöntemleri de BEF'in tanısında kullanılan moleküler testler arasındadır (44, 65).

3.2.12. Tedavi

Bovine ephemeral fever erken dönemde yapılacak sağaltım ile büyük ölçüde tedavi edilebilmektedir (97). Hastalık yangı temelli olduğundan tedavide non-steroid anti-inflamatuvar (Fenilbütazon-sodyum, flunixin meglumin) kullanımı faydalı olabilmekte ve antikor yanıt gelişimine de etkisi olmamaktadır (43, 86, 103). BEF'te ortaya çıkan hipokalsemi tedavisinde kalsiyum boroglukonatın damar içi infüzyonları iyi sonuçlar vermiştir (103). Hipokalseminin tedavi edilmesiyle geçici paraliz önlenmektedir (5). Hayvanların dinlendirilmesi, korunması, yem ve su ihtiyacının karşılanması iyileşme sürecini hızlandırmaktadır. Lateral uzanmış hayvanlar kas hasarı ve dolaşım kaybını önlemek için günde birkaç kez döndürülmesi tavsiye edilmektedir. Nadir de olsa çiğneme refleksi kaybolabileceği için hayvanlara zorla

yapılacak beslemeler aspirasyon pnömonisine zemin hazırlayacağı düşüncesi ile tavsiye edilmemektedir (46).

3.2.13. Korunma ve Kontrol

Hastalık doğrulandıktan sonra enfekte bölgelerdeki hayvan hareketliliğinin yasaklanması ve hayvanların insekt kovucu ajanlarla muamele edilmesi önerilmektedir. Non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar ve destekleyici tedavinin faydalı olduğu ispatlanmıştır. Hastalık öncesi alınacak en önemli tedbir aşılamaadır (129).

Doğal enfeksiyon veya immunizasyon sonrası oluşan spesifik nötralizan antikorların kan veya vücut sıvılarında gösterilmesi bir çok viral hastalığa dayanıklılık için önem arz etmektedir. Aşılamalar aracılığıyla özellikle nötralizan antikor üretimi hedeflenmektedir. Fakat ne nötralizan antikorların vücutta bulunması her zaman hastalığa dayanıklılığı gösterir, ne de spesifik antikor yokluğu her zaman duyarlılığın belirtecidir. Özellikle viral enfeksiyonlarda humoral yanıtın hücresel yanıt ile desteklenmesi önem arz etmektedir (130).

Doğal BEFV enfeksiyonları uzun süreli bir bağışıklıkla sonuçlanmaktadır (97). Doğal enfeksiyonu takiben nötralizan antikorlar en az 422 gün devam etmekte ve hastalığı atlatan bu hayvanlar en az iki yıl hastalığa direnç gösterebilmektedir (46, 128).

Bovine ephemeral fever'den korunmada nötralizan antikorların rolüne ilişkin çelişkili raporlar mevcuttur (124). Tzipori ve Spradbrow, sığırların fare beyni adapte virüsle aşılmasını takiben gelişen nötralizan antikor yanıtın sürekli olarak hastalıktan korumadığını gözlemlemiştir (131). Della Porta ve ark.

yaptıkları çalışma ile düşük pasaj seviyesinde üretilen eşdeğer özellikteki canlı ve inaktif aşının etkilerini kıyaslamış ve canlı aşının sığırlarda koruma sağlarken, 500 kat daha fazla konsantrasyondaki inaktif aşının ise daha yüksek miktarda antikor üretmesine rağmen koruma sağlamadığını bildirmiştir. Bu durum korunmanın yalnızca nötralizan antikorla ilişkilendirilemeyeceğini hücresel yanıtın da gerekli olabileceğini destekler niteliktedir. Bazı araştırmacılar da yaptıkları çalışmalar neticesinde buna benzer sonuçlar almıştır (132, 133). Bir diğer rhabdovirüs olan kuduz virüsünde de araştırmacılar antikorların hastalıktan korunma için tek gösterge olmadığını ve hücresel yanıtın da önemli olduğunu vurgulamıştır (133). Ancak araştırmacıların bir kısmı ise BEF aşılamaalarında ortaya çıkan antikor yanıtın yeterli olduğu görüşündedir (74, 108, 134).

Uren ve ark. (1994) BEFV'ten ayırttıkları G proteini ile sığırlarda etkin bir koruma sağlamıştır (74). Bu aşıya BEFV N proteini eklenmesi, T-lenfosit çoğaltıcı tepkiyi artırmasına rağmen, aşının koruyucu etkinliğini iyileştirmemiştir (72). Cybinski ve ark. (1990) G protein nötralizan monoklonal antikorları yeni doğmuş farelere periton içi uygulayarak pasif koruma sağlamış ve antikor nakledilen farelerde beyin içi çekinç sonrası ölüm ve paraliz şekillenmediğini bildirmiştir (75). Bu sonuçlar uygun form ve adjuvan ile verilen G proteinin koruma için yeterli bağışıklığı sağladığını göstermektedir (74).

3.2.13.1. Aşılar

Bovine ephemeral fever mevsimsel bir hastalıktır ve aşılamaaların da özellikle bu dönemlere yakın yapılması önerilmektedir (135). Canlı aşının sivrisinek popülasyonunun yoğun bulunduğu dönemlerde yapılması bir risk

oluşturabilmektedir. Öyle ki canlı atenüe aşının sığırlarda derialtı uygulamaları sonrasında aşının vektörler tarafından alınarak konak-ara konak arasında pasajlamalar geçirebileceği ve böylece yeniden virülens kazanabileceği ihtimalini bazı araştırmacılar dikkate almış ve inaktif aşıya yönelmiştir. Bazı araştırmacılar ise bunun çok düşük bir ihtimal olduğunu savunmuştur (130).

Bovine ephemeral fever virüse karşı hazırlanan aşılar da virüsün pasaj sayısı ve antijenitesi iyi dengelenmelidir (97).

Bovine ephemeral fever virüs deney hayvanlarında veya kültür ortamında kolayca atenüe hale geçebilmektedir. Yeni doğan rodent beyinlerine adapte BEFV'nin düşük pasaj seviyesinde sığırlar için patojenitesini hatta antijenitesini dahi kaybedebilmektedir (127, 128, 136). İnaba ve ark. (1969) fare beyinde dördüncü pasaj hamster beyinde beşinci pasaj ve hücre kültüründe ise dokuzuncu pasaj seviyesinde virüsün atenüe olduğunu ve aynı zaman da antijenitesini de kaybettiğini belirtmiştir (136). Fare beyni adapte virüsün pasaj sayısı arttıkça patojenitesini kaybetmesi, sığırlardaki çalışmalarda yüksek titreli virüs gereksinimi ve antijeniteyi yükseltmek için adjuvan kullanma gereksinimi bu yolla aşı üretiminin handikaplarını teşkil etmektedir (125). Tzipori ve Spradbrow (1973) tüm bu handikaplara rağmen fare beyni adapte virüsü alüminyum hidroksit ile karıştırarak sığırlara iki doz halinde uygulamış ve hem doğal hem de deneysel enfeksiyona karşı koruma sağlamayı başarmıştır. Ancak bu aşı ticari üretime elverişli bulunmamıştır (124). Bazı araştırmacılar virüsün adaptasyon esnasındaki atenüasyon sorununu virüsün doğal konakta yeniden pasajını yaparak aşmıştır. Fare beynine adapte edilen BEFV'nin sığırdaki pasajlanmasının ardından benzer

işlem birkez daha tekrar edilmiş ve böylece hem fare beynine hem de sığıra adapte patojenik BEFV elde edilebilmiştir (108).

Şu ana kadar dört tip BEF aşısı geliştirilmiştir: 1) Canlı atenüe aşılar 2) İnaktif aşılar 3) G protein tabanlı subunit aşılar 4) Rekombinant aşılar

Sahada atenüe aşılar, inaktif aşılar ve subunit aşılar kullanım alanı bulmaktadır. Aşılama Avustralya, Güney Afrika, Namibya, Japonya, Güney Kore, Tayvan, Çin, Filipinler, Türkiye, İsrail, Kuveyt, Umman, Bahreyn, Suudi Arabistan ve Mısır gibi ülkelerde değişen derecede benimsenmiştir (46, 74).

Hazırlanan aşılar, tohum virüs, atenüasyon veya inaktivasyon metodu ve adjuvan içeriği bakımından farklılık göstermektedir (46).

3.2.13.1.1. Canlı Atenüe Aşılar

Canlı atenüe aşılar BEFV'nin süt emen farelerde ve/veya hücre kültürlerinde (BHK-21, HmLu-1, Vero) seri pasajları neticesinde hazırlanmaktadır (134, 137, 138). İmmun yanıt yeterli düzeyde gelişmediğinden bu canlı aşıların birçoğunda farklı bir yaklaşım olarak Quil A, alüminyum hidroksit, Freund's komplete veya inkomplete gibi adjuvanların kullanımı tercih edilmiştir (138). Canlı aşılara adjuvan eklenmesi sonrasında virüsün ne oranda aktif kaldığı kullanılan adjuvanların titrasyon testindeki hücreler üzerinde toksik etki yaratması sebebiyle tam olarak bilinmemektedir (97). Ancak Tzipori (1974) alüminyum hidroksit ilavesi ile total virüsün %90 oranında inaktif hale geçtiğini rapor etmiştir (130). Quil A adjuvan kullanımının aşı içeriğindeki virüsü %99.99 oranında inaktive ettiği iddia edilse de bu etkinin inaktivasyondan çok virüs partiküllerini bir araya toplamasından (agregasyon) kaynaklandığı saptanmıştır (43).

Tzipori *ve ark.* (1978) hazırladığı Freund's komplet adjuvanlı atenüe aşının tek dozu sonrasında buzağılarda en az 40 hafta koruyucu yanıt geliştirmiştir. Ancak enjeksiyon bölgesinde 2-10 cm çapında apse şekillenmiş ve uzun süre devam etmiştir. Alüminyum hidroksit adjuvanlı atenüe aşının 2. ve 3. uygulamaları ile sığırlarda en az 12 ay nötralizan antikor varlığı tespit edilmiş ancak bu aşı sonrasında Vero hücrelerine karşı sitotoksisite gelişmiştir (138). Freund's inkomplet adjuvan kullanarak hazırlanan atenüe aşı ise ticari olarak Afrika'da kullanım alanı bulmuştur (46).

Vanselow *ve ark.* 1982 ve 1984 yılları arasında yaptıkları çalışmada atenüe BEF aşısını Quil A ile karıştırarak uygulandığında alüminyum hidroksit ve dekstran sülfat kullanımına göre daha yüksek antikor yanıt almış ve bu aşının saha etkinliği %90 olarak rapor edilmiştir. Aynı zamanda Quil A adjuvanı ile hazırlanan aşının en az 12 ay koruma sağladığı bildirilmiştir (134). Bu canlı atenüe Quil A aşısının Avustralya'da ticari kullanımı benimsenmiştir (79).

3.2.13.1.2. İnaktif Aşılar

İnaktif BEF aşıları virüsün formalin, β -propiolakton, binary ethyleneimine gibi kimyasallar ile muamele edilerek inaktive edilmesi neticesinde hazırlanmıştır (133, 135, 139). Isıl işlem ile inaktif hale getirilen virüs nötralizan antikor yanıt uyarmada başarısız olmuştur (46). İlk hazırlanan inaktif aşılardan birçoğunda alüminyum fosfat jel veya Freund's inkomplet adjuvan kullanılmıştır (131, 135).

Japonya'da formalinle inaktive edilerek alüminyum fosfat jeli emdirilmiş BEF aşısının sığırlara iki doz uygulanması sonrasında güçlü bir antikor yanıt alınmış ancak bu yanıtın hızla azalarak 4 ay sonra tespit edilemeyecek seviyeye

düştüğü bildirilmiştir (135). Daha sonraki çalışmalarda emülsiyon fazlı inaktif BEF aşısı kullanımı (water in oil in water) tercih edilmiştir. İsrail’de bu yöntemle (MONTANIDE™ ISA 206 VG adjuvant) bir aşısı geliştirilmiş ve ikinci aşılama sonrakı her uygulamada daha güçlü bir immun yanıt alınmıştır. Booster aşının etkisi dokuz ay boyunca devam etmiştir. Bu aşısı ile ilgili herhangi bir güvenlik sorunu bildirilmemiş ayrıca süt veriminde de olumsuz etki yaratmamıştır (139). Aşılı hayvanlarda antikor titresi 1:128-256 seviyesine kadar artış göstermiş ve iki defa aşılana hayvanlarda antikor titresi 120 gün, daha fazla aşılana hayvanlarda ise 267 gün sonra 1:16 seviyesine inmiştir. Son aşılama 2-3 ay sonra BEF salgını patlak vermiş ve iki doz aşısı koruma sağlamazken üç doz yapılan aşının etkinliği %50 düzeyinde bulunmuştur. Hayvanlarda bu etkinlikte bir korumanın sağlanabilmesi için bir yaşına kadar iki doz, salgınların çıkma ihtimalinin yüksek olduğu döneme yakın da tek doz aşılama yapılması önerilmiştir. Yüksek antikor titresine rağmen düşük koruma etkinliği hayal kırıklığı yaratmış ve diğer inaktif aşısı çalışmalarına benzer neticeler ortaya çıkmıştır (132).

İnaba ve ark. (1974) değişik bir aşılama prosedürü takip ederek ilk doz canlı aşısı ardından tek doz inaktif aşısı verilmesinin, iki doz canlı veya inaktif aşısı uygulamasına göre daha güçlü ve uzun süreli bir immun yanıt oluşturduğunu göstermiştir (137). Bu aşının kullanımı sonrasında abort, fetal hasar veya süt veriminde herhangi bir azalma meydana gelmemiş ve bu aşısı Japonya’da ticari olarak kullanımı benimsenmiştir (46, 137).

Tayvan’da inaktif yağ emülsiyon BEF aşısı geliştirilmiş ve test edilmiştir. Bu aşının tek doz uygulamasından bir ay sonra deneysel enfeksiyona karşı %100 koruma sağladığı gösterilmiştir (46).

3.2.13.1.3. Subunit Aşılar

Uren *ve ark.* (1993) Quil A adjuvanlı BEFV subunit aşısını geliştirmiştir. Bu araştırmacılar, non-iyonik deterjanlarla muamele sonrası virüsten ayrıştırdıkları saf proteinleri (G+G, G+N, N+N) iki hafta arayla sığırlara uygulamış ve yalnızca iki doz uyguladıkları (1µg/doz) G subunit aşısı koruma sağlamıştır (90). Aynı araştırmacılar Quil A adjuvanlı pürifiye G subunit aşısını 0. ve 21. günlerde veya 0, 7 ve 36. günlerde (0.32 µg/doz) sığırlara uygulamış ve bu aşı 104. günde yapılan deneysel enfeksiyona karşı %100 koruma sağlamıştır. 0, 7 ve 36. günlerde 10 kat fazla miktarda uygulanan G subunit aşısı 46. gün sonunda yapılan deneysel enfeksiyondan korumuş aynı hayvanlar bir yıl sonra yapılan reçelinça da direnç göstermiştir. Hazırlanan subunit aşı içerisindeki G protein miktarı 0.032 µg düşürüldüğünde dahi iki hayvandan birinde koruma sağlanmış diğeri ölmüştür. Avustralya’da hazırlanan bu aşının saha değerlendirmesi bulunmamaktadır ve ticari olarak da kullanımı benimsenmemiştir (74).

Çin’de non-iyonik deterjanlar ile virüsten ayrıştırılan yarı-saf haldeki G protein subunit aşısı sığırlarda etkili koruma sağlamış ve güvenli olarak nitelendirilmiştir. Epidemiler öncesi sahada kullanımı benimsenen yağ adjuvanlı bu aşı üç hafta arayla iki doz şeklinde uygulanmış ve altı ay sonraki (9. ayda koruma sağlanamamıştır) deneysel enfeksiyona karşı %50 koruma sağlamıştır (134).

3.2.13.1.4. Rekombinant Aşılar

Bovine ephemeral fever virüsüne karşı üretilen rekombinant aşılar BEFV G proteini hedeflenmiştir. BEFV G proteinini açıklayan LSDV (Lumpy

Skin Disease Virus) Neethling suşu 0., 3., 6., ve 12., haftada 4 doz uygulanmasıyla spesifik nötralizan antikor yanıtı ve hücrel immun yanıtı uyarmış fakat son dozdan 10 hafta sonra oluşturulan deneysel enfeksiyona karşı koruma başarısız olmuştur (140, 141). Aynı çalışmada ticari Güney Afrika canlı atenüe BEFV aşısı güçlü antikor yanıt uyarmasına rağmen tam koruma sağlamamıştır (141). Vaccinia virüs NBYH suşundan açıklanan rekombinant BEFV G proteini ile 0. ve 21. günlerde sığır aşılması spesifik nötralizan antikor oluşturmuş ve deneysel enfeksiyona karşı koruma sağlamıştır. Ancak aynı suşun rekombinant Gns aşılması sonrasında hayvanların 2/3'ünden virüs izole edilebilmiş ve bu durum çelinç virüsün düşük virülenste olma ihtimalini akla getirmiştir (8, 46). Zhang ve ark. (2016) NDV La sota suşu vektörüne BEFV G genini aktararak hazırladığı rekombinant aşığı fare ve sığırlarda test etmiştir. Bu çalışmanın neticesinde farelerde 1:388 ve sığırlarda 1:64-128 antikor titresi elde etmiştir. Hücrel yanıtı da uyaran bu aşının koruma sağlayıp sağlamadığı test edilmemiştir (140).

BEF aşı çalışmalarında çelişki yaratan durumların muhtemel nedenlerinden ilki BEFV için altın standart olan nötralizasyon testininin bu etken için standardize edilmemiş olmasıdır. İkincisi hazırlanan aşıda kullanılan virüsün pasaj geçmişinin fazla olması ve antijenitesini de büyük ölçüde kaybetmesidir. Üçüncüsü deneysel veya doğal enfeksiyonda maruz kalınan BEFV'nin düşük virülense sahip olma durumudur ki bazı ülkelerden düşük virülense sahip BEFV izole edilebilmiştir. Dördüncü olarak özellikle Avustralya'da aşığı karşı erken yanıt alınmasının altında hayvanların daha önce geçirmiş olduğu BEF ile yakın antijenik ilişkili Kimberley virüs enfeksiyonun olduğu ortaya konmuştur.

Kimberley virüs enfeksiyonunu atlaman ardından BEF'e maruz kalan hayvanlarda primer yanıt gelişmemektedir. Son olarak da bazı çalışmalarda aşı denemelerindeki gruplar altı aydan küçük (üç aylık) ya da 3-5 yaşında olması gibi BEF için kritik yaş aralığında tercih edilmesidir. Tüm bu sonuçlar aşının etkinliği hakkında spekülasyonlara yol açmaktadır (6, 64, 98, 132).

Özetle deneysel ve ticari BEF aşıları çeşitli formülasyonlarda geliştirilmesine rağmen saha etkinliğine dair oldukça az rapor bulunmaktadır. Aşıların birçoğunda koruyucu bağışıklık süresi sınırlı olmakla birlikte 6 ay veya 1 yıl aralıklarla destekleyici doz verilmezse etkinlik zayıf olabilmektedir (46).

Bu tezde öncelikle 2012 yılına ait BEF salgınından elde edilen saha virüsünün tam genom dizilemesi yapılarak moleküler düzeyde kimliklendirilmesi hedeflenmiştir. Gen bankasında bu virüse ait sınırlı sayıda tam genom verisi bulunmaktadır. Bu çalışmadan elde edilecek tam genom verileri ile bu sayının artırılması amaçlanmıştır. Gen bankasındaki bu verilerin sayıca artırılmasının BEFV'in evrimi ve küresel yayılımındaki bilinmezliklerin ortadan kaldırılmasına katkıda bulunulacağına inanılmaktadır. Epidemik salgınlara yönelik koruyucu tedbirlerin alınmasında virüsün komşu ülkelerle ilişkisini ortaya koymak gerekir ki filogenetik analizler bu açıdan oldukça önem arz etmektedir.

Günümüzde canlı ve inaktif aşılarla alternatif teşkil edecek ve bu aşıların olumsuz yanlarını ortadan kaldıracak türden aşılarla yönelim söz konusudur. Rekombinant aşılar, geleneksel aşılarla alternatif olabilecek aşıların başında gelmektedir. Geçmişte başarısız sonuçlar alınsa da gelişen rekombinant DNA teknolojisi ve imkanlar sayesinde bu aşılardan istenen sonuçlar alınabilmektedir. Bu

tezde, izolatların moleküler karakterizasyonuna ilave olarak BEFV'nin immunojenik açıdan önemli iki proteini olan G ve N proteinleri içeren plazmid DNA'ların BALB/c farelerinde açıklatılması amaçlanmıştır. Her ne kadar BEF için uygun deneysel hayvan modeli bulunmasa da başarıya ulaşması durumunda bu çalışma bir prototip teşkil edecek ve optimize edilmiş DNA aşıları gerekirse farklı modellerde test edilecektir. Ülkemizde bu etkene karşı DNA aş denemeleri bulunmamaktadır. Bu yönüyle bu çalışma bir başlangıç niteliğindedir. Ayrıca bu tezde adjuvan olarak günümüzün oldukça popüler transfektan ajanı olan lipofektaminin kullanımı tercih edilmiştir. Benzer formülasyonda hazırlanan BEFV aşısının test edilmesine yönelik bir çalışma daha önce yapılmamıştır. Bu çalışmadan alınacak başarılı sonuçlar diğer araştırmacılar için de teşvik edici olacak ve yeni çalışma sahası yaratacaktır.

4. GEREÇ VE YÖNTEMLER

4.1. Bovine Ephemeral Fever Virüsün Tam Genom Sekanslaması

4.1.1. Vero E6 Adapte BEFV RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu amacıyla öncelikle enfekte sığırlardan elde edilen ve RT-PCR ile pozitif olduğu belirlenen kanların lökositleri T12.5 kültür kabındaki (Greiner, Kremsmünster, Avusturya) Vero E6 hücrelerine (ATCC, Virginia, A.B.D.) ekildi. Sıcaklığı 37°C olan %5 CO₂'li inkübatörde (Nuair, Hepafiltreli CO₂ Etüv, MN. A.B.D.) kültüre edilen BEFV enfekte hücreler, altıncı günde -80°C'e kaldırıldı. Bir gün sonra oda ısısında çözündürülerek ısı şokuyla parçalandı. Dondurup çözündürme işlemi bir kez daha tekrarlandı. Elde edilen enfekte hücre-vasat süspansiyonu soğutmalı santrifüjde (Hettich, Almanya) +4°C 1500 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantdan 200 µl alınarak Vero E6 hücrelerine adsorbsiyonlu yöntemle ekildi. Bu kör pasajlama işlemi altıncı pasaja kadar tekrarlandı virüs Vero E6 hücrelerine adapte edilerek sitopatik odaklar oluşturması gözlemlendi. BEFV enfekte hücreler -80°C'de dondurularak saklandı.

RNA izolasyonu ZR RNA MiniPrep (Zymo Research, Irvine, CA. A.B.D.) kitinin kullanım talimatı birebir uygulanarak gerçekleştirildi. Bu amaçla altıncı pasaj BEFV Vero E6 kültürü -80°C'den çıkarıldı ve oda ısısında çözündürülerek ısı şoku ile parçalandı. Elde edilen hücre virüs süspansiyonundan 100 µl ependorf içerisine alındı ve üzerine 400 µl lizis buffer ilave edildi. Tüp vortekslendikten (Vorteks, VELP Scientific, NY, A.B.D.) sonra 12000 rpm'de bir dk santrifüj edildi ve üst sıvı toplama tüpü içerisindeki Zymo Spin III kolona aktarıldı. Tüpler 8000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Tüpün dibinde toplanan sıvı farklı mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerlerine 400 µl saf etanol ilave

edilerek vortekslendi. Homojen hale gelen karışım Zymo Spin II kolona aktarılarak 12000 rpm’de bir dakika santrifüj edildi. Yeni tüpe alınan kolon üzerine 400 µl RNA Prep buffer ilave edildi. Son santrifüj işlemi tekrarlandı. Önce 800 µl ardından 400 µl yıkama solüsyonu ile 12000 rpm’de 30 sn santrifüj edilen kolonlar yeni toplama tüpüne aktarıldı. Elüsyon amaçlı 100 µl RNAaz içermeyen su kolon üzerine bırakılarak oda ısısında bir dk inkübasyonun ardından 10000 rpm’de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. NanoDrop™ 2000 spektrofotometrede (Thermo Scientific, MA. A.B.D) 1 µl su ile blank işleminin ardından 1 µl elüsyon solüsyonu bırakılarak RNA miktarları tayin edildi. Elde edilen RNA’lar tam genom sekanslama adımında kullanılmak üzere -80°C’ye kaldırıldı.

4.1.2. Sekanslanacak Bölgelerin RT-PCR ile Çoğaltılması

BEFV genomunun sekanslanmasında kullanılacak primerler gen bankasında tam genom verileri bulunan Bovine/China/Henan1/2012 (Çin suşu) ve BB7721 (Avustralya suşu) BEFV suşları referans alınarak ve DNA Baser (Herade Biosoft S.R.L., Arges, Romanya) programından faydalanılarak oluşturuldu. Primerler 600-800 baz çifti (bç) uzunluğundaki bölgeleri çoğaltacak ve birbirleriyle örtüşecek şekilde dizayn edildi.

Elde edilen viral RNA’ların cDNA’ya dönüştürülmesi işlemi High Fidelity Transcriptör cDNA sentez kiti kullanılarak (Roche, Basel, İsviçre) gerçekleştirildi. cDNA adımı dizayn edilen primerler kullanılarak ve ticari firmanın kullanım talimatlarına uyularak gerçekleştirildi. BEFV tam genomun çoğaltılmasında kullanılan kısmi primerler Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. BEFV tam genom çoğaltılmasında kullanılan kısmi primerler

Primer	Nükleotit dizilimi	Ürün
BEF 1 ileri BEF 710 geri	5'-ACG AGA AAA AAC AAA AAA AC-3' 5'-AAA TCT TAC ATG AGC ATA TT-3'	710 bç
BEF 690 ileri BEF 1430 geri	5'-AAT ATG CTC ATG TAA GAT TT-3' 5'-GCT TCA AGT GGC TCA TG-3'	740 bç
BEF 1415 ileri BEF 2040 geri	5'-ATG AGC CAC TTG AAG CC-3' 5'-TTT TGA AAC TGA TCC ATC-3'	625 bç
BEF 2020 ileri BEF 2640 geri	5'-GTG ATG GAT CAG TTT CAA-3' 5'-TTC CAA TTG TTA GAT AAC-3'	620 bç
BEF 2620 ileri BEF 3180 geri	5'-TAG TTA TCT AAC AAT TGG-3' 5'-TTG TGG ACA TTT GAT TT-3'	560 bç
BEF 3160 ileri BEF 3780 geri	5'-TGA AAT CAA ATG TCC GCA AC-3' 5'-ATC CCT TAT TTA CAT GGA CT-3'	620 bç
BEF 3760 ileri BEF 4380 geri	5'-AGT CCA TGT AAA TAA GGG AT-3' 5'-TTA GAG TTA CAT TAA GCT TC-3'	620 bç
BEF 4360 ileri BEF 4920 geri	5'-GAA GCT TAA TGT AAC TCT AA-3' 5'-CAA AGA ACC TAT CAT CAC CG-3'	560 bç
BEF 4900 ileri BEF 5580 geri	5'-CTG GTG ATG ATA GGT TCT-3' 5'-GAT TGA CAA AAC TCT GAT-3'	680 bç
BEF 5560 ileri BEF 6180 geri	5'-CAA TCA GAG TTT TGT C-3' 5'-ATA ATG ACA GTA TCT TCA-3'	620 bç
BEF 6160 ileri BEF 6780 geri	5'-GAT GAA GAT ACT GTC ATT-3' 5'-TAT TTT TTT CAT GCT C-3'	620 bç
BEF 6760 ileri BEF 7380 geri	5'-TAA GTT GGA TTA TTG AGC-3' 5'-GCA CAG TTA ATT TGT AAA-3'	620 bç
BEF 7360 ileri BEF 7980 geri	5'-ATC CTT CGA GAG TTT ACA-3' 5'-GTC TTT AGT GAT TTT GAA-3'	620 bç
BEF 7960 ileri BEF 8580 geri	5'-ACT GAA TAA ATT TTC A-3' 5'-TTA TTG ATC ATC CAA TTT CTT-3'	620 bç

BEFV tam genom çoğaltılmasında kullanılan primerler

Primer	Nükleotit dizilimi	Ürün
BEF 8560 ileri BEF 9180 geri	5'-TTA AGA AAT TGG ATC AAT-3' 5'-TGA AAC CTG CTA ATT AAT-3'	620 bç
BEF 9160 ileri BEF 9780 geri	5'-GTA TTA ATT AGC AGG TTT-3' 5'-CCA AAC TCA TCT ATA ATC-3'	620 bç
BEF 9760 ileri BEF 10380 geri	5'-CAG ATT ATA GAT GAG TTT-3' 5'-AAC TCA TGA GTT CTA GT-3'	620 bç
BEF 10360 ileri BEF 10980 geri	5'-TTT ACT AGA ACT CAT GAG-3' 5'-GAT CCG AAC AGC AAG TGT-3'	620 bç
BEF 10960 ileri BEF 11580 geri	5'-GGA CAC TTG CTG TTC GG-3' 5'-ATA CCT CTG ATT GTT TTT-3'	620 bç
BEF 11560 ileri BEF 12180 geri	5'-TCA AAA ACA ATC AGA GGT-3' 5'-CCA CCT GAA CTC ACT CT-3'	620 bç
BEF 12160 ileri BEF 12780 geri	5'-AGT AGA GTG AGT TCA GGT-3' 5'-GTT CCT TGA AGT GCC AGT-3'	620 bç
BEF 12760 ileri BEF 13380 geri	5'-AAA CTG GCA CTT CAA GGA-3' 5'-TTA TTT TCT GAA CTT TG-3'	620 bç
BEF 13360 ileri BEF 14160 geri	5'-TCA CAA AGT TCA GAA AAT-3' 5'-AAT AAT TCT CGA GCT CTT-3'	800 bç
BEF 14140 ileri BEF 14900 geri	5'-GAA AGA GCT CGA GAA TT-3' 5'-ACG AAG AAA AAC AAA T-3'	760 bç

Dizayn edilen primerler ile gerçekleştirilen cDNA sentez aşamasından sonra Tablo 4'de belirtilen miktarlardaki karışım PCR tüplerinde bir araya getirildi. PCR adımı Platinum Taq DNA polimeraz (Invitrogen, CA. A.B.D.) enzim ve solüsyonları kullanılarak gerçekleştirildi.

Toplanan karışım ısı döngü cihazına (GeneAmp® PCR sistem 9700, CA. A.B.D.) yerleştirildi ve belirtilen ısı döngü prosedürü uygulandı.

Tablo 4. BEFV tam genom kısmi primerleri ile PCR adımı

Bileşen	Hacim	Isı Döngü	Prosedürü	
10X Buffer	5 µl	94°C	5dk	
MgCl ₂ (50mM)	1.5 µl			
dNTP karışım (10 mM)	1 µl	94°C	1dk	} 35 Döngü
Primer karışım (10 µM)	2 µl	48-55°C	1dk	
Templeyt (cDNA)	3 µl	72°C	2dk	
TaqDNA Polimeraz (5U/µl)	0.5 µl			
Su	37 µl	72°C	7dk	
Toplam hacim	50 µl			

PCR aşaması sonrasında elde edilen amplikonlar %1 agaroz jele 100 baz çift DNA merdiveni (Solis Biodyne, Estonya) ile birlikte yüklendi ve 130 volt (V) 40 dk elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Beklenen bant büyüklüklerinin jelde tespit edilmesinin ardından jelden DNA ekstraksiyonu aşamasına geçildi. Bu aşamada transillüminatör üzerinde ilgili gen bölgelerine denk gelen jel kısımları steril bistüri yardımı ile özenle kesilerek çıkarıldı ve ayrı mikrosantrifüj tüplerine konuldu. Agaroz jelden DNA pürifikasyonu PureLink™ QuickGel ekstraksiyon ticari kiti (Thermo Fisher, MA. A.B.D.) kullanılarak gerçekleştirildi. Mikrosantrifüj tüpüne alınan ~400 mg jel parçasına üç kat hacimde ~1.2 ml jel çözücü solüsyon ilave edildi. Ardından mikrosantrifüj tüpü 50°C'daki ısı bloğunda jel tamamen çözününceye kadar (en az 10 dk) bekletildi. Bu süre içerisinde ısı bloğundaki tüp üç dakika aralıklarla vortekslenerek ısıl işlem devam ettirildi. Jel tamamen çözündükten sonra kit içerisindeki kolonlara bırakıldı ve 12000 rpm'de bir dk santrifüj edildi. Kolon yıkama tüpüne yerleştirilerek üzerine 500 µl yıkama solüsyonu bırakıldı ve 12000 rpm'de bir dk santrifüj edildi.

Toplama tüpüne alınan kolon üzerine 50 µl elüsyon solüsyonu bırakıldı ve bir dk oda ısısında inkübasyonun ardından santrüfuj işlemi tekrar edildi. DNA miktarı 1 µl sulandırma solüsyonu ile blank işlemi sonrasında karışımdan 1 µl alınarak NanoDrop™ 2000 cihazında ölçüldü ve 260/280 nm absorbansı dikkate alınarak saflığı belirlendi.

Elde edilen pürifiye ampikonların dizi analizi çift yönlü okuma ile (İontek, Türkiye) ABI 310 Genetik Analiz® sisteminde (Thermo Fisher, PA. A.B.D.) gerçekleştirildi. Gen dizilerin hizalanması (alignment) işleminde ClustalW programı kullanıldı ve veriler gen bankası veritabanına yüklendi (Accession number: KY012742-BEFV/Ad12/TUR). BEFV/Ad12/TUR ve gen bankasında mevcut diğer BEFV izolatların G geni dizileri kullanılarak filogenetik analiz işlemi gerçekleştirildi. Filogenetik analizde MEGA5 programı ve neighbor-joining metodundan faydalanıldı (142). Buna ek olarak MEGA5 ile G protein antijenik bölgeleri (G1-G2-G3) amino asit dizilim kıyaslaması yapıldı. BEFV/Ad12/TUR izolatının tüm genleri nükleotit ve amino asit dizilimi yönünden Çin (Bovine/China/Henan1/2012) ve Avustralya izolatı (BB7721) ile kıyaslanarak benzerlikleri hesaplandı. Ayrıca SimPlot paketi (v3.5.1) ile benzerlik eğrisi (Smilarity plot) ve bootstrap analizi (1000 replikasyon) yapılarak üç izolat homolog rekombinasyon yönünden incelendi.

4.2. BEFV G ve N Gen Bölgelerinin Moleküler Klonlaması

4.2.1. Fare Beyni Adapte BEFV'nin Vero E6 Hücrelerinde Üretimi

Dondurucudan çıkarılan bir adet Vero E6 hücre stoğu 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda (Memmert, Schwabach, Almanya) hızla çözündürüldü. Çözdürülen 1 ml hücre stoğu DMEM F12 Ham (Sigma-Aldrich, MO. A.B.D.) ile 10 kat sulandırılarak 1000 rpm'de beş dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernantın uzaklaştırılmasının ardından hücre peleti önce 1 ml ardından 5 ml hücre üretme vasatı (%10 Fötal Bovine Serum-FBS (Life Technologies, CA, A.B.D.), %1 antibiyotik-antimikotik (Sigma-Aldrich, MO. A.B.D.), DMEM-F12 ile resüspanse edilerek T25 hücre kültür kabına (Greiner, Kremsmünster, Avusturya) geçildi ve 37°C inkübatöre kaldırılarak kültüre edildi. Yeterli miktarda çoğaltılan Vero E6 hücreleri %80 oranında kültür kabını kapladığında buzda çözündürülen fare beyni (BALB/c) adapte BEFV ile adsorpsiyon yöntemiyle virüs ekimi yapıldı. Virüs üretimi amacıyla, 2012 yılında Güneydoğu illerinde ortaya çıkan BEF salgınından elde edilen ve -80°C dondurucuda muhafaza edilen fare beyni adapte virüs izolatu (3. pasaj) (2012TRADYMN-Genbank-KC788421.1-KC688889.1) kullanıldı. Hücreler mikroskop altında incelenerek meydana gelen değişiklikler aşama aşama görüntülerek kaydedildi.

Vero E6 hücrelerinde çoğaltılan BEFV izolatu kültür kabındaki hücrelerin ~%70'ini parçaladığında hücreler RNA izolasyonunda kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

4.2.2. BEFV RNA İzolasyonu

Dondurucudan çıkarılan enfekte hücrelerin oda ısında çözünmesi beklenerek ısı şoku ile parçalanması sağlandı. Aynı işlem bir kez daha tekrar edildi. Kültür kabındaki virüs-hücre süspansiyonu otomatik pipet ile çekilerek 15 ml hacimli santrifüj tüplerine aktarıldı. Daha sonra bu tüpler soğutmalı santrifüjde (Beckman Coulter X22, CA, A.B.D.) +4°C 1000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Bu işlem sonunda süpernatantdan 140 µl RNA ekstraksiyonu amacıyla alındı, kalan supernatantlar ise 1’er ml beş adet dondurma viallerine pay edilerek -80°C dondurucuya kaldırıldı.

Virüs kültür süpernatantından viral RNA ekstraksiyon işlemi QIAamp® viral RNA mini kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) ile kitin kullanım talimatı birebir uygulanarak gerçekleştirildi. Öncelikle 2 ml hacimli ependorf tüp içerisindeki 140 µl virüs kültür süpernatantı üzerine 560 µl AVL (Lysis buffer) ilave edilerek bu karışım 15 sn vortekslendi. Oda ısısında 10 dk inkübasyonun ardından bu karışım üzerine 560 µl saf etanol ilave edilip 15 sn vortekslenerek karışımın iyice homojen hale gelmesi sağlandı. QIAmp filtreli tüpler içerisine (kolon) 630 µl homojen haldeki karışım ilave edildi. Kolonların soğutmalı santrifüje yerleştirilmesinin ardından 8000 rpm’de bir dk santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemin ardından kolon yeni bir boşaltma tüpüne yerleştirilerek kalan karışım (630 µl) kolon üzerine bırakıldı ve santrifüj işlemi tekrar edildi. Yeni bir boşaltma tüpüne alınan kolon üzerine 500 µl AW1 yıkama solüsyonu bırakılmasının ardından tüpler 8000 rpm’de bir dakika santrifüj edildi. Bu işlemin ardından yeni boşaltma tüpüne alınan filtre üzerine 500 µl AW2 yıkama solüsyonu eklendi ve 14000 rpm’de üç dakika santrifüj edildi. Santrifüj

işlemi sonrası kolon toplama tüpüne alınarak üzerine 60 µl AVE elüsyon solüsyonu ilave edildi Oda ısısında inkübasyonun (bir dk) ardından 8000 rpm’de bir dk santrifüj adımı gerçekleştirildi ve bu işlemin ardından filtre uzaklaştırılarak RNA ekstraksiyon işlemi sonlandırıldı. Ekstraksiyon aşamasındaki tüm santrifüj işlemleri oda ısısında gerçekleştirildi.

4.2.3. RT-PCR ile İnzört Bölgelerin Çoğaltılması ve Saflaştırılması

Fare beyni adapte BEFV’den elde edilen genomik RNA’ların cDNA’ya dönüştürülmesi işlemi High Fidelity Transcriptor cDNA sentez kiti (Roche, Basel, İsviçre) ile ticari firmanın kullanım talimatları yerine getirilerek gerçekleştirildi. Kitin talimatları uyarınca hazırlanan primer templeyt karışımı Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5. Random primer-templeyt karışımı

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
Total RNA	3 µl	1 µg
Random hexamer primer (600 pmol)	2 µl	60 µM
Su	8 µl	
Toplam Hacim	13 µl	

PCR tüplerinde hazırlanan bu karışım ısı döngü cihazında 65°C’de 10 dk ön ısıtma işlemi uygulandı ve karışım buz üzerine alındı. İkinci bir tüpde Tablo 6’da belirtilen miktarda reaksiyon solüsyonları hazırlandı ve buz üzerindeki karışım ile bir araya (20 µl) getirildi.

Tablo 6. Reaksiyon solüsyonları

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
Reverz transkriptaz buffer (5x)	4 µl	
Deoksinükleotit her biri 10 mM	2 µl	1 mM
RNAaz inhibitör (40U/µl)	0.5 µl	20 U
Transkriptör RT enzim 20U/µl	0.5 µl	10 U
Toplam Hacim	7 µl	

cDNA sentez adımı 45°C’de, 30 dk ve 85°C’de, beş dakika inkübasyon sonrası sonlandırıldı. Elde edilen cDNA’lar moleküler klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C dondurucuya kaldırıldı.

Gen bankasında mevcut BEFV sekans verileri kullanılarak tam uzunlukta G ve N geni açık okuma bölgesini (Open reading frame-ORF) çoğaltacak primerler dizayn edildi. Bu primer dizilimleri ve bölge uzunlukları Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7. BEFV G ve N gen bölgelerini çoğaltmada kullanılan primerler

Primer	Nükleotit dizilimi	Ürün
BEF G (ORF) ileri	5’ ATG TTC AAG GTC CTA ATA ATT ACC 3’	1874 bç
BEF G (ORF) geri	5’ TTA ATG ATC AAA GAA CCT ATC 3’	
BEF N (ORF) ileri	5’ ATG TAC TGC ACA TTG AAT AAG 3’	1372 bç
BEF N (ORF) geri	5’ CTA AAC AAT TGA AGC TAA GTA 3’	

PCR adımı Platinum Taq polimeraz (Invitrogen, CA. A.B.D.) enzim ve solüsyonları kullanılarak gerçekleştirildi.

Kullanılan solüsyonlar, miktarları ve ısı döngü prosedürü Tablo 8’de verilmiştir.

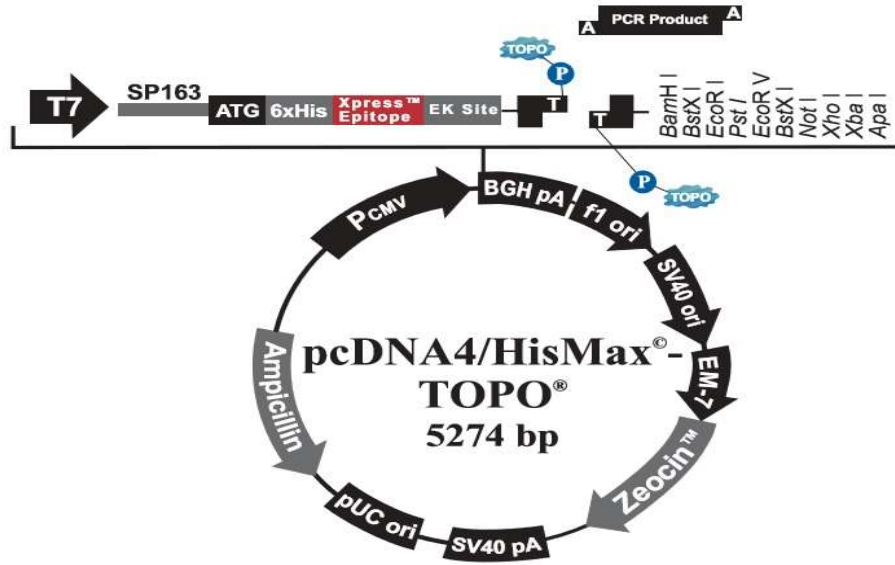
Tablo 8. BEFV G ve N genlerinin çoğaltılması için PCR adımı

Bileşen	Hacim	Isı Döngü Prosedürü
10X Buffer	5 µl	94°C 5 dk
MgCl ₂ (50 mM)	1.5 µl	94°C 1 dk
dNTP karışım (10 mM)	1 µl	50°C 1 dk
Primer karışım (10µM)	2 µl	72°C 2 dk
Templeyt (cDNA)	3 µl	
TaqDNA Polimeraz	0.5 µl	72°C 7 dk
Su	37 µl	
Toplam Hacim	50 µl	

PCR adımı sonrasında jel elektroforez adımına geçildi ve elde edilen amplikonlar %1 agaroz jele, DNA merdiveni (100 baz çift, Solis Biodyne, Estonya) ile birlikte yüklendi. 130 V 40 dk elektrik akımının ardından jel görüntüleme cihazında (VILBER, Almanya) görüntülendi.

Agaroz jelden DNA pürifikasyonu ticari kit PureLink™ QuickGel ekstraksiyon kiti (Thermo Fisher, MA. A.B.D.) kullanılarak yukarıda detayı belirtilen prosedüre göre gerçekleştirildi.

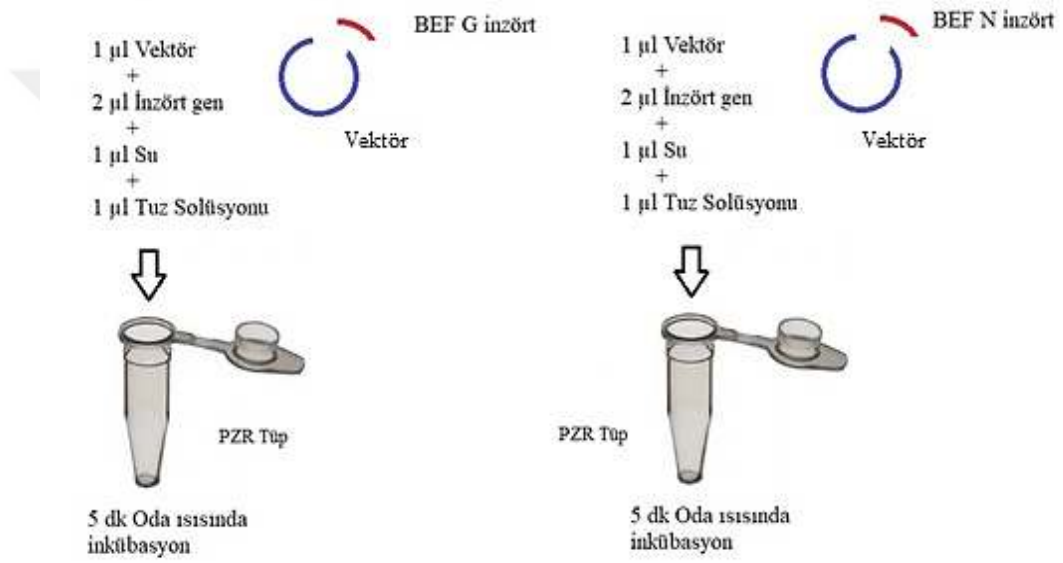
BEFV G ve N geni cDNA kopyaları moleküler klonlama çalışmaları için inzört (plazmide aktarılan gen bölgesi) olarak kullanıldı. Moleküler klonlama pcDNA4/HisMax[®] TOPO[®] TA ekspresyon kiti (Thermo Fisher, MA. A.B.D.) kullanılarak gerçekleştirildi. Klonlama çalışmaları için kullanılan ekspresyon vektörü Şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 6. Moleküler klonlama çalışmasında kullanılan pcDNA4/HisMax[®] TOPO[®] TA ekspresyon vektörü haritası

4.2.4. İnzört Bölgelerin Ekspresyon Vektörüne Ligasyonu ve Kimyasal Transformasyonu

BEFV G ve N inzört genlerin ligasyon ve transformasyonunda klonlama kitinde belirtilen prosedür uygulandı ve adımlar Şekil 7’de şematize edildi. Şekilde belirtildiği gibi PCR tüpünde toplanan karışımın (5 µl) inkübasyonu sonunda pcDNA4-G ve pcDNA4-N rekombinant vektörleri elde edildi.



Şekil 7. BEFV G ve N inzört genlerin ligasyonu

Ligasyon adımının tamamlanmasının ardından kimyasal transformasyon adımına geçildi. Öncelikle kit içeriğinde bulunan iki adet TOP10 kompeten hücresi (*E.coli* bakteri) buz kalıbı üzerine alınarak yavaşça çözündürülmesi sağlandı. Çözünen kompeten hücreleri buz kalıbından ayrılmadan bir kompeten hücresi için 5 µl pcDNA4-G ligasyon ürünü ve diğer kompeten hücresi içinse 5 µl pcDNA4-N ligasyon ürünü ilave edildi. Tüpler isimlendirilmesinin ardından dip kısmından

hafifçe sarsılarak karışması sağlandı ve buz kalıpları üzerinde inkübasyona (30 dk) alındı. İnkübasyonun ardından her bir tüp 42°C'ye ayarlanmış su banyosu içerisinde 90 sn tutularak kompeten hücrelerin porlarının genişlemesi ve süre sonunda yeniden buz kalıpları üzerine alınması ile porların küçülmesi ve plazmidlerin kompeten hücreye hapsedilmesi (kimyasal transformasyon) sağlandı. Her bir tüp üzerine 400 µl antibiyotiksiz besi yeri (LB Medium) ilave edilerek tüpler 37°C'de 90 dk çalkalayıcı üzerinde (180 rpm) karışması sağlandı. Bu işlemlerin ardından muhtemel rekombinant vektörleri geniş çapta çoğaltacak kompeten hücrelerin kimyasal transformasyon adımı tamamlandı. Kimyasal transformasyon adımıdaki aynı işlemler eş zamanlı olarak kit içeriğindeki pcDNA4-*lacZ* kontrol plazmidi için gerçekleştirildi.

4.2.5. Koloni Tarama Yöntemi ile Kimyasal Transformasyonun Doğrulanması

Ligasyon ve kimyasal transformasyon işlemlerinin başarılı olup olmadığını belirlemek ve sadece bu özellikleri taşıyan bakteri kolonilerin üretimi amacıyla transformasyon ürünleri alev beki etrafında antibiyotikli katı besi yerine (LB agar-Ampisilin 60µl/ml) ekildi. Bu amaçla muhtemel rekombinant vektörler için (pcDNA4-G ve pcDNA4-N) için ayrı ayrı üç adet antibiyotikli katı besi yeri hazırlandı ve 50-150-300 µl miktarında transformasyon ürünleri farklı besi yerleri üzerlerine bırakılarak cam baget ile dairesel hareketlerle yayıldı. Bu işlemin ardından 15 dk aleve dönük şekilde yarı açık tutulan petriler süre sonunda kapakları kapatılıp ters çevrilerek 37°C inkübatöre konuldu ve bir gece inkübe edildi. Bu süre sonunda oluşan koloniler görüntülendi.

Katı besiyerinde oluşan kolonilere PCR-koloni tarama testi yapılarak rekombinant vektörlerin varlığı araştırıldı. Bu amaçla her bir koloninin numaralandırılmasının ardından steril pipet ucunu koloniye hafif değdirip PCR adımında kullanılacak kadar su bulunan PCR tüpüne daldırıldı. PCR tüplerinin 94°C'ye ayarlanmış ısı döngü cihazında 10 dk tutulması ile kompeten hücrelerin parçalanması sağlandı. Bu işlemin ardından kalan PCR solüsyonları tüp içerisine ilave edilerek BEF G (ORF) ve BEF N (ORF) primerleri ile PCR testi yapıldı. Elde edilen ampikonlar %1 agaroz jelde görüntülendi.

4.2.6. Rekombinant pcDNA4-G ve pcDNA4-N Plazmidlerin

Saflaştırılması ve Ligasyonun Doğrulanması

pcDNA4-G-TOP10 ve pcDNA4-N-TOP10 olarak adlandırılan kolonilerden 15 ml hacimli sıvı besiyerine (LB Medium, Ampisilin 60 µg/ml) birer adet bırakıldı ve 37°C'de çalkalayıcı (IKA, Almanya) üzerinde bir gece çoğaltılması sağlandı. İlgili kompeten hücrelerin saklanarak muhafaza edilmesi amacıyla gliserol stoğu hazırlandı. Bu amaçla bir gece çoğaltılan kompeten hücrelerden 500 µl alınarak eşit hacimde gliserol (Sigma-Aldrich, MO, A.B.D.) ile kibarca karıştırılarak -80°C'ye kaldırıldı. Kalan hacimden ise PureLink™ Miniprep plazmid pürifikasyon kiti (Thermo Fisher, MA, A.B.D.) kullanım talimatı birebir uygulanarak saf plazmid elde edildi. Aynı işlemler eş zamanlı olarak ekspresyon kiti içeriğindeki pcDNA4-lacZ kontrol plazmidini için gerçekleştirildi.

Saf pcDNA4-G ve pcDNA4-N rekombinant vektörlerinde ligasyonun doğrulanması amacıyla BEFV G (ORF), BEFV N (ORF) primerlerin ve ekspresyon vektörüne ait primerlerin kullanıldığı PCR adımı gerçekleştirildi. Kit

içeriğindeki ekspresyon vektörüne ait primerlerin dizilimleri Tablo 9’da verilmiştir. Ekspresyon vektörlerine ait primerler ile gerçekleştirilen PCR adımıda kullanılan solüsyon miktarları ve ısı döngü prosedürü Tablo 10’da gösterilmiştir.

Tablo 9. Ligasyon doğrulamada kullanılan ekspresyon vektörüne ait primerler

Primerler	Dizilimleri	Konsantrasyonu
Xpress™ İleri	5'-TATGGCTAGCATGACTGGT-3'	342 pmol
BGH geri	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'	348 pmol

Tablo 10. Vektöre ait primerler ile PCR adımı

Bileşen	Hacim	Isı Döngü Prosedürü	
MgCl ₂ (50 mM)	0.5 µl	94°C 5 dk	
10X Buffer	5 µl	94°C 1 dk	} 35 Döngü
dNTP karışım (50 mM)	1 µl	55°C 1 dk	
Primer karışım (3.4 µM)	3 µl	72°C 3 dk	
Plazmid (25 ng)	2 µl		
TaqDNA Polimeraz (5U/µl)	1 µl	72°C 15 dk	
Su	37.5 µl		
Toplam Hacim	50 µl		

Elde edilen amplikonlar %1'lik agaroz jelde elektroforezi sonrası görüntülendi. Beklenen büyüklükteki amplikonlar stop kodonu varlığı ve inzörtlerin yerleşimi yönünden incelemek üzere sekanslandı (İontek, Türkiye).

4.3. Vero E6 Ökaryotik Hücrenin Rekombinant pcDNA4-G ve pcDNA4-N Plazmidleri ile Transfeksiyonu

4.3.1. Geçici Transfeksiyon

Saf olarak elde edilen plazmid DNA miktarı NanoDrop™ 2000 Spektrofotometre ile ölçüldü. Daha sonra Lipofektamin 2000 (Thermo Fisher, MA. A.B.D.) ticari ürünü kullanılarak plazmidlerin Vero E6 hücrelerine transfeksiyonu gerçekleştirildi. Transfeksiyon aşamasında lipofektamin ürün içerisindeki kullanım talimatı uygulandı. Bu amaçla; T12.5 kültür kabında kültüre edilen Vero E6 hücresi zemini %70-80 oranında kaplayacak şekilde çoğalma göstermesiyle transfeksiyon işlemine başlandı. Kültür kabındaki hücre üretme vasatı uzaklaştırılarak hücre yüzeyi beş kez steril PBS ile yıkandı ve içerisine %2 oranında FBS içeren 2.5 ml DMEM-F12 bırakıldı. Bir mikrosantrifüj tüpünde 15 µl lipofektamin 150 µl DMEM-F12 karıştırılarak seyreltildi. Farklı mikrosantrifüj tüpünde ise 3.5 µg pcDNA4-G plazmidi toplam hacim seyreltilmiş lipofektamin miktarı ile aynı olacak (165 µl) şekilde DMEM-F12 ile seyreltildi. Böylece farklı iki tüpte eşit miktarda seyreltilmiş pcDNA4-G ve lipofektamin oluşturuldu. Oda ısısında beş dakika inkübasyonun ardından bu iki karışım tek tüpte toplandı (1:1). Tek tüpte toplanan karışım oda ısısında (10 dk) inkübe edildi. Daha sonra karışım pipetle çekilerek Vero E6 hücreleri içeren T12.5 kültür kabına aktarıldı. Hafifçe sallanarak vasatla karışması sağlandıktan sonra kültür kapları her gün mikroskop altında incelenmek üzere 37°C inkübatöre konuldu. pcDNA4-G transfeksiyonu

için uygulanan tüm işlemler farklı kültür kabında çoğaltılan Vero E6 hücresine bu kez pcDNA4-N plazmidi için uygulandı ve kültür kabı 37°C inkübatöre kaldırılarak her gün mikroskop altında incelendi. Transfeksiyonun 72. saatinde bu adım sonlandırılarak kalıcı transfeksiyon ve ekspresyonların gösterilmesi adımına geçildi.

4.3.2. Kalıcı (Stabil) Transfeksiyon

pcDNA4/HisMax[] TOPO[] TA ekspresyon vektörü üzerinde iki adet direnç geni bulunmaktadır. Bunlardan biri bakteriyel seleksiyonda yararlanılan prokaryotik Ampisilin direnç geni bir diğeri ise transfekte olan ve olmayan memeli hücrelerin seleksiyonunda yararlanılan ökaryotik yerleşimli Zeocin direnç genidir. Bu nedenle transfekte olmayan hücrelerin elimine edilmesi amacıyla transfekte olmamış hücreler için toksik olan ve ölümüne sebep olan Zeocin kültür ortamına katıldı. “Memeli hücrelerinde toksik olduğu bilinen Zeocin antibiyotiği sağlıklı Vero E6 hücresini ne kadar miktarda ve ne sürede öldürebilmektedir” sorusunu aydınlatmak için öncelikle Vero E6 hücrelerine Zeocin duyarlılık testi yapıldı.

Bu amaçla dört adet T12.5 hücre kültür kabında Vero E6 hücreleri üretildi. Kültüre edilen hücrelerden biri kontrol grubunu oluşturdu. Hücre retme vasatı olarak her bir hücre kültür kabına 2.5 ml hücre üretme vasatı (%10 FBS, DMEM-F12) ve antibiyotik grubuna ise bu vasata ilave olarak her birine sırayla 200-100 ve 60 g/ml olacak şekilde Zeocin eklendi. Hücreler her gün mikroskop altında gözlendi. Test sonrası belirlenen miktardan kalıcı transfeksiyon işleminde faydalanıldı.

Zeocin miktar tayinini takiben geçici transfeksiyon adımımda olduğu gibi T12.5 kültür kabı zeminini ~%70 oranında kaplamış Vero E6 hücresi bu çalışmada kullanıldı ve transfeksiyon işlemi aynı prosedürle gerçekleştirildi. Transfekte hücreler 72 saat kültüre edildi. Bu saatin sonunda transfekte hücrelerin kültür sıvısı uzaklaştırılarak taze vasat (%10 FBS, DMEM F-12) konuldu ve kültür işleminin devamı sağlandı. Ayrıca selektif bir ortam sağlanması için vasat içerisine Zeocin antibiyotik (Thermo Fisher, MA. A.B.D.) ilave edildi. Üç günde bir hücrelerin vasatı değiştirildi ve yine aynı miktarda Zeocin içeren vasat ilave edildi. Bu işlem yaklaşık 21 gün süreyle devam ettirildi. Bu süre sonunda hücreler selektif ortam altında pasajlanarak çoğaltıldı ve bir kısmı ise donduruldu.

4.4. Rekombinant pcDNA4-G ve pcDNA4-N Plazmidlerin Vero E6 Hücresinde Ekspresyonlarının Gösterilmesi.

4.4.1. Ekspresyonların RT-PCR ile Gösterilmesi

Gen ekspresyonlarının mRNA düzeyinde gösterilmesi genel uygulama yöntemlerinden biridir. Bu amaçla; T12.5 kültür kabında üretilen geçici ve kalıcı transfekte pcDNA4-G-Vero E6 ve pcDNA4-N-Vero E6 hücreleri kullanıldı. Kültüre edilen bu hücrelerin vasatları uzaklaştırılarak steril PBS ile yıkandı ve hücreler -80°C dondurucuya ardından 37°C'ye kaldırılarak ısı şoku ile parçalanması sağlandı. Elde edilen hücre lizatı mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. mRNA elde edilmesi amacıyla viral RNA ekstraksiyon QIAamp® viral RNA mini kiti (QIAGEN, Hilden, Almanya) kullanıldı. BEFV RNA izolasyonu adımımda anlatıldığı gibi ekstraksiyon prosedürü kitin kullanım talimatı birebir uygulanarak yerine getirildi. Elde edilen RNA'nın miktarı ölçüldü ve saflığı belirlendi. RNA örneklerinin cDNA'ya dönüştürülmesi işlemi High Fidelity Transcriptor cDNA

sentez kiti (Roche, Basel, İsviçre) ile gerçekleştirildi. RT aşamasında kullanılan primer templeyt karışımı Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11. Oligo(dT) primer-templeyt karışımı

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
Total RNA	3 µl	1 µg
oligo(dT)18 Primer (50 pmol)	1 µl	2.5 µM
Su	8 µl	
Toplam Hacim	13 µl	

mRNA düzeyinde ekspresyonu belirlemek için RT aşamasında random hexamer yerine mRNA’daki poliA kuyruğuna bağlanan ardışık olarak 18 adet timidin taşıyan oligodT primeri kullanıldı. PCR tüplerinde hazırlanan bu karışım ısı döngü cihazına konuldu ve 65°C’de 10 dk ön ısıtmanın ardından Tablo 6’da belirtilen oranda reaksiyon solüsyonları eklendi ve cDNA sentez adımı ısı döngü cihazında 45°C’de, 30 dk ve 85°C’de, beş dakika inkübasyon sonrası sonlandırıldı. rekombinant G ve N geni cDNA kopyaları elde edildi. Elde edilen cDNA’lardan BEF G ve N gen spesifik primerleri kullanılarak PCR yapıldı.

4.4.2. Ekspresyonların İmmunoperoksidaz Testi ile Gösterilmesi

İmmunoperoksidaz deneyi altı kuyucuklu hücre kültür kaplarında (Sigma-Costar plate, MO. A.B.D.) gerçekleştirildi. Bu amaçla, her bir kuyucuğa 2 ml normal Vero E6 hücresi (300.000/ml) geçildi. Altı kuyucuktan 2’si pcDNA4-G ile diğer 2’si pcDNA4-N ile transfekte edildi. Diğer 2 kuyucuk ise hücre kontrol

olarak ayrıldı. Transfeksiyonun 72. saatinde immunoperoksidaz deneyi yapıldı. Farklı bir pleyte ise stabil G ve N hücreleri kültüre edildi ve eş zamanlı olarak immunoperoksidaz (IP) deneyi yapıldı. Öncelikle 72. saatin sonunda hücrelerin vasatı uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 1'er ml %2 paraformaldehit solüsyonu eklenerek 30 dk oda ısısında muamele edildi. Tespit solüsyonu belirtilen süre sonunda uzaklaştırıldı ve hücreler 2 ml PBS ile yıkandı. Ardından hücreler 1 ml %0.1 Triton X-100 ile 15 dk muamele edilerek oda ısısında permeabilizasyonu sağlandı. %0.05'lik PBST-20 solüsyonu içerisinde çözündürülerek hazırlanan %5 yağsız süt tozu ile bir saat oda ısısında bloklama yapıldı. Bir kez PBS ile yıkanan hücreler endojen peroksidaz etkisinin elimine edilmesi amacıyla %3 H₂O₂ ile bir saat muamele edildi. İki kez PBS ile yıkamayı takiben pcDNA4-G transfeke ve kontrol hücre kuyucuğunun her birine PBS içinde 1/50 sulandırılan BEFV G1 proteini spesifik monoklonal antikoru (EMAI, Camden Park, Avustralya) ilave edildi. pcDNA4-N transfeke ve kontrol hücrelerine horse radish peroksidaz (HRP) işaretli 6X-HisTag monoklonal antikoru (Thermo Fisher, MA. A.B.D) (1/5000) ilave edildi. Oda ısısında iki saat inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası en az beş kez PBS ile yıkamalar tekrarlandı. Transfeke G ve kontrol hücrelerine PBS içinde 1/1000 sulandırılan peroksidaz enzimi ile işaretli tavşan anti-fare IgG (Sigma-Aldrich, MO. A.B.D.) eklendi. N plazmid transfeke hücrelerine ise bu süre boyunca PBS konuldu. İki saatlik oda ısısında inkübasyonun ardından hücreler en az beş kez PBS ile yıkandı. Yıkanan hücreler, karanlık ortamda kromojen solüsyonuyla (Diaminobenzidin 6 mg, 0.05 M Tris pH 7.6-9 ml, %3 H₂O₂-1 ml) 15 dk reaksiyona sokuldu. Hücreler, mikroskopik olarak incelendi ve hücrelerin mikrografları alındı.

4.5. Rekombinant Protein Pürifikasyonları

Transfekte hücre lizatından doğal şartlar altında protein pürifikasyonu ticari pürifikasyon sistemi Ni-NTA Spin Kit (QIAGEN, Hilden, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Kısaca, transfekte hücreler tripsin enzimi ile kaldırıldıktan sonra PBS ile yıkandı ve 4°C’de, 1000 rpm’de beş dk santrifüj edildi. Süpernant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti 700 µl lizis buffer (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl, 10 mM imidazol; %1 Triton-X 100, pH 8.0, 1 tablet proteaz inhibe edici kokteyl) ile resüspanse edildi. Resüspanse hücre üzerine DNA-RNA-Protein ile etkileşimlerini ortadan kaldırmak amacıyla 3 U/ml benzonaz-nükleaz (Sigma-Aldrich, MO. A.B.D.) katıldı. Örnekler 15-30 dk buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücre lizatı 4°C’de, 12.000 rpm’de 15-30 dk santrifüj edildi ve süpernatantlar alındı. SDS-PAGE analizi ve pürifikasyon sonrası kıyaslama için 20 µl lizat ayrıldı. Ni-NTA spin kolon 600 µl lizis buffer ile ekülibre edildikten sonra 2900 rpm’de üç dk santrifüj edildi. Ekülibre edilmiş Ni-NTA spin kolon üzerine 600 µl elde edilen lizat bırakıldı ve 1000 rpm’de beş dk santrifüj edildi. Alta geçen sıvı kısım atıldı. Ni-NTA spin kolon 600 µl yıkama buffer ile (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8.0) 900 rpm’de santrifüj edilerek iki dakika sürelerle iki kez yıkandı. Kolon 300 µl elüsyon buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 300-500 mM imidazol, pH 8.0) ile 2900 rpm’de iki dk santrifüj edildi. Bu işlem iki defa tekrarlandı. Elde edilen proteinin miktarı NanoDrop™ 2000 Spektrofotometre cihazında ölçüldü. Proteinin saflığı ve pürifikasyonun başarısı sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile incelendi.

4.5.1. Rekombinant Proteinlerin SDS-PAGE ve Vestern Blot Analizi

4.5.1.1. Akrilamid Jel ve Solüsyonların Hazırlanması

%30 akrilamid/bis solüsyon: 29 gr akrilamid (Merck) ve 1 gr bisakrilamid (Promega) karıştırılarak distile su ile hacim 100 ml'e tamamlandı. 37°C'de çözündürülüp 0.45 µm çaplı filtreden geçirildi.

%10 Amonyum persülfat (APS): 0.1 gr tartılarak 1 ml'e distile su ile tamamlanarak taze hazırlandı.

%10 Ayırıcı jel (10 ml) için: 50 ml hacimli falkon tüp içerisinde 4 ml dH₂O 3.3 ml %30'luk akrilamid/bis solüsyonu, 2.5 ml 1.5 M Tris (pH 8.8), 0.1 ml %10 SDS ve 0.1 ml %10 APS karıştırılarak bir araya getirildi. Son olarak 0.004 ml TEMED ilave edildi ve karışım cam aparatlar arasına aktarılarak oda ısısında katılaşması beklendi.

%5 Yığınlama jel (5 ml) için: 50 ml hacimli falkon tüp içerisinde 1.4 ml dH₂O, 0.33 ml %30 akrilamid, 0.25 ml 1 M Tris-HCL (pH 6.8), 0.02 ml %10 SDS, 0.02 ml %10 APS karıştırılarak bir araya getirildi. Son olarak 0.002 ml TEMED bırakılmasının ardından katılaşmış yığımlayıcı jel üzerine hazırlanan karışım boşaltıldı. 1.5 mm tarak ile kuyucukların oluşması sağlandı.

Tris/Glisin yürütme tamponu: 25 mM Tris, 250 mM glisin (pH 8.3), %0.1 (w/v) SDS distile su ile 1 litreye tamamlanarak çözündürüldü.

Transfer buffer: 3.4 gr Tris, 14.4 glisin, 200 ml metanol ve 800 ml distile su ile 1 lt'e tamamlandı.

Bloklama solüsyonu: 5 gr yağsız süt tozu 100 ml'e PBST-20 ile tamamlanarak %5 (w/v) solüsyon hazırlandı.

Yıkama solüsyonu: 995 ml distile su içerisine 5 ml Tween-20 katılarak %0.5 PBS-T20 (PBS-T20) hazırlandı.

Anti sığır konjugat HRP (Sigma-Aldrich, MO. A.B.D.) 10 µl alınarak %0.01 PBS-T20 solüsyonu ile 10 ml'e tamamlandı, 1/1000 sulandırma yapıldı.

Rabbit- anti mouse konjugat (Sigma-Aldrich, MO. A.B.D.): 10 µl alınarak %0.01 PBS-T20 solüsyonu ile 10 ml'e tamamlandı, 1/1000 sulandırma yapıldı.

Sığır BEFV hiperimmün poliklonal serum: BEFV ELISA kit (EMAI, Camden Park, Avustralya) içeriğindeki yüksek pozitif sığır serumundan 50 µl alınarak 5 ml'e tamamlandı, 1/100 sulandırma yapıldı.

pcDNA4-G ve pcDNA4-N immün fare serumu: 50'şer mikrolitre alınarak farklı tüplerde 5 ml'e tamamlandı, 1/100 sulandırma yapıldı.

4.5.1.2. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE)

Mini-Protean Tetracell jel elektroforez sistemi (Bio-Rad, CA. A.B.D.) kullanılarak SDS-PAGE aşaması gerçekleştirildi. Bu amaçla; %5'lik yığınlama jel ve %10'luk ayırma jel hazırlandı. Protein pürifikasyonu esnasında saklanan hücre lizati ve pürifiye proteinler Laemmli örnek yükleme buffer (2X, Bio-Rad) ile 1:1 oranda karıştırıldı. Laemmli yükleme tamponuna disülfid bağlarını koparma amaçlı %5 oranında beta-merkaptoetanol ilave edildi. Tüm örneklerin denatürasyon işlemi 100°C'de beş dakika bekletilerek gerçekleştirildi ve süre

sonunda örnekler buz üzerine alındı. Jel aparatı dikey elektroforez tankına yerleştirildi yürütme tamponu jel üzerine boşaltıldı. Jel üzerindeki tarak çıkartılıp bir miktar daha tampon bırakıldıktan sonra hazırlanan örnekler kuyucuklara yüklendi. Yüklemenin ardından 130 V'da 120 dk elektrik akımı uygulandı.

Süre sonunda akrilamid jellerden benzerleri gümüş boyama ve Western blot için ayrıldı. Gümüş boyama adımı Sambrook ve ark. belirttiği protokol birebir uygulanarak gerçekleştirildi (143).

4.5.1.3. Western Blot Analizi

Jeldeki proteinlerin poliviniliden diflorid (PVDF) (Millipore Co., MA, A.B.D.) membrana transferleri mini-transblot transfer sistemi (Bio-Rad, CA, A.B.D.) kullanılarak gerçekleştirildi. Transfer işleminden önce PVDF membran metanol içerisinde beş dakika bekletilerek aktifleştirildi. SDS-PAGE sonunda ayrıştırılmış proteinlerin bulunduğu %10'luk jel, transfer tampon bulunan bir kap içerisinde aktifleştirilmiş PVDF membran ile karşı karşıya getirildi. Transfer membranı ve jelin, dış yüzlerine birer filtre kağıdı ve fiber kağıt eklenip, jel tutucu kaset içine yerleştirilerek sıkıştırıldı. Jel tutucu kaset buz aküsü ile birlikte manyetik karıştırıcı üzerindeki transfer tankı içerisine yerleştirildi. Tank belirtilen seviyeye kadar transfer buffer ile dolduruldu ve manyetik karıştırıcı 250 rpm'e ayarlandı. Transfer adımı 100 V 1 saat elektrik akımı ardından sonlandırıldı. Transfer adımından sonra bloklama adımına geçildi. Membran hazırlanan bloklama solüsyonu ile +4°C 60 rpm'de karıştırılarak bir gece muamele edildi. Bloklamayı takiben membran birkaç kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve 1/100 oranında sulandırılan ticari ELISA kitinden (EMAI, Camden Park, Avustralya)

temin edilmiş BEFV'ye karşı yüksek miktarda IgG antikoru taşıyan sığır serum içinde oda ısısında iki saat bekletildi. Bu süre sonunda membran yedi kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkamalardan sonra membran 1/1000 oranında sulandırılan HRP işaretli anti-sığır IgG konjugat (Sigma-Aldrich, MO. A.B.D.) içinde bir saat tutuldu. Yıkama tekrarlandı ve membran kromojen-substrat eriyiği (0.05 M Tris pH 7.2, 1 mg/ml diaminobenzidin ve %0.3 H₂O₂) içinde karanlık ortamda, 15 dk bekletildi. Membran, distile suda yıkandıktan sonra jelde belirlenen proteinlerin büyüklükleri moleküler ağırlık büyüklüğü (MW-SDS 200, Sigma-Aldrich, MO. A.B.D.) ile karşılaştırıldı.

4.6. İmmunizasyonda Kullanılacak Materyallerin Hazırlanması

pcDNA4-G ve pcDNA4-N rekombinant vektörleri ve kontrol plazmidi pcDNA4-*lacZ* taşıyan ve -80°C dondurucuda muhafaza edilen transforme haldeki TOP10 kompeten hücrelerin her birinden 2 µl alınarak 50 ml sıvı besi yeri (LB Medium, Ampisilin-60 µg/ml) bulunduran falkon tüplere ekildi. Tüplerin kapakları tam sıkıştırılmadan 37°C inkübatörlü çalkalayıcı üzerinde (180 rpm) bir gece üremeye bırakıldı. Ertesi gün falkon tüpler santrifüj edilerek (4500 rpm-15 dk) elde edilen peletler PureLink Plazmid DNA Pürifikasyon Maxi kiti (Thermo Fisher, MA. A.B.D) ile plazmid eldesi işlemine hazır hale getirildi. Plazmid pürifikasyonu ticari kitin kullanım talimatına birebir uyularak gerçekleştirildi. Bu amaçla bu kolonlar öncelikle 30 ml ekülibrasyon tamponu ile ekülibre edildi. On mililitre resüspansiyon buffer ile resüspanse edilen peletler homojen hale getirildikten sonra üzerlerine aynı hacimde Lysis buffer eklendi. Bu işlem sonunda tüp ağzı kapalı halde birkaç defa ters düz edildikten sonra oda ısısında beş dk inkübe edildi. Süre sonunda (12000 ×g-10 dk) santrifüj edilen lizatların

süpernatantları alınarak ekülibre edilmiş kolonlara aktarıldı ve yer çekimi etkisiyle filtreden geçmesi sağlandı. Kolon üzerine 60 ml yıkama solüsyonu ilave edilerek yer çekimi etkisi ile filtreden geçmesi beklendikten sonra bu kez 15 ml Elüsyon buffer kolon üzerine bırakıldı ve yer çekimiyle 50 ml steril falkona akması sağlandı. Falkon içerisindeki kolon uzaklaştırıldıktan sonra 10.5 ml izopropanol eklenerek DNA çöktürüldü (12000 $\times$ g-30 dk) ve supernatant uzaklaştırıldı ve elde edilen DNA peleti %70 etanol ile yıkanarak son santrifüj işlemi yinelenildi. Elde edilen peletlerin her biri 700 μ g/280 μ l olacak şekilde steril PBS ile sulandırıldı, mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Peletlerin sulandırılması ardından her bir plazmid yedi adet mikrosantrifüj tüpüne 100 μ g/40 μ l olacak şekilde dağıtıldı. Mikrosantrifüj tüplerine dağıtılan 40 μ l sulandırılmış plazmidlerin üzerine 100 μ g plazmid miktarının %10'u oranında (10 μ l) aşı etkinliğini artıracak tahmin edilen ve DNA aşı çalışmalarında kimyasal adjuvan sınıfında yer tutan Lipofektamin 2000 bırakıldı.

BEFV ile immunize edilecek fareler için 1000 PFU/500 μ l titrede fare beyni adapte virüs mikrosantrifüj tüplerinde hazır edildi.

Diğer bir kontrol grubuna verilmek üzere yalnızca steril PBS (50 μ l) içeren mikrosantrifüj tüpleri hazırlandı.

Hazırlanan karışımlar farelerin ilk immunizasyonlarında kullanıldı. İkinci ve üçüncü immunizasyonlar için plazmid çoğaltma, plazmid pürifikasyonu, plazmid sulandırması ve adjuvan ilavesi ve diğer işlemler yukarıda belirtilen şekilde tekrar edildi.

4.7. İmmunizasyonlar

Çalışmada kullanılan tüm hayvanlar Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden (FÜDAM) temin edilmiştir. Ayrıca deney hayvanları üzerinde belirtilen uygulamaların yapılabilmesi için Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (FÜHADYEK) onayı alınmıştır. (*Protokol numarası: 2016/50*)

Çalışmada dört haftalık dişi BALB/c farelerinden oluşan 35 adet deney hayvanı kullanıldı.

Fare deney grupları üç adet çalışma grubu (pcDNA4-G, pcDNA4-N, BEFV immunize) ve iki adet kontrol grubu (plazmid kontrol-pcDNA4-*lacZ* ve PBS kontrol-immunize) olacak şekilde tasarlandı. Bu amaçla her bir gruba yedi adet dişi BALB/c dahil edildi.

Enjeksiyon öncesi aşılama yapılacak hayvanlar ketamin (200 mg/kg/ip) ile sedasyona alındı. Yaklaşık 10 dk sonra enjeksiyon bölgesi %70 etanol ile temizlenen hayvanlara belirtilen miktarlarda aşılama yapıldı.

Tüm enjeksiyonlar 0, 14 ve 21. günlerde farelerin quadriceps kasına yapıldı. BEFV hacim olarak fazla olması sebebiyle periton içi verildi. Her bir gruptaki fareler numara verilerek etiketlendi. Tüm hayvanlardan 0, 13, 20 ve 30. günlerde kuyruk venasından (kuyruk ucunun üst 1/3 lateral) aseptik şartlarda kan alınarak mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Kan serumu eldesi amacıyla +4°C’de bir gece bekletilen tüpler santrifüj edilerek (4000 ×g-15 dk) elde edilen serumlar etiketli yeni tüplere aktarıldı ve testlerde kullanılıncaya kadar -20°C dondurucuya kaldırıldı.

4.8. Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testinde Kullanılacak BEFV'nin Titresinin Belirlenmesi

T75 hücre kültür kabından tripsin ile kaldırılan hücreler bir gece öncesinde altı kuyucuklu hücre kültür pleytine 1×10^6 hücre/kuyucuk olacak şekilde pasajlandı. Ertesi gün fare beyni adapte BEFV'nin DMEM-F12 ile seri dilüsyonları yapıldı. Öncelikle 1.5 ml'lik ependorf tüplere 1080 μ l DMEM-F12 bırakıldı ve ilk tüpe 120 μ l BEFV bırakıldı. Bu tüpten 120 μ l alınarak ikinci tüpe aktarıldı bu şekilde 10^{-1} den 10^{-5} 'e kadar seri sulandırmalar yapıldı ve son tüpten 120 μ l dışarı atıldı. Her aşamada karışım iyice vorteklendi ve buz üzerinde tutuldu. 10^{-2} den itibaren her dilüsyondan 500 μ l alınarak adsorpsiyonlu yöntemle Vero E6 hücrelerine ekimi yapıldı. Pleytin son kuyucuğu hücre kontrol olarak kullanıldı. Virüs ekiminin ardından inokülüm uzaklaştırıldı ve hücreler 2 ml %0.3 overlay vasatı ile (Distile su içerisinde mikrodalgada ısıtılarak çözödürölen %3'lük agarozdan 3 ml alınarak 37°C ısıdaki 27 ml virüs üretme vasatı içerisinde aktarıldı ve kullanılıncaya kadar 37°C'de bekletildi) kaplandı ve mikroskop altında her gün incelendi. Dördüncü günün ardından hücreler 1 ml %4'lük formaldehit solüsyonu ile oda ısısında bir saat süreyle tespit edildi. Vasat ve formaldehit uzaklaştırıldı hücreler PBS ile iki kez yıkandı. Hücreler %0.5 kristal viyole ile 20 dk boyanarak plaklar sayıldı.

Hesaplamalar $\text{PFU/ml} = \text{Tek dilüsyondaki plak sayısı} / \text{inokülüm} \times \text{dilüsyon katsayısı}$ formülü ile yapıldı.

4.9. Deney Gruplarının Antikor Ölçümleri

4.9.1. Plak Redüksüyon Nötralizasyon Testi (PRNT)

Çalışmadan bir gün önce T75 kültür kabında kültüre edilen hücreler tripsin ile kaldırılarak 0.02×10^6 /kuyucuk olacak şekilde 24 kuyucuklu hücre kültür kabına pasajlandı ve hazır hale getirildi.

Dondurucudan (-20°C) çıkarılan tüm fare serum örnekleri oda ısısında çözündürüldü ardından 56°C 'de 30 dk inkübe edilerek inaktive edildi. Mikrosantrifüj tüpüne 20'şer mikrolitre alınan serum örnekleri üzerlerine 180 μl DMEM-F12 ilave edilerek 10 kat sulandırıldı ve vortekslenen karışımdan 100 μl alınarak 100 μl DMEM bulunan mikrosantrifüj tüplerinde seri dilüsyonları yapıldı (1:10-1:20-1:40-1:80) inaktive serum örnekleri 24 kuyucuklu hücre kültür pleytlerinde tekli çalışıldı ve her deney grubu için farklı pleytler kullanıldı. Her bir pleytte deney grubu serumlarına ilaveten dört kuyucuk plazmid kontrol iki kuyucuk virüs kontrol ve iki kuyucuk ise Vero E6 hücre kontrol olarak kullanıldı.

Dondurucudan (-80°C) çıkarılan fare beyni adapte BEFV stoğu 50 PFU/100 μl oranında virüs içerecek şekilde DMEM-F12 ile sulandırıldı. Sulandırılan bu virüsten 100'er mikrolitre alınarak seri sulandırmaları yapılmış serum tüplerine aktarıldı. Karışım vortekslenerek 37°C 'de bir saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından bu karışım (200 μl) 24 kuyucuklu pleytteki vasatı uzaklaştırılan hücreler üzerine ilave edildi ve bir saat süreyle adsorbsiyona bağlı yöntemle ekim yapıldı. Pleytler 15 dk aralıklarla karıştırıldı. İnkübasyon esnasında %0.3'lük overlay vasatı hazırlandı. Bir saatlik sürenin ardından inokülüm pleytin kuyucuklarından uzaklaştırıldı ve hücreler 1 ml overlay vasat ile

kaplandı. Pleytler 37°C %5 CO₂ inkübatöre kaldırıldı. Hücreler mikroskop altında incelenerek CPE odakları yönünden skorlandı (144).

4.9.2. ELISA ile Antikor Ölçümleri

pcDNA4-G immun farelerin antikor varlığı BEFV ticari ELISA (EMAI, Camden Park, Avustralya) kitin modifikasyonu ile belirlendi. pcDNA4-N immun farelerin antikor varlığı ise pürifiye rekombinant N protein bağlı ELISA kullanılarak ölçüldü. Her bir testte antikorlar indirek ELISA prosedürü ile belirlendi.

4.9.2.1. BEFV G ELISA

Ticari BEF ELISA pleytindeki tüm kuyucuklar öncelikle %0.5 PBST-20 içerisinde sulandırılan %5 (w/v) yağsız süt ile bir gece bloklandı.

pcDNA4-G, BEFV, PBS, ve pcDNA4/*lacZ* immun farelerinden elde edilen 0. gün non immun, 1., 2. ve 3. immun serumları 1/100 oranında sulandırıldı. Bloklamanın ardından kuyucuklar yıkama solüsyonu (%0.05 PBST-20) ile iki kez yıkandı. Her bir serum örneği kuyucuklara 100'er mikrolitre bırakıldı. İki saat oda ısısında 50 rpm'de karıştırılarak inkübe edildi. İnkübasyonu ardından yedi kez yıkama yapıldı. Ardından 1/20000 sulandırılan biotin işaretli keçi anti-fare konjugatı (Thermo Scientific, MA. A.B.D) her bir kuyucuğa 100 µl dağıtıldı. ELISA pleyti iki saat oda ısısında 50 rpm'de karıştırılarak inkübe edildi. İnkübasyonun ardından yedi kez yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından 1/5000 sulandırılmış streptavidin HRP (Thermo Scientific, MA. A.B.D) her bir kuyucuğa 100 µl bırakıldı. Pleyt oda ısısında bir saat inkübe edildi. Yıkamaların ardından tetrametilbenzidin (TMB) substrat solüsyonu hazırlandı (1 mg TMB tableti 1ml

DMSO içerisinde çözdürüldü %0.03 hidrojen peroksit içeren 0.05 M sitrat fosfat buffer (pH:5) solüsyonu ile 10 kat sulandırıldı). Bütün kuyucuklara 100'er mikrolitre TMB substrat konuldu ve reaksiyon oluşması için 10 dk karanlıkta inkübe edildi. 100 µl 1M H₂SO₄ ile reaksiyon durduruldu. Pleyt ELISA okuyucuda 450 nm absorbansta okutuldu. Standart sapmalar ve cutoff değerleri hesaplandı istatistiksel analiz gerçekleştirildi.

4.9.2.2. N Protein ELISA

Boş ELISA mikropleyti (Sigma-Aldrich, MO. A.B.D.) stabil transfekte pcDNA4-N hücrelerinden elde edilen pürifiye N proteinleri ile kaplandı. Bu amaçla pürifiye N proteinleri pH 9.6 karbonat tamponu ile 0.5 µg/100 µl olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırılan bu karışım çok kanallı pipet ile her kuyucuğa 100'er mikrolitre bırakıldı. Pleyt bir gece +4°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kuyucuklar iki kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve pleyt %5 (w/v) yağsız süt ile oda ısısında altı saat bloklandı. pcDNA4-N, BEFV, PBS ve pcDNA4/*lacZ* immun farelerinden elde edilen 0. gün non-immun, 1., 2. ve 3. immun serumları 1/100 oranında sulandırıldı. Pleytin yıkama solüsyonu ile iki kez yıkanmasının ardından sulandırılan serum örnekleri her bir kuyucuğa 100'er mikrolitre bırakıldı. Pleyt oda ısısında iki saat 50 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından yedi kez yıkama solüsyonu ile yıkamalar yapıldı. 1/20000 sulandırılan biotinli konjugat (Thermo Scientific, MA. A.B.D) 100'er mikrolitre bırakılarak oda ısısında iki saat inkübe edildi. Yedi kez yıkamanın ardından Streptavidin HRP (Thermo Scientific, MA. A.B.D) 1/5000 bırakıldı. Yıkamalar sonrası kuyucuklara 100 µl TMB substrat bırakıldı. 10-15 dk reaksiyon oluşması beklendikten sonra reaksiyon 100 µl 1M H₂SO₄ ile reaksiyon durduruldu. Pleyt

ELISA okuyucuda 450 nm absorbansta okutuldu. Her bir immunizasyon için Standart sapmalar ve cutoff değerleri hesaplandı. İstatiksel analiz gerçekleştirildi.

4.10. İstatistik ve Hesaplamalar

Nötralizasyon titrelerin hesaplanmasında %50 PRNT kullanıldı. Buna göre negatif serum sulandırılmalarında oluşan plaklar sayıldı ve deney gruplarındaki diğer serum örnekleri ile kıyaslandı. Negatif serum sulandırılmalarındaki plakların %50'sine ve daha azına tekabül eden sulandırılmalar nötralizan titre olarak belirlendi (144).

Nötralizasyon testindeki eşik değer ise 1:10 olarak belirlenmiştir.

İndirek ELISA testlerinde 450 nm absorbanstaki OD değerleri kullanıldı.

ELISA'lara ait cutoff değerleri aynı döneme ait negatif kontrol serumlarının ortalamasına 3 kat standart sapma ilave edilerek hesaplandı.

Araştırmanın istatistiksel analizleri IBM SPSS 22 kullanılarak gerçekleştirildi, grafikler ise GraphPad Prism 5 paket programı (GraphPad, San Diego, CA) ile oluşturuldu.

ELISA değerlerinde grupların normallik analizi yapıldı ve gruplar arası karşılaştırmada veriler normal dağılımı karşıladığından One-way ANOVA testi tercih edildi (145).

Post-Hoc testleri seçiminde ise varyansların homojen olup olmadığı göz önünde bulunarak Tukey (homojen ise) ve Tamhan's T2 (homojen değilse) testi kullanıldı (145).

Nötralizasyon test sonuçları oransal değer içerdiğinden gruplar arası karşılaştırmada Kruskal Wallis H testi tercih edildi. Farklılığın hangi gruplardan

kaynaklandığını belirlemek için Mann Whitney U testi ile ikili grup karşılaştırması yapıldı (145).

İstatistiksel farklılıklar $p \leq 0.05$ olduğunda anlamlı kabul edildi (145).

4.11. Vestern Blotlamada pcDNA4-G ve N İmmun Fare Serumları ile BEFV G ve BEFV N Proteinlerin Gösterilmesi

Vestern blot analizi yukarıda belirtilen prosedürle gerçekleştirilmiştir. Farklılık olarak pürifiye G ve N rekombinant proteinleri yerine akrilamid jeldeki kuyucuklara fare beyni adapte virüs yüklendi. PVDF membranına viral proteinlerin transfer edilmesi ve %5 (w/v) yağsız süt ile bloklama işleminin ardından membranlar yüksek BEF pozitif sığır serumu yerine indirek ELISA'da yüksek OD değeri veren serumlar ile muamele edildi. Memranlardan biri 1/100 sulandırılmış pcDNA4-G immün fare serumu ile diğeri ise pcDNA4-N immün fare serumu ile oda ısısında bir saat inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ile yedi kez yıkamanın ardından membran 1/1000 sulandırılmış keçi-anti fare konjugatı (Sigma-Aldrich, MO. A.B.D.) ile oda ısısında bir saat muamele edildi ve DAB kromojen (Abcam, Cambridge, İngiltere) ile reaksiyon sonrasında membran görüntülendi.

5. BULGULAR

5.1. Bovine Ephemeral Fever Virüs Tam Genom Sekans Analizi

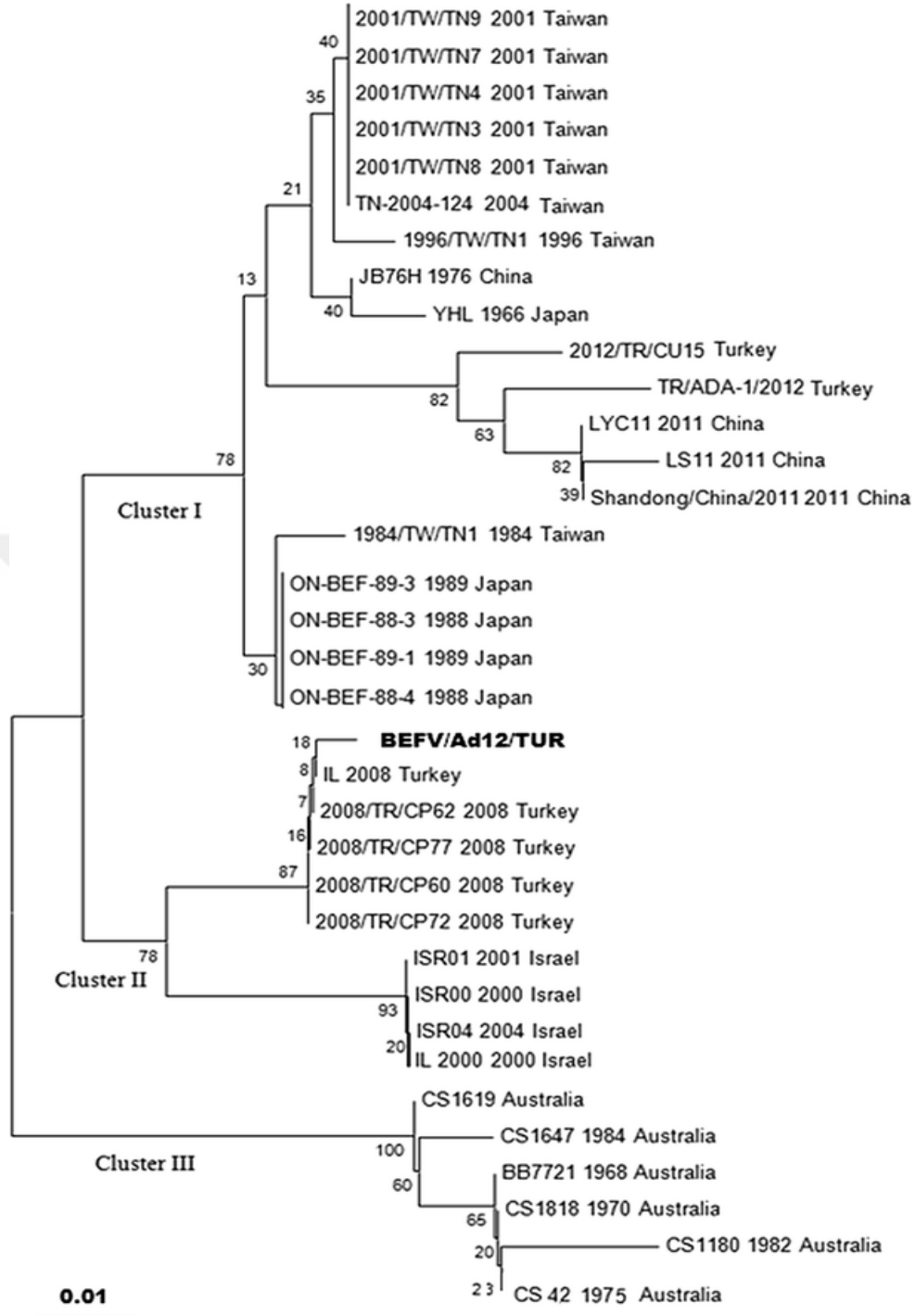
RT-PCR ile çoğaltılan ve sekanslanan BEFV Türk izolatu 14.901 nt uzunluğunda bulunmuştur. Elde edilen sekans dizilimi (BEFV/Ad12/TUR) KY012742 kabul numarası ile gen bankasına sunulmuştur. BEFV Türkiye izolatına ait glikoprotein geni İsrail izolatu ile yakın ilişkili bulunmuştur. Türkiye BEFV izolatu genomu 14.901 nükleotit ve %33.94 oranında G+C ihtiva etmektedir. Çalışmada elde edilen tam genom sekansı nükleotit seviyesinde Avustralya (BB7721) ve Çin (Bovine/China/Henan1/2012) izolatları ile %91-92 oranında benzerlik arz etmektedir. BEFV/Ad12/TUR ile Bovine/China/Henan1/2012 suşu ve BEFV/Ad12/TUR ile BB7721 suşlarının gen ve protein düzeyindeki benzerlikleri Tablo 12’de sunulmuştur.

BEFV/Ad12/TUR izolatu G geni nükleotit dizisi ISR10/3 ve ISR00 iki İsrail izolatına yüksek derecede (%95-97) benzerlik göstermektedir. Diğer taraftan BEFV/Ad12/TUR G geni diğer izolatlara daha az benzerlik göstermiş ve oranları Çin-%93 (Bovine/China/Henan/2012), Japonya-%94 (ON-BEF-88-4), Avustralya-%91 (BB7721) ve Tayvan-%93 (1996-TC-Taiwan izolatu) olarak hesaplanmıştır.

Tablo 12. BEFV Türkiye izolatu (KY012742) ile Avustralya (AF234533) ve Çin (KC788421) izolatu arasındaki nükleotit ve amino asit eşleştirilmesi

Gen	Türkiye-Avustralya		Türkiye-Çin	
	Nükleotit	Amino asit	Nükleotit	Amino asit
G	91%	95%	93%	97%
N	92%	98%	94%	98%
P	87%	83%	88%	87%
M	90%	97%	90%	98%
Gns	91%	92%	89%	71%
Alfa 1	91%	92%	90%	94%
Alfa 2	91%	94%	90%	94%
Beta	95%	94%	91%	97%
Gama	92%	96%	91%	95%
Large	92%	97%	92%	97%

Filogenetik analiz sonrası BEFV/Ad12/TUR izolatu yakın ilişkili olduğu 2000-2001-2004 İsrail ve 2008 BEF Türkiye izolatları ile cluster II'de gruplandırılmış ve filogenetik kümeleri Şekil 8'de gösterilmiştir.



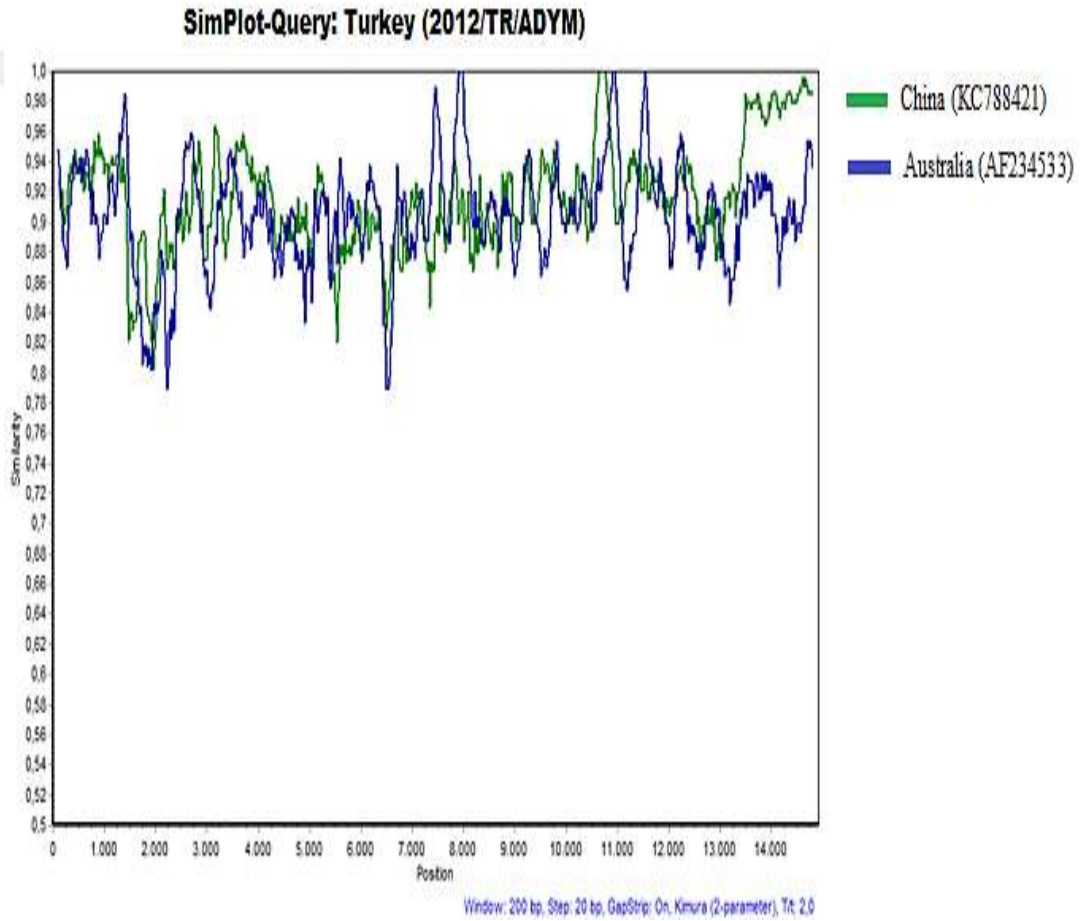
Şekil 8. Gen bankası veri tabanındaki BEFV G gen bölgelerinin nükleotit dizileri kıyaslanarak oluşturulan filogenetik ağaç (MEGA5-neighbor-joining metot)

BEFV G protein antijenik bölgelerin amino asit sekansları Türkiye ve İsrail'den elde edilen BEFV izolatları arasında yüksek derecede korunmuştur. Türk ve İsrail izolatları arasında 503 pozisyonunda bir amino asit farklılığına (T den A ya) rastlanmıştır. Bu antijenik bölgelerdeki amino asit dizisi Çin, Japonya, Tayvan ve Avustralya izolatları ile kıyaslandığında birkaç amino asit varyasyonuna rastlanmıştır (Şekil 9).

		G3		G2		G3		G3		G1	
		49	63	168	189	215	231	262	271	487	503
Australia	887721	QAHHNLAKEHYNKI		FLTPCTINDSKTKGCPKIDITG		KSFRELNDKERLWEAP		LENQTESDFQ		YEEDEKFKPVNLPHEK	
	CS1818					T.....		.K.....			
	CS1647					.K.....					
China	JT02L					ET.....				S.....	
	JB76H	K.....				ET.....		.G.....		S.....	
Taiwan	1984/TW/TN1					A.....ET.....		R.....			
	2001/TW/TN9					ET.....				S.....	
	2001/TW/TN10					N.....				S.....	
Japan	Amakusa-1					ET.....		R.....			
	Azuma					ET.....		R.....			
	ON-BEF-01-3					EY.....				S.....	
	ON-BEF-89-3					T.....ET.....		R.....			
	YHL			.N.....		T.....				S.....	
Turkey	2008/TR/CP62					T.....				S.....T	
	2008/TR/CP77					T.....				S.....T	
	2012/TR/ADYMN					T.....				S.....A	
Israel	ISR 10/1					T.....				S.....T	
	ISR 10/2					T.....				S.....T	

Şekil 9. Farklı ülkelerde ortaya çıkan BEFV'nin G yüzey proteini üzerindeki antijenik bölgelerin (G1, G2 ve G3) amino asit dizilimlerinin hizalanması

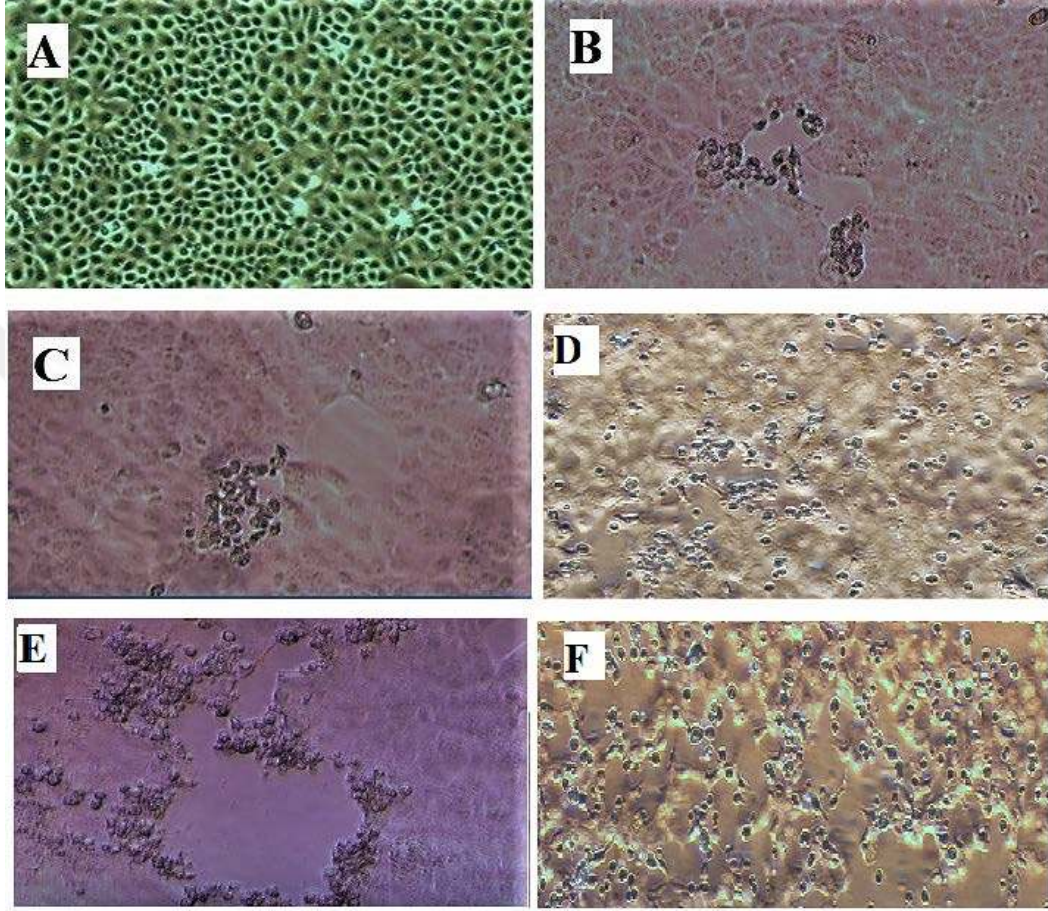
Türkiye, Çin ve Avustralya izolatların tam genom verileri kullanılarak oluşturulan benzerlik analiz sonuçları bu izolatlar arasında herhangi bir homolog rekombinasyon olayının olmadığını ortaya koymuştur (Şekil 10). Bu çalışmanın sonuçlarına göre BEFV/Ad12TUR izolatı Orta Doğu soyunda yer almaktadır.



Şekil 10. SimPlot paket programı kullanılarak oluşturulan Türkiye, Çin ve Avustralya izolatlarının tam genom nükleotit dizilerinin benzerlik grafik analizi ile kıyaslaması

5.2. Bovine Ephemeral Fever Virüsün Vero E6 Hücrelerinde Üretimi

Fare beyni adapte BEFV Vero E6 hücrelerine adsorpsiyonlu yöntemle ekilmiş ve oluşan sitopatik odaklar şekilde gösterilmiştir (Şekil 11).

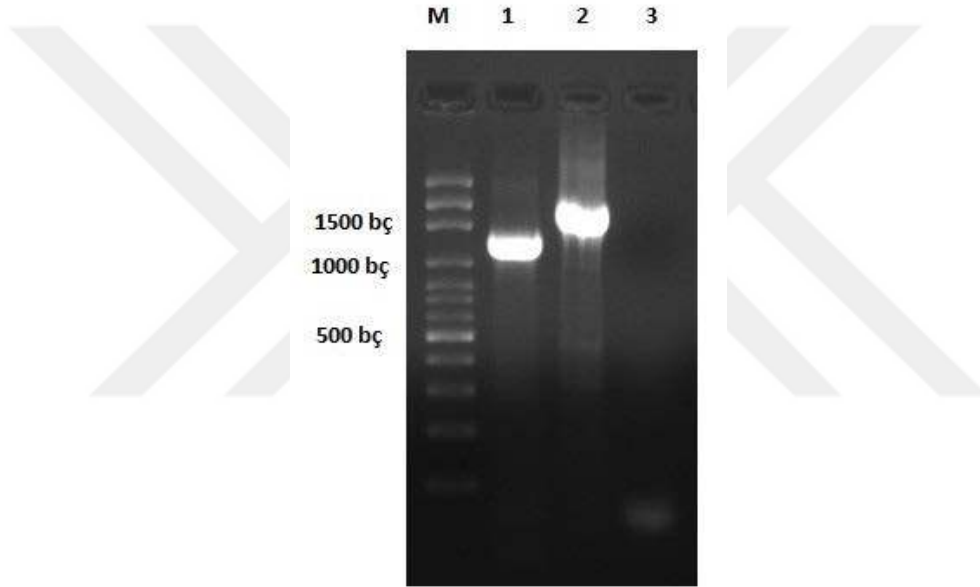


Şekil 11. Fare beyni adapte 2012/TR/ADYMN BEFV izolatının Vero E6 hücresi enfeksiyonu. (A) Vero E6 kontrol hücresi. (B) BEFV enfekte Vero E6 hücresi 48. saat. (C) 56. saat (D) 72. saat (40x) (E) 72. saat (100x) (F) 96. saatteki sitopatik odaklar (CPE)

5.3. Bovine Ephemeral Fever Virüs Glikoprotein ve Nükleoprotein

İnzört Bölgelerin RT-PCR ile Çoğaltılması

Fare beyni adapte BEFV RNA'sının tam uzunlukta G ve N primerleri yapılan PCR reaksiyon sonucunda beklenen büyüklüklerde ampliconlar elde edilmiştir. 1871 bp uzunluğundaki G geni ve 1372 bp uzunluğundaki N ampliconu %1 agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 12).

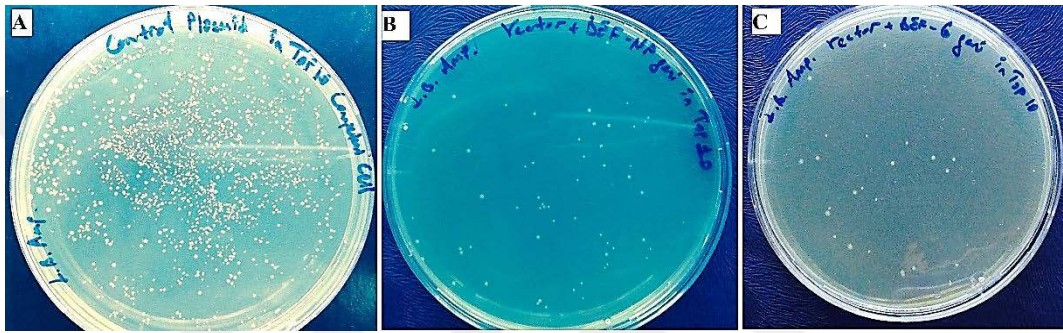


Şekil 12. BEFV enfekte Vero E6 lizat RNA'sı RT-PCR sonuçları. **M:** Solis Biotec 100 bp DNA merdiveni. **Hat 1.** BEFV tam uzunlukta N gen ampliconu. **Hat 2.** BEFV tam uzunlukta G gen ampliconu. **Hat 3.** Negatif kontrol

5.4. pcDNA4-G ve pcDNA4-N Rekombinant Vektörlerin Kimyasal

Transformasyonu

Kompeten hücrelerin seçici LB katı besiyerinde bir gece inkübasyonları (37°C) sonrası çok sayıda ampicilin dirençli bakteri kolonisi oluşmuştur (Şekil 13).

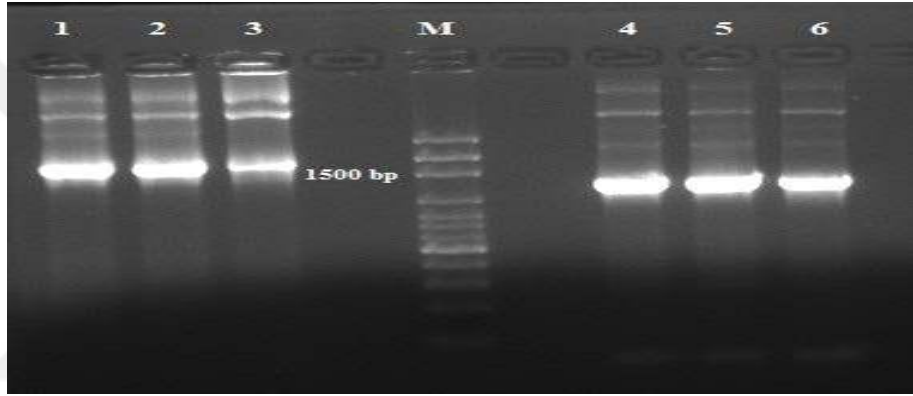


Şekil 13. Rekombinant plazmidleri taşıyan transforme TOP10 kompeten hücre kolonileri. (A) pcDNA4/*lacZ* kontrol plazmid taşıyan koloniler (B) pcDNA4-N rekombinant vektör taşıyan koloniler (C) pcDNA4-G rekombinant vektörü taşıyan koloniler

Selektif LB katı besiyerinde çoğalan koloniler ilgili rekombinant vektörlerin varlığı yönünden PCR-koloni tarama yöntemi ile araştırılmıştır.

5.5. Rekombinant Vektörlerin PCR-Koloni Tarama Yöntemiyle Tespit Edilmesi

Selektif LB katı besiyerinde oluşan koloniler numaralandırılarak inzörtlere özgü primerlerin kullanıldığı PCR testinde templat olarak kullanılmıştır. Test sonucunda beklenen büyüklükte ampliconlar elde edilmiş ve bu kolonilerin rekombinant plazmidleri taşıyan koloniler olduğu tespit edilmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. Rekombinant vektörle transforme bakteri hücrelerinden elde edilen kolonilerde G ve N genlerinin varlığının PCR koloni tarama ile doğrulanması. **Hat 1-3;** G geni bulunduran koloniler, ~1800 bp **Hat 4-6;** N geni bulunduran koloniler, ~1300 bp **M;** Ağırlık markeri (Solis Biodyne, 100 bp DNA merdiveni)

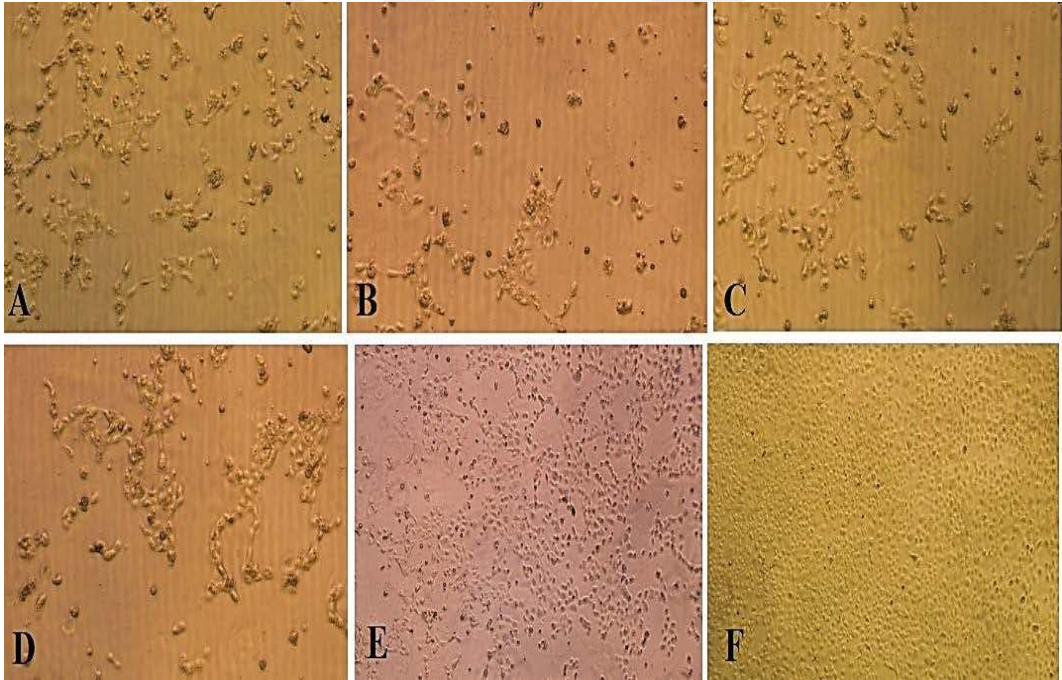
PCR tarama yöntemiyle rekombinant plazmidleri bünyesinde barındıran *E. coli* kolonilerinden birkaçı alınarak her biri 50 ml LB sıvı (Ampisilin 60 µg/ml) besiyerinde bir gece (37°C) çoğalmaya bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası selektif besiyerinde bakteriyel çoğalma gözlenmiştir. Plazmid purifikasyon kiti ile

pürifiye edilen plazmidlere inzört bölgelere ait primerler ve vektöre ait primerler ile PCR yapılmış ve amplikonlar dizi analizine (İontek, Türkiye) gönderilmiştir. Dizi analizi sonrasında ligasyonun sorunsuz gerçekleştiği belirlenmiş ve stop kodonuna rastlanmamıştır. Böylece glikoprotein ve nükleoproteini tam uzunlukta sentezletecek rekombinant vektörlerin transfeksiyon ve immunizasyonlarda kullanılabilir olduğu belirlenmiştir.



5.6. Geçici Transfekte Vero E6 Hücrelerin Zeocin Seleksiyonu

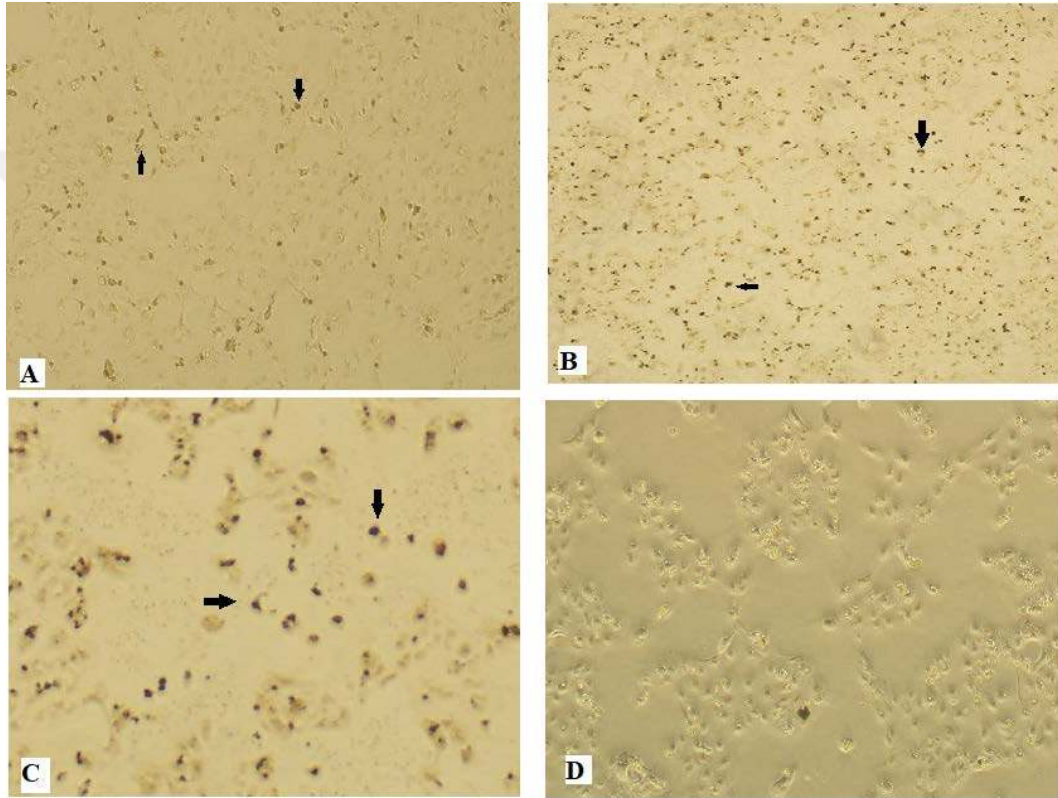
Vero E6 hücrelerine Zeocin duyarlılık testi yapılmış ve bunun sonucunda seleksiyon için 60 µg/ml konsantrasyonda kullanımına karar verilmiştir. Seleksiyon amaçlı 21. güne kadar Zeocin ile muamele edilen transfekte Vero E6 hücrelerinin büyük bir kısmı ölmüş sonrasında ise hücreler çoğalmaya başlamıştır. Bu aşamada transfekte olmamış Vero E6 hücreleri kültür ortamından uzaklaştırılmış ve yalnızca transfekte hücrelerin çoğalmasına izin verilmiştir. Sonuç olarak ilgili proteinleri daimi eksprese eden stabil hücre hatları oluşturulmuştur (Şekil 15).



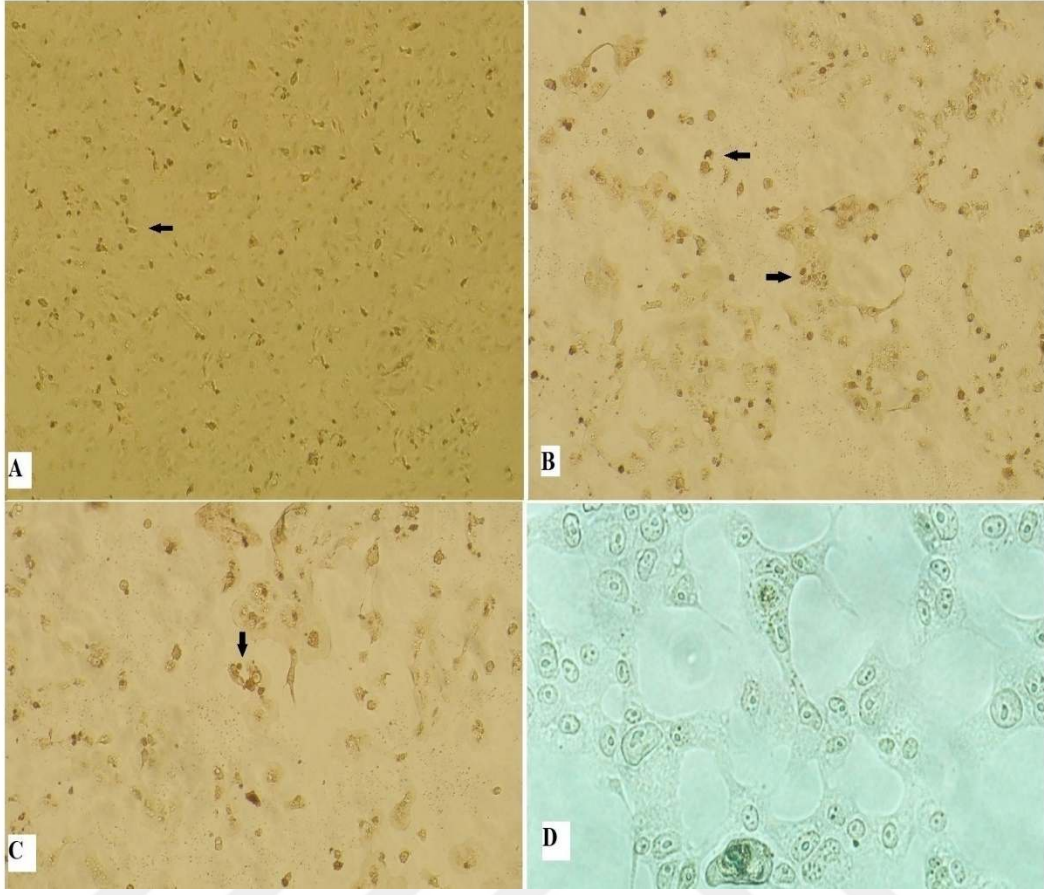
Şekil 15. Geçici transfekte (pcDNA4-G) Vero E6 hücreleri Zeocin seleksiyonu (60 ug/ml). **A-B;** Zeocin seleksiyonu 7.gün, **C;** 10. gün, **D;** 14. gün, **E;** 21. gün, **F;** 24. gün

5.7. Transfekte Hücrelerin İmmunoperoksidaz Testi

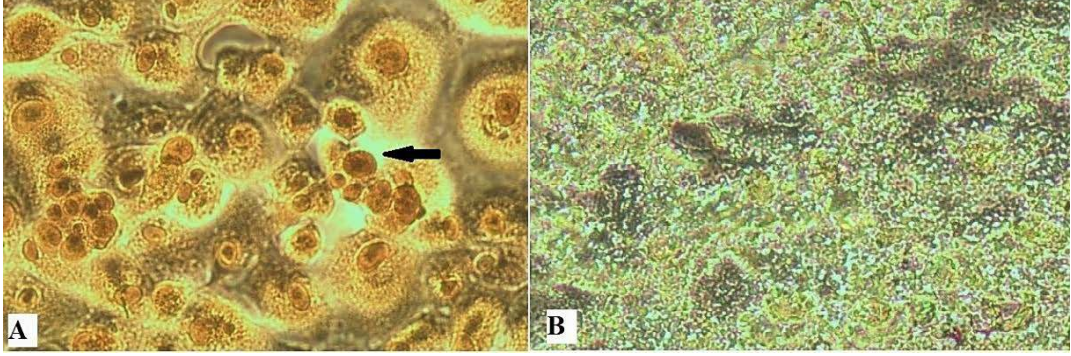
BEFV G1 monoklonal antikor ve 6X-Histag-HRP monoklonal antikor kullanılarak geçici ve stabil transfekte hücreler immünoperoksidaz testi yapılmış ve DAB kromojen ile genleri eksprese eden transfekte hücreler görüntülenmiştir (Şekil 16-17-18).



Şekil 16. pcDNA4-G transfekte Vero E6 hücrelerinde BEF G1 monoklonal antikor kullanılarak yapılan immünoperoksidaz testi. (A) pcDNA4-G vektörü ile geçici transfeksiyonu yapılmış Vero E6 hücreleri (B-C) pcDNA4-G vektörü ile stabil transfekte Vero E6 hücreleri. (D) Kontrol Vero E6 hücresi (40X)



Şekil 17. pcDNA4-N transfekte Vero E6 hücrelerinde 6X-His-Tag monoklonal antikoru kullanılarak yapılan immunoperoksidaz testi. **(A)** pcDNA4-N vektörü ile geçici transfeksiyonu yapılmış Vero E6 hücreleri. **(B-C)** pcDNA4-N vektörü ile stabil transfeksiyonu yapılmış Vero E6 hücreleri. (40X) **(D)** Kontrol Vero E6 hücresi (100X)

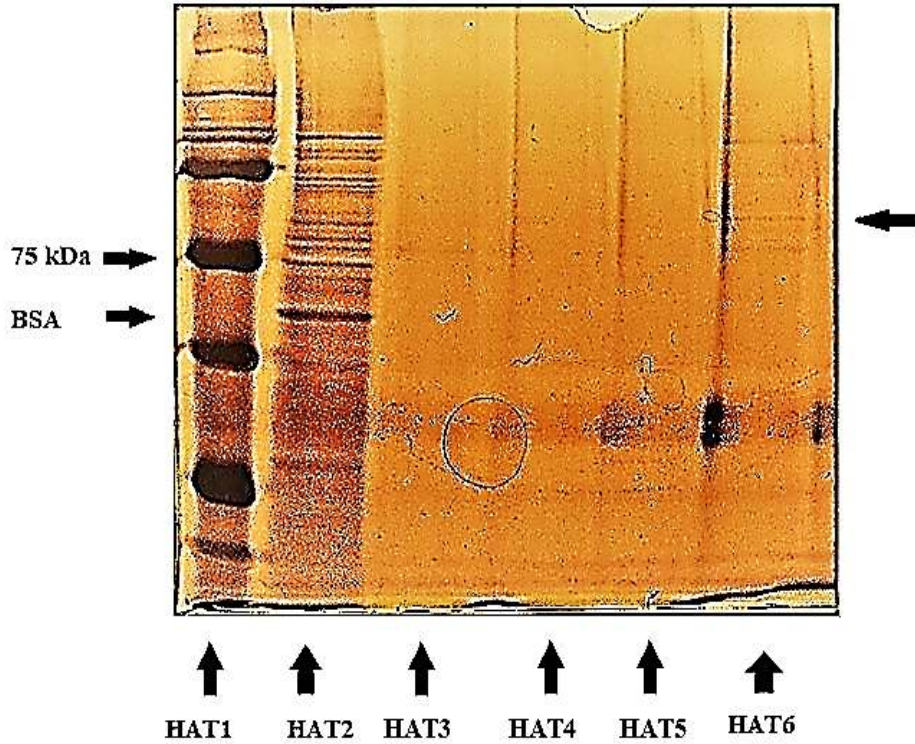


Şekil 18. pcDNA4-G transfekte Vero E6 hücrelerinde BEF G1 monoklonal antikor kullanılarak yapılan immunoperoksidaz testi. **(A)** pcDNA4-G vektörü ile stabil tranfeksiyonu yapılmış Vero E6 hücresi. **(B)** Kontrol Vero E6 hücresi

Immunoperoksidaz testi sonrasında pcDNA4-G ve pcDNA4-N ile transfekte edilmiş Vero E6 hücrelerinde mikroskopik incelemeler sonrasında protein varlığına işaret eden kahverengi boyanmalar görülürken negatif kontrol hücrelerinde ise boyama gerçekleşmedi.

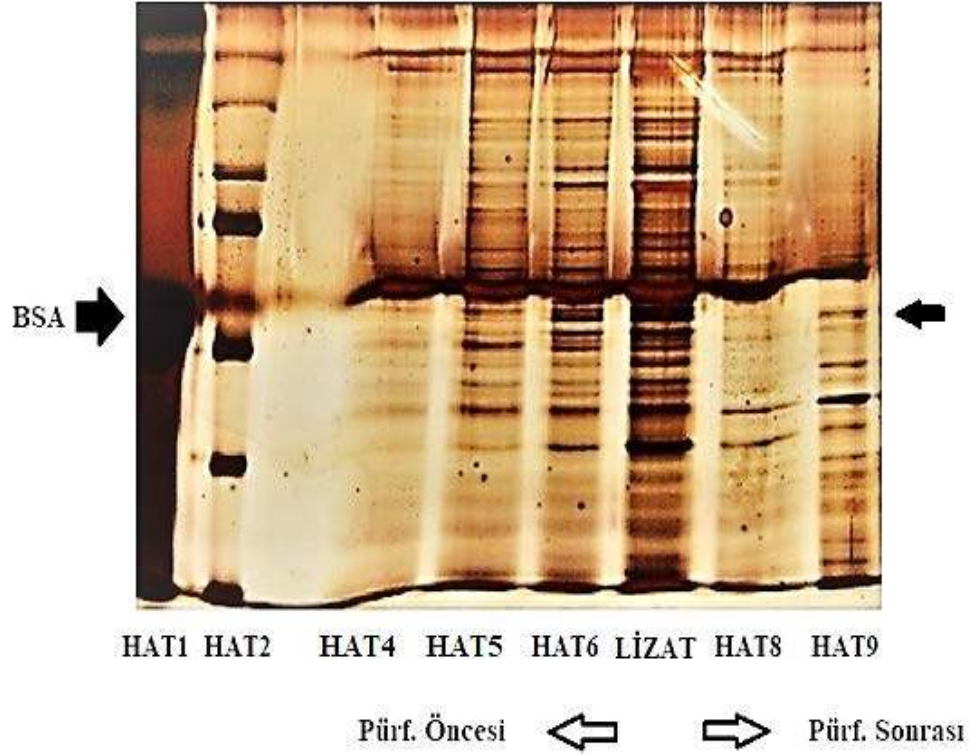
5.8. Rekombinant Proteinlerin SDS-PAGE ve Vestern Blot Analizi

Rekombinant proteinlerin pürifikasyonu işlemindeki çeşitli aşamalara SDS-PAGE uygulandı ve sonrasında pürifiye proteinler gümüş boyama yapılarak ortaya konuldu. Bovine serum albumin (BSA) ve protein merdiveni referansında G protein ~77 kDa N protein ise ~55 kDa olarak belirlendi. Proteinlerin Vestern blotlamadaki büyüklükleri ile kıyaslama yapılarak SDS-PAGE’de olası bantlar tespit edildi. Pürifikasyon işlemi sonrasında G protein N’ye kıyasla daha saf olarak elde edildi (Şekil 19-20).



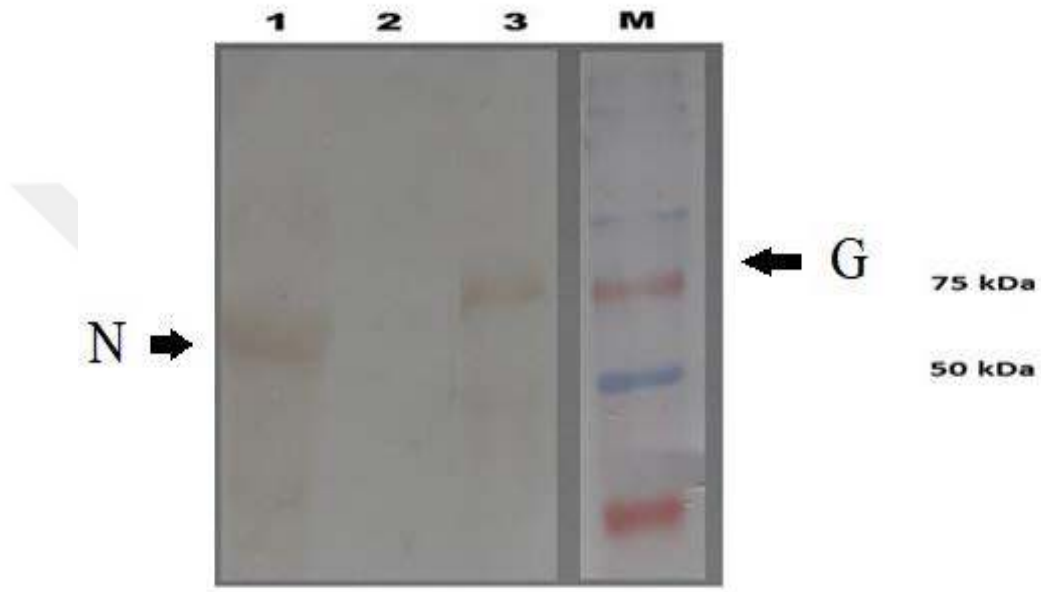
Şekil 19. Pürifiye rekombinant G protein SDS-PAGE analizi.

Hat 1; Protein Merdiven **Hat 2;** pcDNA4-G transfekte Vero E6 hücre lizatu **Hat 3-4-5;** Farklı İmidazol konsantrasyonu ile yapılan elüsyonlar (50-100-150 mM İmidazol) **Hat 6;** Pürifiye rekombinant G protein (300 mM İmidazol ile elüsyon)



Şekil 20. Pürifiye rekombinant N protein SDS-PAGE analizi.
Hat 1; BSA (~67 kDa), **Hat 2;** Protein Merdiven, **Hat 4-5;** 20mM İmidazolle yıkamalar, **Hat 6;** Santrifüj sonrası pcDNA4-N transfekte hücre lizatu süpernatantı **Hat 8-9;** Pürifikasyon sonrası sırayla 300 mM ve 500 mM İmidazol ile elüsyonlar

pcDNA4-G ve pcDNA4-N stabil transfekte hücrelerinden elde edilen pürifiye proteinlerin yüksek pozitif poliklonal sığır IgG antikoru ile Vestern blot analizi sonrasında ~55 kDa büyüklüğünde N protein ve ~77 kDa büyüklüğünde G proteini görüntülenmiştir (Şekil 21).

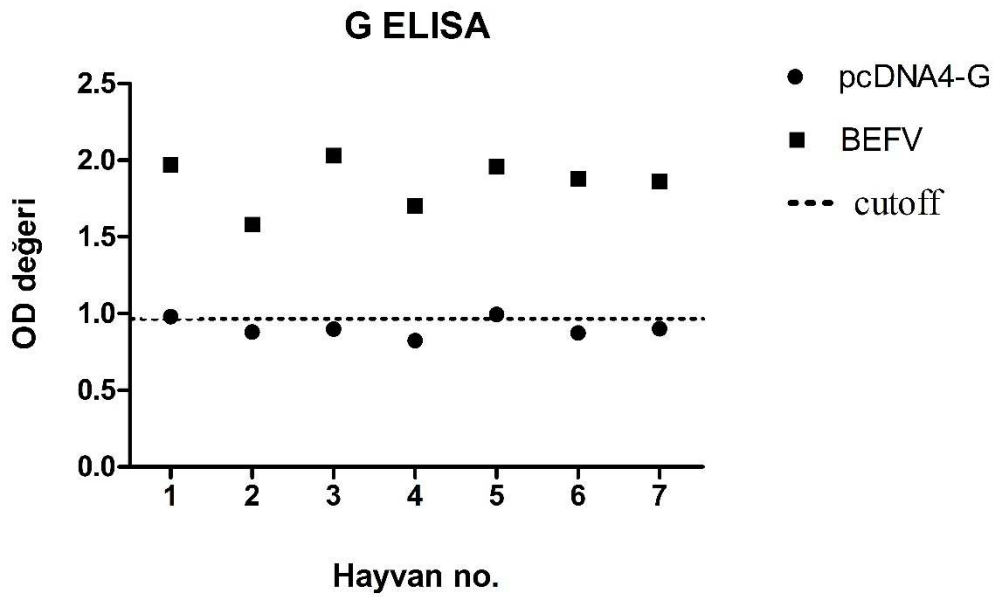


Şekil 21. Pürifiye rekombinant G ve N proteinleri ve yüksek BEF pozitif sığır serumuyla gerçekleştirilen Vestern blot sonuçları. **M**; Renkli protein merdiven, **Hat 1**; Pürifiye N proteini, **Hat 2**; Kontrol Vero E6 hücre lizatı, **Hat 3**; Pürifiye G proteini

5.9. Bovine Ephemeral Fever Virüs G protein ELISA

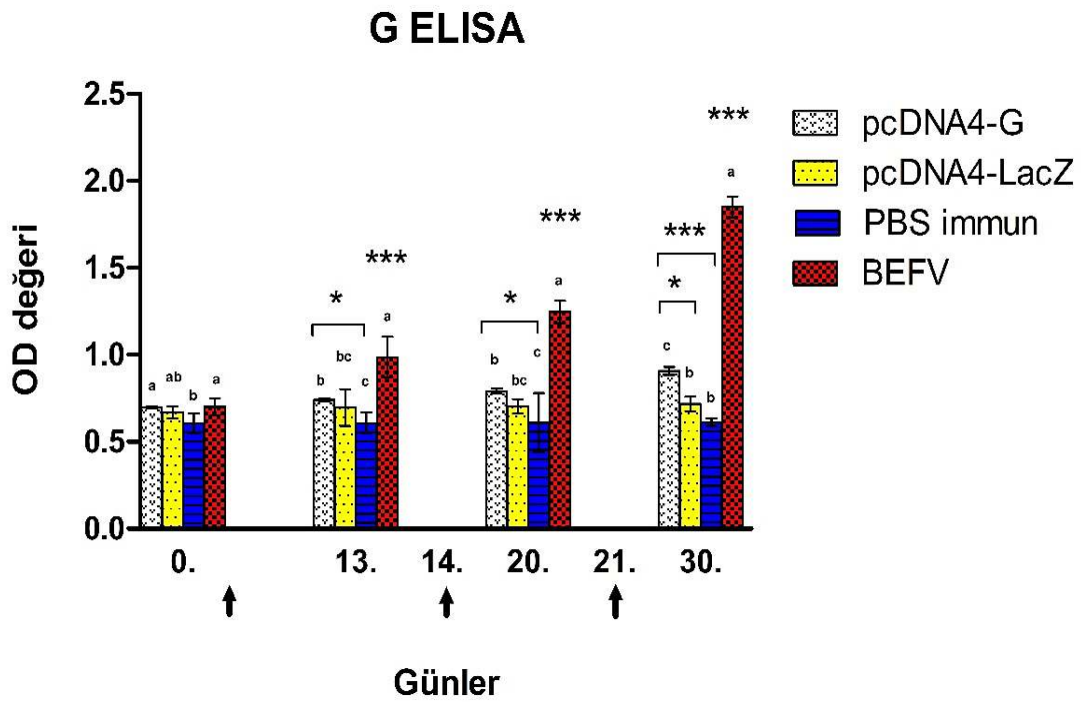
BEFV G protein ELISA kullanılarak pcDNA4-G immun farelerin son immunizasyonlarına ait serumları çalışılmıştır. Son serumlara ait OD değerleri gruplardaki birey bazında incelendiğinde yalnızca bir ve beş numaralı farenin belirlenen cutoff değerini aştığı diğerlerinin ise bu değerin altında kaldığı

belirlendi. Buna rağmen pcDNA4-G immun grubundaki tüm bireylerde negatif gruplardan daha yüksek IgG antikor sonuç alındı. Bu sonuçlar, pcDNA4-G immunize tüm farelerde humoral yanıtın açığa çıktığını göstermektedir. Testin değerlendirmesinde son serum örneklerine ait bu testin cutoff değeri 0.965 olarak hesaplandı (Şekil 22).



Şekil 22. BEFV ve pcDNA4-G immun farelere ait son serumların birey bazında BEFV G ELISA antikor ölçümleri. Cutoff değeri tüm negatiflerin son serum OD ortalaması + 3× Standart sapma formülü ile hesaplanan 0.965 değerini göstermektedir

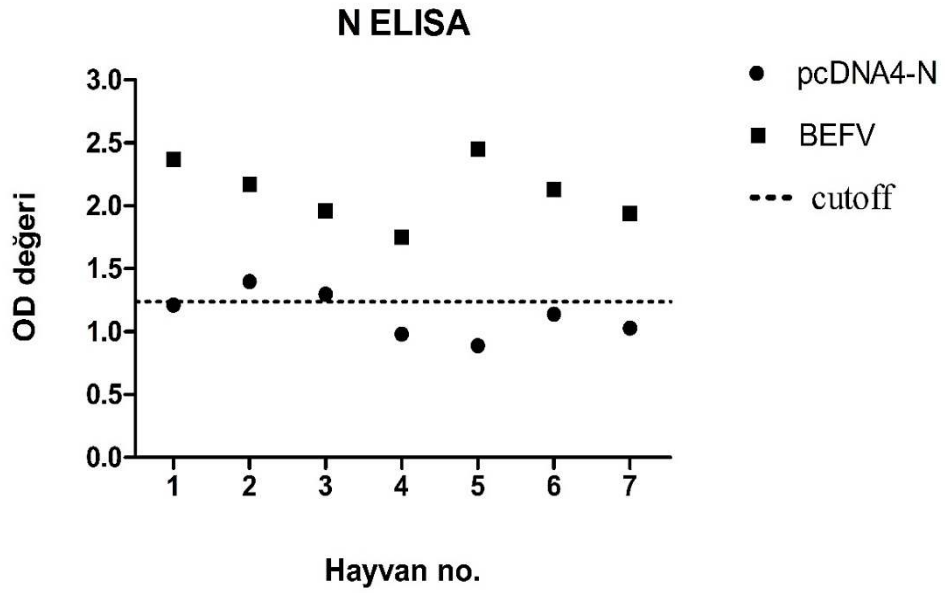
Sonuçlar aynı zamanda grup bazında günlere göre değerlendirilmiş ve aynı güne ait grup ortalamaları hesaplanarak negatif kontrollerle ikili olarak kıyaslamaları yapılmıştır. Buna göre pcDNA4-G immun gruba ait serumların ortalama OD değeri plazmid kontrol grubu ($p<0.05$) ve PBS immun grubu ($p<0.001$) ile kıyaslandığında 30. günde anlamlı bir fark ortaya çıkmaktadır. BEFV immun grup ise bu farkı 13. günde ortaya çıkarmıştır ($p<0.001$) (Şekil 23).



Şekil 23. İmmunize farelere ait serumların BEFV G ELISA antikor ölçümleri. Grafik her bir deney grubundaki bireylerin OD değeri ortalamasını standart hatalarla birlikte göstermektedir. Aynı gün sonuçlarına ait farklı harfler (a, b, c) gruplar arasındaki farklılığı, ortak harf taşımaları durumunda ise gruplar arasındaki benzerliği ifade etmektedir. Farkın anlamlılık derecesi * ile gösterilmiştir. Tek yıldız (*) $p\leq 0.05$ olduğunu üç yıldız (***) $p<0.001$ 'i belirtmektedir. Yukarı ok işareti ( ) ise immunizasyon günlerini ifade etmektedir

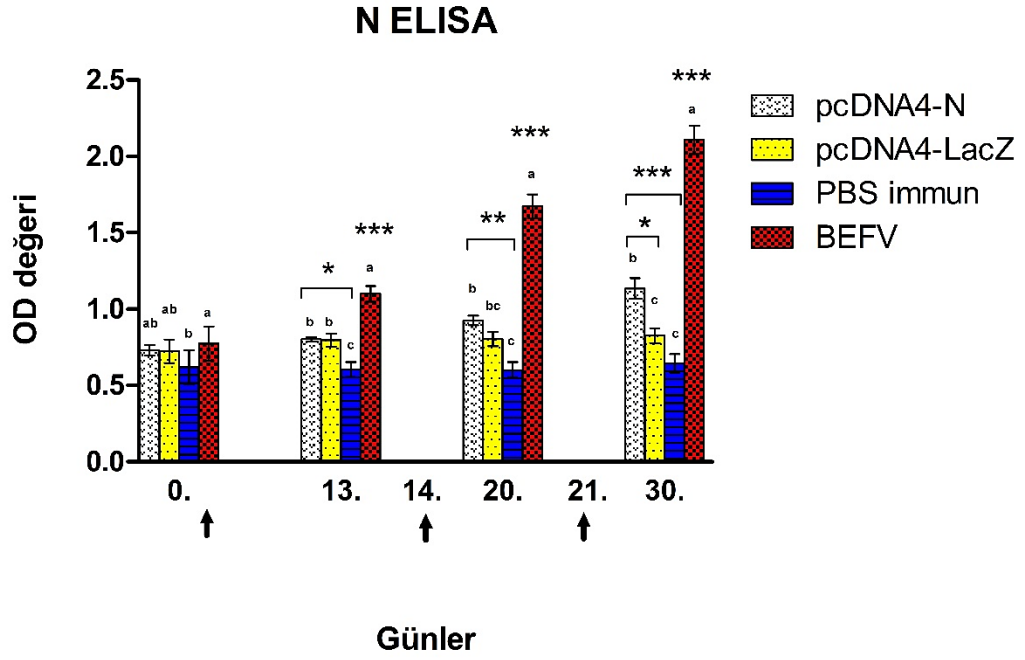
5.10. Rekombinant N Protein ELISA

Rekombinant N protein ile indirek ELISA gerçekleştirildi ve deney farelerine ait serum örnekleri çalışıldı. Son serumlara ait OD değerleri gruplardaki birey bazında incelendiğinde yalnızca iki ve üç numaralı farenin belirlenen cutoff değerini aştığı diğerlerinin ise bu değerin altında kaldığı belirlendi. Bir numaralı hayvana ait serum örneği ise cutoff değerine çok yakın OD değerine rastlandı. Bu değerlendirmede son immunizasyon verilerine ait bu testin cutoff değeri 1.239 olarak hesaplandı (Şekil 24).



Şekil 24. BEFV ve pcDNA4-N immun farelere ait son serumların birey bazında rekombinant N protein ELISA antikor ölçümleri. Cutoff değeri tüm negatiflerin son serum ortalaması + 3× Standart sapma formülü ile hesaplanan 1.239 değerini göstermektedir

Sonuçlar aynı zamanda grup bazında günlere göre değerlendirildi ve aynı güne ait grup ortalamaları hesaplanarak ikili olarak kıyaslamaları yapıldı. Buna göre pcDNA4-N immun gruba ait OD ortalaması PBS-immun grup ortalaması ile kıyaslandığında 13. günden itibaren anlamlı bir fark ortaya çıkmakta ($p<0.05$) ve 30. günde fark artarak devam etmektedir ($p<0.001$). pcDNA4-N immun grubu plazmid kontrol grubu ile kıyaslandığında ise fark 30. günde anlamlı hale gelmektedir ($p<0.001$). BEFV immun grubun ortalama OD değeri 13. günden itibaren tüm gruplarla anlamlı bir fark ortaya çıktığı görülmektedir ($p<0.001$) (Şekil 25).

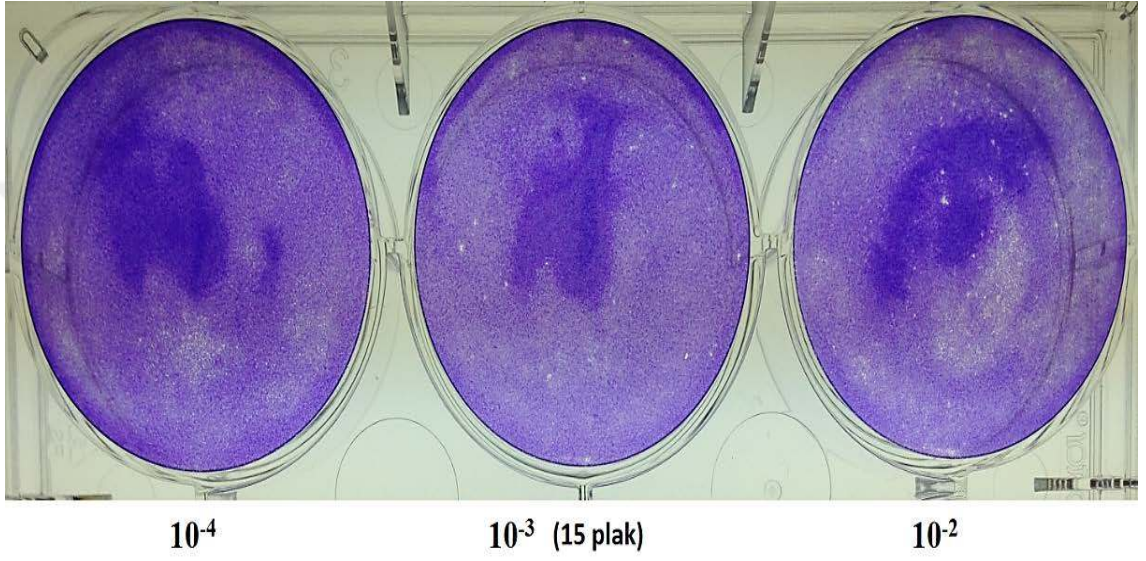


Şekil 25. İmmunize farelere ait serumların rekombinant N protein ELISA ile antikor  l  mleri. Grafik her bir deney grubundaki bireylerin OD değeri ortalamasını standart hatalarla birlikte göstermektedir. Aynı gün sonuçlarına ait farklı harfler (a, b, c) gruplar arasındaki farklılığı, ortak harf taşımaları durumunda ise gruplar arasındaki benzerliği ifade etmektedir Anlamlılık derecesi * ile gösterilmiştir. Tek yıldız (*) $p \leq 0.05$ 'i iki yıldız (**) $p < 0.01$ 'i    yıldız ise (***) $p < 0.001$ 'i belirtmektedir. Yukarı ok işareti ( ) ise immunizasyon günlerini ifade etmektedir

5.11. Bovine Ephemeral Fever Virüs Plak Test

Vero E6 hücreleri altı kuyucuklu hücre kültür kabında kültüre edilmiş ve fare beyni adapte BEFV'nin seri dilüsyonları adsorpsiyonlu yöntemle ekilmiştir. Overlay vasatı ile kaplanan hücreler dört gün boyunca mikroskop altında sitopatik odaklar yönünden incelendi. Dördüncü günün sonunda sitopatik odakların belirgin

hale geldiği hücreler tespit edilerek kristal viyole solüsyonu ile boyandı. Titresi bilinmeyen virüs stoğunun 10^{-3} dilüsyonunda yaklaşık 15 virüs plağı sayıldı. Daha önce belirtilen virüs titresi hesaplama formülünden faydalanılarak fare beyni adapte virüs stoğunun titresi $0,3 \times 10^5$ PFU/ml olarak hesaplandı (Şekil 26).



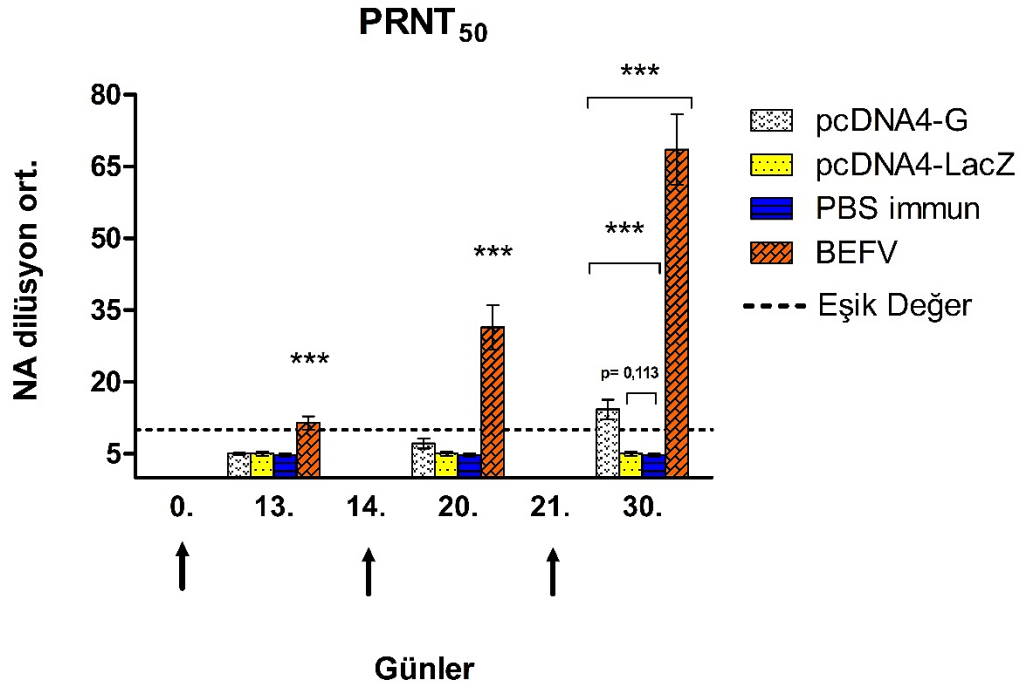
Şekil 26. Vero E6 hücresinde BEFV'nin plak titrasyon testi

5.12. Deney Grupları Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi

Her bir deney grubuna ait nötralizan antikor dilüsyon ortalamaları ikili gruplar halinde kıyaslandığında pcDNA-4 G immun grubun 20. ve 30. gün değerleri negatif kontrol grupları ortalamasından yüksek BEFV immun grubun ortalamasından düşük bulundu. Sonuçlar istatistiksel açıdan incelendiğinde pcDNA4-G immun grup ile negatif gruplar arasında 20. günde ($p<0.05$) ve 30. günde ($p<0.001$) ortaya çıkan bu farkın anlamlı olduğu belirlendi. BEFV immun deney grubunda nötralizan antikor dilüsyon ortalamaları ikili gruplar halinde kıyaslandığında 13. günde negatif kontrol gruplarına ve pcDNA4-G immun gruplarına nazaran daha yüksek ortalama elde edildi. Ortaya çıkan bu fark anlam teşkil etmektedir ($p<0.001$) (Şekil 27).

Tablo 11’de PRNT₅₀ sonuçları ve nötralizan antikorların BEFV’yi kültür ortamında inhibe etme yüzdeleri verilmiştir. Bu sonuçlara göre pcDNA4-G immun gruptaki birinci ve beşinci farelerin antikor titreleri 1:20 serum dilüsyonunda %50 inhibisyon değerini geçtiği için nötralizan antikor titreleri de 1:20 olarak kabul edildi. Aynı gruptaki diğer fareler ise 1:10 serum dilüsyonunda %50 inhibisyon değerini geçmiş ve 1:20 dilüsyonda bu oranın altında kalmaktadır. Dolayısıyla bu farelerin nötralizan antikor titreleri de 1:10 olarak kabul edildi. Bir ve beş numaralı fare serumları 1:20 oranında sulandırıldığında ~%70 oranında BEFV’yi inhibe ettiği belirlendi. PRNT₅₀ sonuçlarına göre BEFV immunize farele serumlarından beşi 1:80 ikisi 1:40 serum dilüsyonunda BEFV’yi %50’nin üzerinde inhibe etmiştir. BEFV immun serumların 1:160 oranda dilüsyonu ise %50’nin altında inhibisyon göstermektedir. Buna göre BEFV immun farelerden beşinde antikor titresi 1:80 ikisinde ise 1:40 olarak hesaplandı.

pcDNA4-N immun grubu ve kontrol gruplarına ait fare serumlarında nötralizan antikor yanıt alınamamıştır.



Şekil 27. PRNT₅₀ testi ile deney gruplarının nötralizan antikor ölçümleri.

Grafikteki sütunlar her bir gruptaki bireylerin günlere göre NA dilüsyonlarının ortalama değerlerini göstermektedir. Eşik değer 1:10 sulandırması ifade etmektedir. Grup ortalamaları ikili gruplar halinde istatistiki olarak kıyaslanmıştır.

*** $p < 0.001$ 'i belirtmektedir. Yukarı ok (↑) immunizasyon günlerini göstermektedir

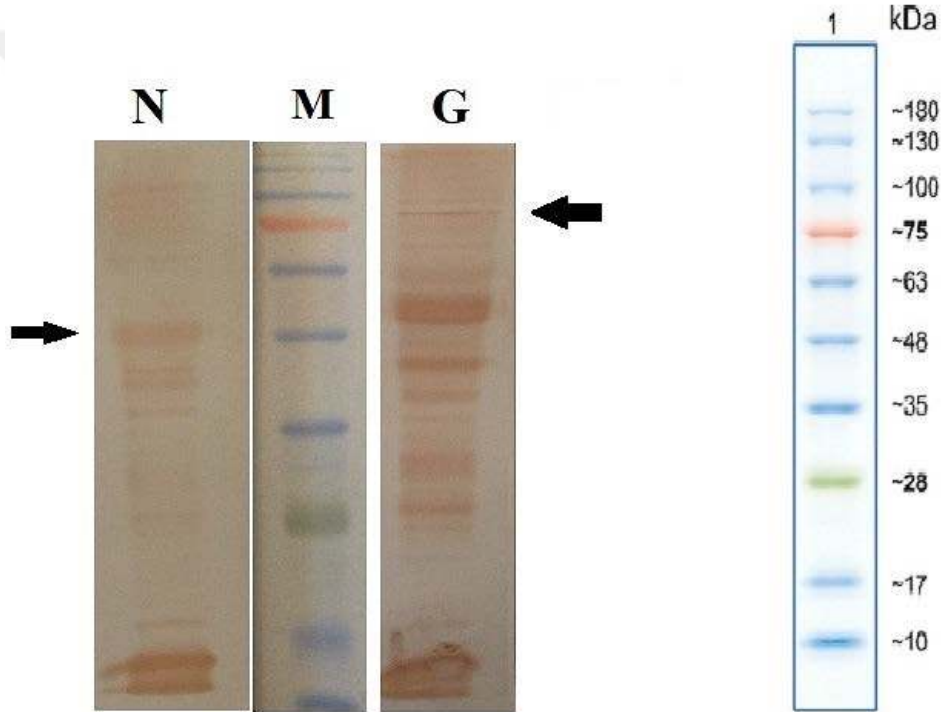
Tablo 11. pcDNA4-G immun fare serumları PRNT₅₀ sonuçları

	Bir Numaralı Hücre Kültür Pleyti									İki Numaralı Hücre Kültür Pleyti						
Serum	Neg. Kontrol	Fare 1		Fare 2		Fare 3		Fare 4		Neg. Kontrol	Fare 5		Fare 6		Fare 7	
Dilüsyon	Plak	Plak	%	Plak	%	Plak	%	Plak	%	Plak	Plak	%	Plak	%	Plak	%
Oranı	Sayısı	Sayısı	İnhib.	Sayısı	İnhib.	Sayısı	İnhib.	Sayısı	İnhib.	Sayısı	Sayısı	İnhib.	Sayısı	İnhib.	Sayısı	İnhib.
1:10	28	0	100	2	92.8*	8	71.4*	4	85*	26	0	100	6	76.9*	7	80.7*
1:20	34	10	70.5*	20	41.1	26	23.5	19	44.1	29	8	72.4*	18	37.9	20	41.1
1:40	32	24	25	34	-	29	-	29	-	27	21	22.2	26	-	25	-
1:80	35	33	-	32	-	36	-	32	-	30	28	-	31	-	31	-

(-) %10'un altındaki inhibisyon değerlerini belirtmektedir. (*) BEFV'yi %50 ve üzeri oranda inhibe eden en yüksek serum dilüsyon oranlarını ifade etmektedir. Bu oranlar nötralizan antikor titresi kabul edilmiştir.

5.13. pcDNA4-G ve pcDNA4-N İmmun Serum Vestern Blot Analizi

BEFV fare beyni adapte virüsün G ve N proteinlerinin G ve N rekombinant plazmid immün serumlar ile gösterilmesi deneyinde ~50 kDa büyüklüğündeki N proteini ve ~80 kDa büyüklüğündeki muhtemel G proteinin Vestern blot görüntüsü ortaya konuldu (Şekil 28).



Şekil 28. BEFV G ve N proteinlerin pcDNA4-G ve pcDNA4-N immunize fare serumları ile gösterildiği Vestern blot deneyi. **N**; pcDNA4-N immün fare serumu. **M**; 10-180 kDa protein merdiveni (Abcam, İngiltere). **G**; pcDNA4-G immün fare serumu

6. TARTIŞMA

Bu tezde yüksek patojenik 2012/TR/ADYMN BEFV izolatının tam genom dizilemesi yapılmış ayrıca, rhabdovirüslerde koruyucu yanıtın oluşmasında önemli rollere sahip G ve N proteinlerine ait genleri haftalık BALB/c farelerinde eksprese eden DNA aşısının geliştirilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Bir mikroorganizmaya ait gen bölgesinin veya tam genomun yalnızca nükleotit dizisi bilinerek moleküler seviyede tamamen karakterize edilebilmektedir. Günümüzde DNA dizileme tekniğindeki gelişmeler genom organizasyonu, gen yapısı, işlevi ve düzenleme mekanizmalarının açığa çıkarılmasına önemli katkılar sağlamış ayrıca amino asit dizileri ve gen ürünlerinin değişimine neden olan mutasyonlar ve bir bireyi/suşu diğerlerinden ayıran dizilimler belirlenebilmiştir (146).

Virüs evriminin ve epidemiyolojisinin anlaşılabilmesi, salgın analizlerinin yapılabilmesi ve mücadelede kullanılacak aşı adaylarının belirlenebilmesi viral genotiplenmenin önemini ortaya koymaktadır. Viral enfeksiyonlara yönelik koruyucu tedbirlerin alınabilmesi için atılacak ilk adım enfeksiyon odağından virüsün izole edilmesi, ikinci olarak da özellikle moleküler düzeyde tam veya kısmi tiplendirmesinin yapılmasıdır. Bu tez çalışması ile 2012 yılına ait BEF Türkiye salgınlarından izole edilen yüksek patojenik BEFV'nin tam genom genetik karakterizasyonu yapılarak virüsün ileri düzeyde kimliklendirilmesine katkı sunulmuştur. Sekanslama çalışması esnasında virüsün gen değişimleri dikkate alındığından Vero E6 hücrelerinde ilk pasaj virüslerle sekanslama

yapılmıştır. Yapılan bu uygulamanın nükleotit dizilimine oldukça düşük etkisi olacağına inanılmaktadır. Benzer çalışmada Zheng *ve ark.* (2012) kan, fare beyni adapte ve BHK-21 adapte BEFV'nin nükleotit dizilimini kıyaslamış ve düşük pasaj seviyesinde önemli bir etki yaratmadığını ortaya koymuştur (83). Ayrıca PCR ile çoğaltılacak bölgelerin doğru okuma için önerilen sınırlar içinde olan 600-800 bp uzunluğunda olmasına özen gösterilmiştir. Ayrıca, RT-PCR ile çoğaltma esnasında yüksek doğrulukta okuma yapan enzimler tercih edilmiştir.

BEFV'nin tek serotipi bulunmasına karşın ortaya çıkan genogruplar arasında önemli antijenik varyasyonlar bulunabilmektedir. BEFV G protein geni rekombinasyonun bulunmaması ve kararlı hizalama sunması sebebiyle tam genom temsilcisi konumundadır, bu özelliği ile faydalı bir genotip belirleyicisidir (46). Ayrıca tip spesifik nötralizan antikor bölgeleri taşıması sebebiyle coğrafik filoanaliz için kullanılabilir. Glikoprotein geni filogenetik analizine göre BEFV üç cluster'e (Uzak Doğu, Orta Doğu ve Avustralya) ayrılmaktadır (46, 53, 82, 83). Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre BEFV/Ad12TUR izolatu Orta Doğu soyunda yer almaktadır. BEFV/Ad12TUR izolatının G geni 2000-2004 İsrail izolatları ile %95-97 benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlar 2012 yılında ortaya çıkan bu virüsün İsrail ve Türkiye'de geçmiş yıllardan beri sirküle olduğunu göstermektedir. Fakat diğer araştırmacılar ülkemizde aynı yıl elde ettikleri izolatlarını (2012/TRCU15 VE TR/ADA-1 2012) Çin ve Tayvan izolatları ile yakın ilişkili bulmuş ve cluster-1 içerisindeki Uzak Doğu soyunda gruplandırmışlardır (48, 53). Bu verilere göre ülkemizde aynı yıl ve bölgede iki farklı genotipin sirküle olduğunu söyleyebiliriz.

BEFV dahil pek çok virüste genotipik farklılıkların virülens üzerine etki yaptığı düşünülmektedir. Türkiye’de vaka ölüm oranı 2008 salgınında %1-4 arasında iken bu oran 2012 yılında ise incelenen birçok çiftlikte %20’e ulaşmıştır (46, 53, 147). 2008 ve 2012 yıllarında etkilenen hayvanların yetiştirme yönü ya da yaş grupları arasında önemli bir farklılık bulunmamasından dolayı vaka ölüm oranındaki bu artışı viral genomdaki mutasyonlara yorumlayabiliriz. İkinci ihtimal ise 2012 yılında iki farklı clusterdeki virüsün kosirkülasyonu ciddi BEF salgınına yol açmış olabileceğidir (48, 53). Bu durum için net bir cevabımız bulunmamakta ve mevcut itibariyle sebep belirsizliğini korumaktadır. Bu sebepten, ileri çalışmalar yaparak BEF’in patogenezinde mutasyon ve kosirkülasyonun rolünü ortaya çıkarmak gerekmektedir. Bu nedenle gelecekte bu virüslerin kullanıldığı deneysel enfeksiyonlar ve reverz genetik çalışmaları gerçekleştirilmeli virülens genler ortaya konmalıdır.

Filogenetik analiz sonuçları, BEFV izolatları arasındaki filogenetik ilişkilerin coğrafi konumla yakından ilişkili olduğu sonucunu destekler niteliktedir (83). Buna göre eğer izolatlar birbirine yakın konumdaki çevre ülkelerden elde edilmiş ise BEFV suşları arasındaki yakın genetik ilişkilerin olabileceği sonucuna varılabilmektedir. Aynı şekilde eğer izolatlar birbirine çok uzak bölgelerden elde edilmiş ise uzak ilişkiye sahip olduğu sonucuna varılmaktadır. Bu açıdan özellikle hastalığın görüldüğü bir ülkeye komşu olan ve BEFV insekt vektörleri için uygun çevre şartları taşıyan ülkeler salgınları dikkatle takip etmeli ve her an aşılama için gerekli tedbirleri almalıdır. He ve ark. (2016) BEFV Uzak Doğu soylarının Orta Doğu ve Avustralya soyları arasındaki rekombinasyondan ortaya çıktığı sonucunu çıkarmışlardır (47). Ancak bu tez çalışmasında Türkiye, Çin ve Avustralya

izolatları arasında similarity plot ve boot scanning analiz sonrasında herhangi bir rekombinasyon durumuna rastlanmamıştır.

Bu tez çalışması ile birlikte Türkiye BEFV izolatının tam genomu ilk kez sekanslanmıştır (Genebank: KY012742). Ayrıca diğer ülkelere de ait çok sınırlı sayıda BEFV tam genom verisi mevcuttur. Bu nedenle bu tezde elde edilen sonuçların BEF'in küresel epidemiyolojisi ve jeodinamiklerini ortaya çıkarmaya ve koruyucu tedbirlerin alınmasına yönelik faydalı olacağı kanısına varılmıştır. Ayrıca çalışmada kullanılan virüsün 2018 yılına kadar ortaya çıkmış son klinik BEF salgınına ait olduğu ve salgınların alışık olmadık şekilde yüksek mortalite ile seyrettiği düşünülürse elde edilen verilerin ne kadar önemli olduğunu söylemek yerinde olacaktır (43, 46, 48, 79, 80).

Bovine ephemeral fever erken dönemde tedavi amaçlı uygulamaların (non-steroid anti-inflamatuvar uygulaması, kalsiyum takviyeleri vs.) fayda sağladığı nadir viral hastalıklardan biridir. Ancak klinik bulguların ani ve hızlı şekilde ortaya çıkmasıyla yüksek sığır popülasyonuna sahip yetiştirme bölgelerinde tüm hayvanlara müdahale edilmekte geç kalınması muhtemeldir. Bu süre içerisinde bir çok verim kaybına yol açması, ölümlerin görülmesi ve ticari kısıtlamalara yol açabilmesi nedeniyle koruyucu tedbirlerin alınması daha çok önerilen bir yaklaşımdır (6, 86, 97, 100, 103, 137). BEFV'ye karşı korumada en önemli tedbir aşılamaadır. BEF'e karşı inaktif, rekombinant, atenüe ve subunit aşılar geliştirilmiş ve bunların bir kısmı sahada kullanım alanı bulmuştur. Günümüze kadar ki hazırlanan aşılardan en etkin olanı canlı atenüe aşının Quil A saponin ile birlikte verilmesinden elde edilmiştir (134). Yoğun sivrisinek popülasyonu bulunan bölgelerde yapılan canlı aşılar bir risk doğurabilmektedir. Canlı aşı suşunun

sivrisinekler tarafından alınarak gerek kendi aralarında gerekse sığırlarda doğal pasajının gerçekleşmesi bu virüsün mutasyonlarla tekrar virülens kazanabileceğini düşündürmüş ve araştırmacıların bir kısmı bu aşıya karşı çıkmıştır. Ayrıca canlı aşının hazırlanması aşamasında oluşacak bir kontaminasyon hayvan sağlığı açısından büyük riski de beraberinde getirmektedir (124, 130, 139). Atenüe aşılardan ancak tekrarlı inokülasyonları BEF'e karşı koruyucu yanıtı uyarmaktadır. Bu durum atenüasyon işlemi esnasında virüsün patojenitesinin yanında antijenitesini de kaybettiğini göstermektedir. Bu sebeple araştırmacıların bir kısmı atenüe aşılarında adjuvan kullanarak etkinliği artırma yoluna gitmiştir. Bu durum ise maliyeti artırmıştır.

İnaktif aşılar güvenlidir ve uygun adjuvan ile verildiğinde koruyucu antikor titresini uyarabilmektedir. Ancak virüsü inaktif hale getirme ve adjuvan kullanma gereksiniminin maliyeti artırması bu aşının dezavantajları arasında yer almaktadır. Aşının güvenli sayılabilmesi hazırlanan aşısındaki canlı virüs tamamen inaktif hale geçmiş olmalıdır. Bazı adjuvanlar istenmeyen türden reaksiyonlar oluşturabilmekte ve tekrarlı kullanımı sonrasında ise hücrel proteinlere karşı sitotoksikite geliştirebilmektedir. İnaktif aşılamadan sonra antikor titresinin hızla düşmesi ve kısa süreli koruyucu yanıt oluşturmaması bu aşının bir diğer dezavantajını teşkil etmektedir. BEF'e karşı geliştirilen inaktif aşıların koruyucu yanıtı uyarmaması konusunda çelişkili raporlar mevcuttur. İsrailde water in oil in water emülsifiye (Montanide ISA 206) inaktif aşısı geliştirilmiş ve üçüncü aşılamadan sonra antikor titresini 1:256'a ulaşmasına rağmen saha virüsüne karşı koruyucu etkinlik %50 olarak bulunmuş ve bu durum hayal kırıklığı yaratmış ve araştırmacılar hücrel yanıtın önemini vurgulamıştır (124, 132, 135, 138, 139).

Subunit aşılar viral proteinlerin deterjanla ayrılarak pürifiye edilmesi ya da rekombinant DNA teknolojisi ile eksprese edilen proteinlerin saflaştırılması ile hazırlanabilmektedir. Yapılan çalışmalarda subunit aşıların etkinliğini artırmak için adjuvana gereksinim duyulmuş buna rağmen subunit aşılar da inaktif aşılarla benzer şekilde yetersiz kalmıştır. Çin’de yapılan bir çalışmada hayvanlara verilen G subunit aşısı sonrası 6. ayda %50 koruma sağlarken 9. ayda koruma sağlamamıştır (134). Avustralya’da geliştirilen Quil A adjuvanlı G protein aşısı ise 104. günde deneysel enfeksiyona karşı %100 koruma göstermiştir. Subunit aşılarla proteinleri pürifiye etme gereksinimi, adjuvanizasyon işlemi esnasında viral proteinlerin konformasyonunda meydana gelen değişimler bu türden aşıların olumsuz yanlarıdır (74).

Bovine ephemeral fever’a karşı hazırlanmış viral vektör tabanlı aşılar yüksek düzeyde hücresel ve humoral yanıt oluşturmayı başarmıştır. Ancak bunların bir kısmı deneysel enfeksiyondan korunmada başarısız olmuştur (140, 141). Ayrıca viral vektör tabanlı aşılarla konakçı genomu ile aralarında gen transferi meydana gelebilmektedir. Bunlara ilaveten vektör virüse karşı önceden varolan bağışıklık sebebiyle viral vektörü hedef alan antikolar vektörün çoğalmasını engelleyebilmektedir. Bu nedenle tekrarlı inokülasyonları da elverişsizdir (18, 19).

Rekombinant DNA aşılarında birçok virüs için büyük gelişmeler kaydedilmiş ve bu sonuçlar özellikle diğer aşı türlerinin olumsuz yanlarını ortadan kaldırma adına gelecek için umut verici olmuştur (148). Özellikle son zamanlarda ilk doz DNA aşısı ve booster dozların subunit, inaktif ya da viral vektör tabanlı aşılarla sağlandığı ‘*DNA priming-subunit/killed vaccine/viral vector boosting*’

konsepti ile daha iyi neticeler alınmıştır. Özellikle bu kombinasyonda daha iyi hücresel yanıt alınabilmekle birlikte ve vektör tabanlı aşılarda tekrarlı dozlarda ortaya çıkan inhibisyon sorunu ortadan kaldırılabilmektedir. Ayrıca maliyeti de düşürebilmektedir. Olumsuz yanı iki farklı aşı tipinin hazırlanmasıdır (3, 12, 33, 34, 35, 149).

Bu tezde G ve N genlerini farelerde eksprese eden DNA aşısının oluşturulması hedeflenmiştir. Bu amaçla cDNA'lara dönüştürülen gen bölgeleri pcDNA4/HisMax[®] TOPO[®] ekspresyon vektörüne klonlandı. Aşılama öncesi plazmidlerin gen düzeyinde ekspresyonu (mRNA) RT-PCR ile protein düzeyindeki ekspresyonu ise Western blot ve immunoperoksidaz yöntemleri ile ortaya konuldu.

pcDNA4-G ve pcDNA4-N plazmidleri ile aşılanan deney farelerinde antikor yanıtlar ölçüldü. İndirek ELISA testi ve nötralizasyon testi ile bu proteinlere karşı antikor varlığına rastlandı. Nötralizan antikor yanıtlar plak redüksiyon nötralizasyon testi ile ölçüldü. Plak redüksiyon nötralizasyon testi sonuçları PRNT₅₀'e göre değerlendirildi. Bovine ephemeral fever virüs için altın standart olan serum mikronötralizasyon testininin bu etken için standardize edilmemiş olması aşı çalışmalarında çelişkili sonuçlar ortaya çıkarabilmektedir (132). Bu nedenle mevcut çalışmada PRNT tercih edildi. Bu tez çalışmasında ELISA ve PRNT₅₀ sonuçları tutarlı çıkmıştır. PRNT₅₀ sonucuna göre en yüksek nötralizan antikor yanıt ortaya çıkaran fareler indirek ELISA testinde de yüksek antikor yanıt ortaya koymuştur. Beklendiği gibi pcDNA4-G plazmidi ile aşılanan farelerde nötralizan antikor oluşurken diğer gruplarda nötralizan antikor oluşmamıştır. ELISA ve PRNT₅₀ sonuçlarına göre DNA aşısı verilen gruptaki

antikor değerleri ve ortalamaları BEFV immun gruptan daha dūřuk çıkmıştır. Son immun serum (30. gūn) kullanılarak yapılan indirek ELISA sonuçlarına gōre pcDNA4-G ve pcDNA4-N immun grubundaki farelerden yalnızca ikisi hesaplanan cutoff değerini aşabilmiştir. BEFV immun gruptaki farelerin ise tamamı cutoff değerini aşmıştır. Mevcut çalışmada her ne kadar cutoff değerine gōre rekombinant vektōr immun çalışma grubundaki az sayıda farede pozitiflik belirlenmiş olsa da bu guplardaki OD değerleri kontrol gruplarına gōre daha yūksək ve cutoff değerine yakın bulunmuştur. Çalışmada cutoff değeri ū standart sapmaya gōre hesaplanmıştır. şayet bu değer, bazı ELISA çalışmalarında olduğu gibi, iki standart sapmaya gōre hesaplanacak olsa idi bir çok fare pozitif belirlenecekti.

Çalışma bir aylık sūredeki antikor yanıtı ortaya çıkarmaya yōnelik dizayn edilmiştir. Attenūe ve inaktif aşılara kıyasla DNA aşılarının dezavantajlarından biri antikor yanıtın yavaş gelişmesidir. İlerleyen zamanlarda bu yanıtın artması muhtemeldir. Bu çalışmanın sonucuna gōre BEFV immun gruptaki deney farelerinden 13. gūn antikor yanıt alınabilirken pcDNA4-G ve pcDNA4-N immun gruptaki farelerde ise yanıt daha geç ortaya çıkmıştır. Bu durum DNA aşılarının diğer tūrden aşılara gōre daha geç yanıt ortaya çıkarması bilgisi ile ūrtūřmektedir. Bu durumu değiştirmek adına araştırmacılar tarafından elektroporasyon ve gen tabancası gibi transfer sistemleri tercih edilebilmektedir (28). Son çalışmalarda bu husus dikkate alındığından dolayı immun yanıtın kısa sūrede oluşması için lenf yumrularına yakın bōlgeler tercih edilebilmektedir. Bu çalışmadaki dūřuk ve yavaş gelişen antikor yanıtın sebeplerinden biri aşının uygulama yolu olabilmektedir. Daha kolay ve genel bir uygulama yolu olmasından dolayı bu

çalışmada deney gruplarına immunizasyonların kas içi yapılması tercih edilmiştir. Ancak kas içi uygulama sonrası çoğunlukla miyositler transfekte olmaktadır. Bu bölge dentritik hücrelerle donatılmamıştır ve miyositlerin MHC II ile CD4⁺ T hücrelerine antijen sunma yeteneği yoktur dolayısıyla oluşan yanıt hücresel ağırlıklı ve antikor yanıt daha düşük seviyeli şekillenmektedir. Ayrıca bu bölgeye yapılan aşılamalarda serum proteinleri tarafından meydana gelen DNA degradasyonu daha fazla olması ekspresyonların seviyesini düşürerek antikor yanıtın daha geç ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir (15, 22). Bu amaçla ilerleyen zamanlarda hem MHC-I ve MHC-II molekülü taşıyan profesyonel antijen sunucu hücrelerin yoğun bulunduğu (deri) ve onların da transfeksiyonunu içerecek şekilde aşılamalar yapılarak elde edilecek sonuçlar bu çalışmanın sonucu ile kıyaslanabilir.

Bu tezde, aşı etkinliğinin artırılması, degradasyonların en alt seviyeye düşürülmesi amacıyla son dönemde transfeksiyon çalışmalarının popüler ajanı Lipofektamin 2000 kullanılmış olup çalışmaya bu yönüyle de özgün değer kazandırılmıştır. Deneme hayvanlarına 100 µg plazmid ile %10'u oranında (10 µl) lipofektamin ile karıştırılarak verilmiştir. Lipofektamin, katyonik lipid içermekte ve lipozomal ajan olarak kimyasal adjuvan sınıfında yer almaktadır. Özellikle enjeksiyon sonrası DNA'nın degradasyonunu büyük ölçüde önlediği bilinmektedir. Ayrıca, plazmidin endozomlardan kaçışını kolaylaştırmakta ve plazmidin çekirdeğe ulaşmasında da etkin rol oynamaktadır (22, 23). Çalışmada Lipofektaminin kullanılmadığı pcDNA4-G ve pcDNA4-N immunize deney grupların olmaması nedeniyle Lipofektamin kullanımının ne derecede etkinliği artırdığı bilinmemektedir. Ayrıca farklı miktarlarda lipofektaminin test edilmemiş

olması ortaya çıkan düşük yanıtın lipofektamin miktarından kaynaklı olup olmadığı konusunda belirsizliğini korumaktadır. Şunu söylemek gerekir ki bu çalışma lipofektaminin hangi miktarlarda kullanılması gerektiği üzerine dizayn edilen bir çalışma olmadığından bu konu şu an için arka planda kalmaktadır. Lipofektamin miktarının artırılması maliyetin de artmasına yol açacaktır ancak daha düşük miktarla benzer sonuçların alınması konusunda bu türden bir ön çalışmanın yapılması şüphesiz fayda sağlayacaktı.

Aşılamalar arasında yeterli aralığa izin verilmez ise antijen ve yardımcı T hücreleri arasında yeterli etkileşim olmayabilir ve bu durum yetersiz immun yanıtı uyarımına sebep olabilmektedir. Bu tezde birinci immunizasyondan iki hafta sonra ikinci aşı yapılmış son aşılama ise ikinci aşıdan bir hafta sonra uygulanmıştır. Bu sürenin immun yanıt için yeterli olduğu düşünülmektedir. Ancak farklı aralıklarda denemeler yapılmadığı için net bir şey söylemek mümkün değildir.

Bu tez çalışmasında model olarak BALB/c faresi tercih edilmiştir. PRNT₅₀ sonuçlarına göre en yüksek antikor yanıt 1:20 şeklindedir. Aynı süre içerisinde BEFV immunize hayvandan alınan antikor titresi 1:80 bulunmuştur. Bir sığır yada buzağıda 1:20 NA yanıt alınmış olsaydı koruyuculuk yetersiz olduğu söylenebilirdi. Çünkü araştırmacıların bir kısmı mikronötralizasyon testi sonuçlarına göre BEFV'e karşı gereken koruyucu titrenin sığırlarda 1:32-64 arasında değiştiğini belirtmişlerdi (134, 150). Ancak yapılan çalışmalarda koruyuculuğun yalnızca nötralizan antikorla değerlendirilemeyeceğine dair veriler mevcuttur (124, 130, 132). Della porta ve ark. (1979) yaptıkları çalışmada canlı aşı ile aşılanan hayvanlarda nötralizan antikor gelişmemesine rağmen hastalıktan

koruduğunu rapor etmiş ve benzer şekilde kuduz virüsüne karşı dirençte nötralizan yanıtı ihtiyacı olmadığını belirterek bu sonucu desteklemiştir (133). Yine aynı çalışmada düşük pasaj seviyesinde üretilen eşdeğer özellikteki canlı ve inaktif aşının etkilerini kıyaslamış ve canlı aşının sığırlarda koruma sağlarken, 500 kat daha fazla konsantrasyondaki inaktif aşının ise daha yüksek miktarda antikor üretmesine rağmen koruma sağlamadığını bildirerek viral enfeksiyonlarda hücrel immun yanıtın önemini vurgulamışlardır (133). Bu açıdan düşünüldüğünde, DNA aşısının güçlü hücrel yanıtı oluşturduğu bilindiğine göre aşının koruyuculuğu için net bir şey söylenememekte ve deneysel enfeksiyona ihtiyaç duyulmaktadır.

Aşılamada ilk hedef antikor üretimi olsa da iyi bir yanıt ortaya çıkarmak için yardımcı T hücrelerinin yeterli düzeyde uyarılması gereklidir. T hücreleri, yüksek affiniteye sahip antikorların ve bağışıklık hafızasının oluşmasında birincil olarak görevlidir (151). Ayrıca B hücrelerin ve $CD8^+$ T hücrelerinin oluşumu yanında devamlılıklarının sağlanması $CD4^+$ T hücreleri tarafından kontrol edilmektedir (152). BEFV G proteini B hücreleri için güçlü immunojenik fakat yardımcı T hücreler için zayıf immunojenik olan epitoplara içermektedir. Aşıların birçok hastalıktan koruması için B hücre yanıtına ilave olarak T hücre yanıtı uyaran antijen grubu içermesi gerekmektedir. BEFV N proteinin T proliferasyonunu artırıcı etkisinin olduğu ve benzer şekilde VSV N proteinin virüs spesifik sitotoksik T lenfositleri için baskın antijenleri içerdiği görülmüştür (74). Bu bilgilere dayanarak G ve N proteinlerinin aşılarla birlikte verilmesi hedeflenerek daha iyi bir immun yanıt ortaya çıkarması beklenmektedir. Bu sebepten, gelecekte yapılması hedeflenen bu

çalışmanın bir ön adımı olarak G proteine ilaveten N proteinlerini açıklatan vektörler de immunizasyonda tercih edilmiştir.

Çalışma değişik yönlerden değerlendirildiğinde önemli eksiklerden biri DNA aşısının özellikle inaktif ve subunit aşılarla göre ön plana çıkaran hücresel yanıtın değerlendirilmemiş olmasıdır. Bu amaçla CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerine yönelik akış simometrisi, T hücre proliferasyon deneyleri yapılmasının yanında, hücresel ve humoral yanıt hakkında ön değerlendirme yapabilmemizi sağlayan sitokinlerin miktarı ELISA testi ve qRT-PCR testleri ile ortaya konulabilirdi. Özellikle rhabdovirüslerde N proteinin T hücre proliferasyonunu artırdığı bilinmektedir. Deneme farelerine bu amaçla pcDNA4-G ve pcDNA4-N aşısına ek olarak bu iki aşı birlikte verilerek de hücresel ve humoral yanıt ortaya konulabilirdi. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda B hücreleri, sitotoksik T hücreleri ve yardımcı T hücrelerini hedef alan multi-epitop aşılarının etkin sonuçlar ortaya çıkardığı bilinmektedir (153). Çalışmada kısa süreli immun yanıt hedef alınsa da uzun süreli immun yanıtın akıbeti yanıtın ne derece değişeceği de merak konusudur. Uygun hayvan modeli olmasa da immun yanıtın değerlendirilmesinde fareler birçok araştırmacı tarafından tercih edilmiştir. Ancak şunu söylemek gerekir ki deneysel hayvan modeli olmadığı için, farelerde alınacak sonuçlar tam anlamıyla aşının etkinliği veya koruyuculuğu açısından net bir sonuç ortaya koyamayacak, yalnızca bir ön değerlendirme sağlayacaktır.

Sonuç olarak tezin başında belirlenen hedeflere büyük oranda ulaşılmıştır. Ülkemizde 2012 yılında ortaya çıkan ve vaka ölüm oranı yüksek seyreden salgında elde edilen izolatın tam genom sekansı yapılmış ve bu virüsün moleküler karakterizasyonu ortaya konmuştur. Ayrıca, rekombinant vektörlerle immunize

edilen tüm hayvanlarda istenilen düzeyde antikor yanıt belirlenmemesine karşı özellikle pcDNA4-G rekombinant plazmide karşı nötralizan antikorların tespit edilmesi gelecek adına umut vericidir. Gelecek çalışmalarda yerinde modifikasyonlar ile antikor yanıtın artırıldığı ve hücresel yanıtın da ortaya konduğu uzun süreli bir immun yanıtın belirlenmesine yönelik araştırmalar hedeflenmektedir. Ayrıca, teorikte immun yanıtı artıracığı düşünülen G ve N kombine plazmid aşı denemeleri planlanmaktadır.



7. KAYNAKLAR

1. Nambiar PH, Daza AD, Livornese Jr. LL. Clinical Impact of Vaccine Development. In: Thomas S. (Editor). Vaccine Design Methods and Protocols Volume 1: Vaccines for Human Diseases. Part I, Chapter I. Vaccines: Introduction 1st Edition, New York: Humana Press 2016; 3-41.
2. Hasson SSAA, Al-Busaidi JKZ, Sallam TA. The past, current and future trends in DNA vaccine immunisations. Asian Pac J Trop Biomed 2015; 5: 344-353.
3. Dhama K, Mahendran M, Gupta PK, Rai A. DNA vaccines and their applications in veterinary practice: current perspectives. Vet Res Commun 2008; 32: 341-346.
4. Faurez F, Dory D, Le Moigne V, Gravier R, Jestin A. Biosafety of DNA vaccines: New generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection. Vaccine 2010; 28: 3888-3895.
5. St George TD, Murphy GM, Buren B, Uren MF. Studies on the pathogenesis of bovine ephemeral fever IV: A comparison with the inflammatory events in milk fever of cattle. Vet Microbiol 1995; 46: 131-142.
6. Nandi S, Negi BS. Bovine ephemeral fever: a review. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1999; 22: 81-91.
7. Tonbak Ş, Berber E, Çabalar M. Türkiye'nin bazı bölgelerinde 2008 yılında görülen bovine ephemeral fever virüs enfeksiyonlarının polimeraz zincir reaksiyonuyla belirlenmesi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi 2013; 27: 35-37.
8. Hertig C, Pye AD, Hyatt AD, et al. Vaccinia virus-expressed bovine ephemeral fever virus G but not Gns glycoprotein induces neutralizing antibodies and protects against experimental infection. J Gen Virol 1996; 77: 631-640.
9. Donnelly JJ, Wahren B, Liu MA. DNA vaccines: progress and challenges. J Immunol 2005; 175: 633-639.
10. Brandsma JL. DNA vaccine design. In: Saltzman WM, Shen H, Brandsma JL. (Editors). DNA vaccines methods and protocols. Part I, Chapter I. DNA vaccine design 2nd Edition, Humana Press 2006; 3-11.
11. Boyle JS, Barr IG, Lew AM. Strategies for improving responses to DNA vaccines. Mol Med 1999; 5: 1-8.
12. Pereira VB, Zurita-Turk M, Saraiva TDL, et al. DNA vaccines approach: from concepts to applications. World Journal of Vaccines 2014; 4: 50-71.
13. Lin F, Shen X, McCoy JR, et al. A novel prototype device for electroporation-enhanced DNA vaccine delivery simultaneously to both skin and muscle. Vaccine 2011; 29: 6771-6780.
14. Stachyra A, Góra-Sochacka A, Sirko A. DNA vaccines against influenza. Acta Biochim Pol 2014; 61: 515-522.

15. Redding L, Weiner DB. DNA vaccines in veterinary use. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8: 1251-1276.
16. Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 2011; 10: 499-511.
17. Coban C, Kobiyama K, Jounai N, Tozuka M, Ishii KJ. DNA vaccines: a simple DNA sensing matter? *Hum Vaccin Immunother* 2013; 9: 2216-2221.
18. Leitner WW, Ying H, Restifo NP. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine* 1999; 18: 765-777.
19. Griffiths KL, Khader SA. Novel vaccine approaches for protection against intracellular pathogens. *Curr Opin Immunol* 2014; 28: 58-63.
20. Ramsay AJ, Ramshaw IA, Ada GL. DNA immunization. *Immunol Cell Biol* 1997; 75: 360-363.
21. Sharma AK, Khuller GK. DNA vaccines: future strategies and relevance to intracellular pathogens. *Immunol Cell Biol* 2001; 79: 537-546.
22. Wang G, Pan L, Zhang Y. Approaches to improved targeting of DNA vaccines. *Hum Vaccin* 2011; 7: 1271-1281.
23. Greenland JR, Letvin NL. Chemical adjuvants for plasmid DNA vaccines. *Vaccine* 2007; 25: 3731-3741.
24. Wang S, Zhang C, Li J, Huang Z, Lu S. The relative immunogenicity of DNA vaccines delivered by the intramuscular needle injection, electroporation and gene gun methods. *Vaccine* 2008; 26: 2100-2110.
25. Zhang HY, Sun SH, Guo YJ, et al. Tissue distribution of a plasmid DNA containing epitopes of foot-and-mouth disease virus in mice. *Vaccine* 2005; 23: 5632-5640.
26. Lechardeur D, Sohn KJ, Haardt M, et al. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther* 1999; 6: 482-497.
27. Capecchi MR. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 1980; 22: 479-488.
28. Grunwald T, Ulbert S. Improvement of DNA vaccination by adjuvants and sophisticated delivery devices: vaccine-platforms for the battle against infectious diseases. *Clin Exp Vaccine Res* 2015; 4: 1-10.
29. Abdullaqq SA, Weiner DB. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. *Immunol Res* 2008; 42: 219-232.
30. Ferraro B, Morrow MP, Hutnick NA, et al. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clin Infect Dis* 2011; 53: 296-302.
31. Higgins D, Marshall JD, Traguina P, Van Nest G, Livingston BD. Immunostimulatory DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 2007; 6: 747-759.
32. Khan KH. DNA vaccines: roles against diseases. *Germes* 2013; 3: 26-35.

33. Wahren B, Liu MA. DNA vaccines: recent developments and the future. *Vaccines* 2014; 2: 785-796.
34. Williams JA. Vector design for improved DNA vaccine efficacy, safety and production. *Vaccines* 2013; 1: 225-249.
35. Meunier M, Chemaly M, Dory D. DNA vaccination of poultry: the current status in 2015. *Vaccine* 2016; 34: 202-211.
36. Wang Y, Yue X, Jin H, et al. A suicidal DNA vaccine expressing the fusion protein of peste des petits ruminants virus induces both humoral and cell-mediated immune responses in mice. *J Virol Methods* 2015; 225: 35-40.
37. Lodmell DL, Ray NB, Parnell MJ, et al. DNA immunization protects non-human primates against rabies virus. *Nat Med* 1998; 4: 949-952.
38. Xiang Z, Spitalnik S, Tran M, et al. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 1994; 199: 13-40.
39. Fekadu M, Summer JW, Shaddock JH, Sanderlin DW, Baer GM. Sickness and recovery of dogs challenged with a street rabies virus after vaccination with a vaccinia virus recombinant expressing rabies virus N protein. *J Virol* 1992; 66: 2601-2604.
40. Yuan Z, Zhang S, Liu Y, et al. A recombinant pseudorabies virus expressing rabies virus glycoprotein: Safety and immunogenicity in dogs. *Vaccine* 2008; 26: 1314-1321.
41. Tesoro Cruz E, Feria Romero IA, López Mendoza JG, et al. Efficient post-exposure prophylaxis against rabies by applying a four-dose DNA vaccine intranasally. *Vaccine* 2008; 26: 6936-6944.
42. Cantlon JD, Gordy PW, Bowen RA. Immune responses in mice, cattle and horses to a DNA vaccine for vesicular stomatitis. *Vaccine* 2000; 18: 2368-2374.
43. Walker PJ. Bovine ephemeral fever in Australia and the world. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 292: 57-80.
44. Akakpo AJ. Three-day fever. *Rev Sci Tech* 2015; 34: 533-538.
45. Bevan LEW. Preliminary report on the so-called 'stiffsickness or three-day-sickness' of cattle in Rhodesia. *J Comp Path Therap* 1907; 20: 104-113.
46. Walker PJ, Klement E. Epidemiology and control of bovine ephemeral fever. *Vet Res* 2015; 46: 124.
47. He CQ, Liu YX, Wang HM, et al. New genetic mechanism, origin and population dynamic of bovine ephemeral fever virus. *Vet Microbiol* 2016; 182: 50-56.
48. Oğuzoğlu TÇ, Ertürk A, Çizmeci ŞG, Koç BT, Akça Y. A report on bovine ephemeral fever virus in Turkey: antigenic variations of different strains of EFV in the 1985 and 2012 outbreaks using partial glycoprotein gene sequences. *Transbound Emerg Dis* 2015; 63: 66-70.

49. Mellor PS, Jennings DM, Hambling C, et al. Control of Akabane disease and surveillance of bluetongue and ephemeral fever. 24. United Nations Development Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1995, Rome.
50. Karaoğlu T, Özgünlük İ, Demir B, Özkul A, Burgu İ. Seroprevalance of culicoides-borne disease in cattle in European Turkey. Vet J Ankara Univ 2007; 54: 121-125.
51. Albayrak H, Özcan E. Orta Karadeniz bölgesinde ruminant ve tek tırnaklılarda kan emici sineklerle nakledilen bazı arboviral enfeksiyonların seroprevalansı. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2010; 16: 33-36.
52. Erol N, Koç BT, Gür S, Gür S, Çağlav VÖ, Tan MT. Aydın ve Muğla illerinde Bovine Ephemeral Fever Virus enfeksiyonunun serolojik olarak araştırılması. Kocatepe Veteriner Dergisi 2015; 8: 45-49.
53. Tonbak S, Berber E, Yoruk MD, et al. A large-scale outbreak of bovine ephemeral fever in Turkey, 2012. J Vet Med Sci 2013; 75: 1511-1514.
54. Condit RC. General Virology. In: Knipe DM, Howley PM. (Editors). Fields Virology. Chapter I, Section I. Principles of Virology 6th Edition, Philadelphia: Lippincot 2013: 21-52.
55. The Nature of Viruses. In: MacLachlan NJ, Dubovi EJ. (Editors). Fenner's Veterinary Virology. Chapter I, Section I. The Principles of Veterinary and Zoonotic Virology 4th Edition, San Diego: Academic Press 2011: 3-21.
56. ICTV. "ICTV Online (10th) Report 2017". https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negativesensornaviruses/mononegavirales/w/rhabdoviridae/792/genus-ephemerovirus (Erişim tarihi : 02.04.2018)
57. Knipe DM, Howley PM. (Editors). Fields Virology. Chapter 31, Section II. Rhabdoviridae. 6th Edition, Philadelphia: Lippincot 2013: 885-922.
58. Walker PJ. Animal Viruses of Agricultural Importance. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV. (Editors). Desk Encyclopedia of Animal and Bacterial Virology. Section I . Bovine Ephemeral Fever Virus. 2nd Edition, San Diego: Academic Press 2009: 57-65.
59. Blasdel KR, Widen SG, Diviney SM, et al. Koolpinyah and Yata viruses: two newly recognised ephemeroviruses from tropical regions of Australia and Africa. Vet Microbiol 2014; 174: 547-553.
60. Murph FA, Taylor WP, Mims CA, Whitfield SG. Bovine Ephemeral Fever Virus in cell culture and mice. Arch Gesamte Virusforsch 1972; 38: 234-249.
61. Heuschele WP. Bovine ephemeral fever. I. Characteristics of the causative virus. Arch Gesamte Virusforsch 1970; 30: 195-202.
62. Della-Porta AJ, Brown F. The physico-chemical characterization of bovine ephemeral fever virus as a member of the family Rhabdoviridae. J Gen Virol 1979; 44: 99-112.
63. Huang AS. Defective interfering viruses. Annu Rev Microbiol 1973; 27: 101-118.

64. Tzipori S. The isolation of bovine ephemeral fever virus in cell culture and evidence for autointerference. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1975; 53: 273-279.
65. Bulut H, Azkur AK. Bovine ephemeral fever virus. In: Liu D. (Editor). Chapter 40. *Molecular Detection of Animal Viral Pathogens* 1st Edition, CRC Press 2016: 355-358.
66. Walker PJ, Bryne KA, Riding GA, et al. The genome of bovine ephemeral fever rhabdovirus contains two related glycoprotein genes. *Virology* 1992; 191: 49-61.
67. FU ZF. *The World of Rhabdoviruses*. 1st Edition, Springer, 2005.
68. Johal J, Gresty K, Kongsuwan K, Walker PJ. Antigenic characterization of bovine ephemeral fever rhabdovirus G and Gns glycoproteins expressed from recombinant baculoviruses. *Arch Virol* 2008; 153: 1657-1665.
69. McWilliam SM, Kongsuwan K, Cowley JA, Byrne KA, Walker PJ. Genome organization and transcription strategy in the complex Gns-L intergenic region of bovine ephemeral fever rhabdovirus. *J Gen Virol* 1997; 78: 1309-1317.
70. Joubert DA, Blasdel KR, Audsley MD, et al. Bovine ephemeral fever rhabdovirus α 1 protein has viroporin-like properties and binds importin β 1 and importin 7. *J Virol* 2014; 88: 1591-1603.
71. McWilliam SM, Cowley JA, Walker PJ. Expression in *Escherichia coli* of the nucleoprotein (N) and glycoproteins (G and Gns) of Bovine Ephemeral Fever Virus. Bovine ephemeral fever and related rhabdoviruses: Proceedings of the 1st International Symposium held in Beijing, PRC. 1993; 103-107.
72. Uren MF, Zakrzewski H, Davis SS. Antibody and cell proliferative responses of cattle vaccinated with bovine ephemeral fever virus proteins. Bovine ephemeral fever and related rhabdoviruses: Proceedings of the 1st International Symposium held in Beijing, PRC, 1993; 122-126.
73. Blasdel KR, Voysey R, Bulach D, et al. Kotonkan and Obodhiang viruses: African ephemeroviruses with large and complex genomes. *Virology* 2012; 425: 143-153.
74. Uren MF, Walker PJ, Zakrzewski H, St George TD, Byrne KA. Effective vaccination of cattle using the virion G protein of bovine ephemeral fever virus as an antigen. *Vaccine* 1994; 12: 845-850.
75. Cybinski DH, Walker PJ, Byrne KA, Zakrzewski H. Mapping of antigenic sites on the bovine ephemeral fever virus glycoprotein using monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 1990; 71: 2065-2072.
76. Cybinski DH, Davis SS, Zakrzewski H. Antigenic variation of the bovine ephemeral fever virus glycoprotein. *Arch Virol* 1992; 124: 211-224.
77. Zakrzewski H, Cybinski DH, Walker PJ. A blocking ELISA for the detection of specific antibodies to bovine ephemeral fever virus. *J Immunol Methods* 1992; 151: 289-297.

78. Zheng FY, Lin GZ, Qiu CQ, et al. Serological detection of bovine ephemeral fever virus using an indirect ELISA based on antigenic site G1 expressed in *Pichia pastoris*. *Vet J* 2010; 185: 211-215.
79. Walker PJ, Cybinski DH. Bovine ephemeral fever and rhabdoviruses endemic to Australia. *Aust Vet J* 1989; 66: 398-400.
80. Davis SS, Cybinski DH, Walker PJ. Bovine Ephemeral fever strain variation. Bovine ephemeral fever and related rhabdoviruses. Proceedings of the 1st International Symposium held in Beijing, PRC, 1993, pp.127-130.
81. Trinidad L, Blasdel KR, Joubert DA, et al. Evolution of bovine ephemeral fever virus in the Australian episystem. *J Virol* 2014; 88: 1525-1535.
82. Bakhshesh M, Abdollahi D. Bovine Ephemeral Fever in Iran: Diagnosis, isolation and molecular characterization. *J Arthropod Borne Dis* 2015; 9: 195-203.
83. Zheng F, Qiu C. Phylogenetic relationships of the glycoprotein gene of bovine ephemeral fever virus isolated from mainland China, Taiwan, Japan, Turkey, Israel and Australia. *Virol J* 2012; 9: 268.
84. Cheng CY, Shih WL, Huang WR, et al. Bovine ephemeral fever virus uses a clathrin-mediated and dynamin 2-dependent endocytosis pathway that requires Rab5 and Rab7 as well as microtubules. *J Virol* 2012; 86: 13653-13661.
85. Cheng CY, Huang WR, Chi PI, Chiu HC, Liu HJ. Cell entry of bovine ephemeral fever virus requires activation of Src-JNK-AP1 and PI3K-Akt-NF- κ B pathways as well as Cox-2-mediated PGE2 /EP receptor signalling to enhance clathrin-mediated virus endocytosis. *Cell Microbiol* 2015; 17: 967-987.
86. Uren MF. Bovine Ephemeral Fever. *Aust Vet J* 1989; 66: 233-236.
87. Young PL, Spradbrow PB. The role of neutrophils in bovine ephemeral fever virus infection of cattle. *J Infect Dis* 1980; 142: 50-55.
88. Theodoridis A. Fluorescent antibody studies on ephemeral fever virus. *Onderstepoort J Vet Res* 1969; 36: 187-190.
89. Lorber D, Tenenbaum M, Thurston S, Gander GW, Goodale F. The fate of circulating leukocytic pyrogen in the rabbit. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; 137: 896-901.
90. Uren MF. Bovine ephemeral fever: pathology, virology and serology. In: Corner LA, Bagust TJ. (Editors). Australian standard diagnostic techniques for animal diseases. East Melbourne, Victoria: CSIRO 1993.
91. Burgess GW, Spradbrow PB. Studies on the pathogenesis of bovine ephemeral fever. *Aust Vet J* 1977; 53: 363-368.
92. St George TD, Cybinski DH, Murphy GM, Dimmock CK. Serological and biochemical factors in bovine ephemeral fever. *Aust J Biol Sci* 1984; 37: 341-349.

93. Uren MF, St George TD, Murphy GM. Studies on the pathogenesis of bovine ephemeral fever in experimental cattle III. virological and biochemical data. *Vet Microbiol* 1992; 30: 297-307.
94. Barigye R, Davis S, Hunt R, et al. Viral neurotropism, peripheral neuropathy and other morphological abnormalities in bovine ephemeral fever virus-infected downer cattle. *Aust Vet J* 2016; 94: 362-370.
95. Barigye R, Davis S, Hunt R, et al. Post-viraemic detection of bovine ephemeral fever virus by use of autogenous lymphoid tissue-derived bovine primary cell cultures. *Aust Vet J* 2017; 95: 49-52.
96. Parsonson IM, Snowdon WA. Ephemeral fever virus: excretion in the semen of infected bulls and attempts to infect female cattle by the intrauterine inoculation of virus. *Aust Vet J* 1974; 50: 329-334.
97. St George TD. Bovine ephemeral fever: a review. *Trop Anim Health Prod* 1988; 20: 194-202.
98. Tzipori S. The susceptibility of young and newborn calves to bovine ephemeral fever virus. *Aust Vet J* 1975; 51: 251-253.
99. Morgan I, Murray MD. The occurrence of ephemeral fever of cattle in Victoria in 1968. *Aust Vet J* 1969; 45:271-274.
100. Davis SS, Gibson DS, Clark R. The effect of bovine ephemeral fever on milk production. *Aust Vet J* 1984; 61: 128.
101. Newton LG, Wheatley CH. The occurrence and spread of ephemeral fever of cattle in Queensland. *Aust Vet J* 1970; 46: 561-568.
102. Iowa State University Center for Food Security and Public Health, "Bovine Ephemeral Fever" (2016). Center for Food Security and Public Health Technical Factsheets. 19. http://lib.dr.iastate.edu/cfsph_factsheets/19. (Erişim tarihi : 08.06.2017)
103. St George TD, Uren MF, Zakrzewski H. The pathogenesis and treatment of bovine ephemeral fever. *Arbovirus Research in Australia, Proceedings Fourth Symposium* May 6-9, 1986 pp. 303-307.
104. Davies FG, Ochieng P, Walker AR. The Occurrence of Ephemeral Fever in Kenya, 1968-1988. *Vet Microbiol* 1990; 22: 129-136.
105. Parsonson IM, Snowdon WA. Experimental infection of pregnant cattle with ephemeral fever virus. *Aust Vet J* 1974; 50: 335-337.
106. Birkett MA, Agelopoulos N, Jensen KMV, et al. The role of volatile semiochemicals in mediating host location and selection by nuisance and disease-transmitting cattle flies. *Med Vet Entomol* 2004; 18: 313-322.
107. Sellers RF. Weather, host and vector--their interplay in the spread of insect-borne animal virus diseases. *J Hyg* 1980; 85: 65-102.
108. Tzipori S, Spradbrow PB. Development and behaviour of a strain of bovine ephemeral fever virus with unusual host range. *J Comp Pathol* 1974; 84: 1-8.

- 109.Kirkland PD. Akabane and bovine ephemeral fever virus infections. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2002; 18: 501-514.
- 110.Aziz-Boaron O, Klausner Z, Hasoksuz M, et al. Circulation of bovine ephemeral fever in the Middle East-Strong evidence for transmission by winds and animal transport. *Vet Microbiol* 2012; 158: 300-307.
- 111.Walker PJ. Bovine ephemeral fever: cyclic resurgence of a climate-sensitive vector-borne disease. *Microbiology Australia* 2013; 34: 41-42.
- 112.Hayama Y, Moriguchi S, Yanase T, et al. Epidemiological analysis of bovine ephemeral fever in 2012-2013 in the subtropical islands of Japan. *BMC Vet Res* 2016; 12: 47.
- 113.Zaghawa A, Housawi FMT, Al-Naeem A, et al. Risk analysis and seroprevalence of bovine ephemeral fever virus in cattle in the Kingdom of Saudi Arabia. *Trop Anim Health Prod* 2016; 48: 487-492.
- 114.Doherty RL, George TD, Carley JG. Arbovirus infections of sentinel cattle in Australia and New Guinea. *Aust Vet J* 1973; 49: 574-579.
- 115.Snowdon WA. Some aspects of the epizootiology of bovine ephemeral fever in Australia. *Aust Vet J* 1971; 47: 312-317.
- 116.Tzipori TS, Spradbow PB, Doyle T. Laboratory and field studies with a bovine ephemeral fever vaccine. *Aust Vet J* 1975; 51: 244-250.
- 117.Zhang Zheji, 1993: Epidemiology and prevention of bovine ephemeral fever in Guangdong Province. Bovine ephemeral fever and related rhabdoviruses: Proceedings of the 1st International Symposium, Beijing, PRC, 1993: 120-121.
- 118.Yeruham I, Gur Y, Braverman Y. Retrospective epidemiological investigation of an outbreak of bovine ephemeral fever in 1991 affecting dairy cattle herds on the Mediterranean coastal plain. *Vet J* 2007; 173: 190-193.
- 119.St George TD, Standfast HA, Dyce AL. The isolation of ephemeral fever virus from mosquitoes in Australia. *Aust Vet J* 1976; 52: 242.
- 120.Braverman Y. "The vectors of bovine ephemeral fever, akabane and bluetongue viruses in Israel" in Proceedings of the 13th Symposium of Dairy Cattle Science, pp. 81-82, ZichronYaakov, Israel, February 2001.
- 121.Dik B, Muz D, Muz MN, Uslu U. The geographical distribution and first molecular analysis of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) species in the Southern and Southeastern Turkey during the 2012 outbreak of bovine ephemeral fever. *Parasitol Res* 2014; 113: 4225-4232.
- 122.Aziz-Boaron O, Brettschneider S, King R, Gelman B, Klement E. Seroprevalence of bovine ephemeral fever virus in domesticated and wildlife species during epidemic and inter-epidemic periods (2000-2009) in Israel. *Transbound Emerg Dis* 2015; 62: 183-187.

123. Anderson EC, Rowe LW. The prevalence of antibody to the viruses of bovine virus diarrhoea, bovine herpes virus 1, rift valley fever, ephemeral fever and bluetongue and to *Leptospira* sp in free-ranging wildlife in Zimbabwe. *Epidemiol Infect* 1998; 121: 441-449.
124. Tzipori S, Spradbrow PB. Studies on vaccines against bovine ephemeral fever. *Aust Vet J* 1973; 49: 183-187.
125. Spradbrow PB, Francis J. Observation on bovine ephemeral fever and isolation of virus. *Aust Vet J* 1969; 45: 525-527.
126. Matumoto M, Inaba Y, Tanaka Y, Ito H, Omori T. Behavior of bovine ephemeral fever virus in laboratory animals and cell cultures. *Jpn J Microbiol* 1970; 14: 413-421.
127. Van Der Westhuizen B. Studies on bovine ephemeral fever. I. Isolation and preliminary characterization of virus from natural and experimentally produced cases of bovine ephemeral fever. *Onderstepoort J Vet Res* 1967; 34: 29-40.
128. Snowdon WA. Bovine ephemeral fever: the reaction of cattle to different strains of ephemeral fever virus and the antigenic comparison of two strains of virus. *Aust Vet J* 1970; 46: 258-266.
129. Yeruham I, Van Ham M, Bar D, Yadin H, Tiomkin D. Economic aspects of the 1999 outbreak of bovine ephemeral fever in dairy cattle herds in the Jordan Valley in Israel. *Vet Rec* 2003; 153: 180-182.
130. Spradbrow PB. Attenuated vaccines against bovine ephemeral fever. *Aust Vet J* 1975; 10: 464-468.
131. Della Porta AJ, Snowdon WA. An experimental inactivated virus vaccine against bovine ephemeral fever 1. Studies of the virus. *Vet Microbiol* 1979; 4: 183-195.
132. Aziz-Boaron O, Gleser D, Yadin H, et al. The protective effectiveness of an inactivated bovine ephemeral fever virus vaccine. *Vet Microbiol* 2014; 173: 1-8.
133. Della-Porta AJ, Snowdon WA. An experimental inactivated virus vaccine against bovine ephemeral fever 2. Do neutralizing antibodies protect against infection? *Vet Microbiol* 1979; 4: 197-208.
134. Vanselow BA, Walthall JC, Abetz I. Field trials of ephemeral fever vaccines. *Vet Microbiol* 1995; 46: 117-130.
135. Inaba Y, Kurogi H, Sato K, et al. Formalin-inactivated, aluminum phosphate gel-adsorbed vaccine of bovine ephemeral fever virus. *Arch Gesamte Virusforsch* 1973; 42: 42-53.
136. Inaba Y, Tanaka Y, Sato K, Ito H, Omori T. Bovine epizootic fever. III. Loss of virus pathogenicity and immunogenicity for the calf during serial passage in various host systems. *Jpn J Microbiol* 1969; 13: 181-186.
137. Inaba Y, Kurogi H, Takahashi A, Sato K, Omori T. Vaccination of cattle against bovine ephemeral fever with live attenuated virus followed by killed virus. *Arch Gesamte Virusforsch* 1974; 44: 121-132.

138. Tzipori S, Spradbrow B. A cell culture vaccine against bovine ephemeral fever. *Aust Vet J* 1978; 54: 323-328.
139. Aziz-Boaron O, Leibovitz K, Gelman B, Kedmi M, Klement E. Safety, immunogenicity and duration of immunity elicited by an inactivated bovine ephemeral fever vaccine. *PLoS One* 2013; 8: e82217.
140. Zhang M, Ge J, Wen Z et al, Characterization of recombinant Newcastle disease virus expressing the glycoprotein of bovine ephemeral fever virus. *Arch Virol* 2017; 162: 359-367.
141. Wallace DB, Viljoen GJ. Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine* 2005; 23: 3061-3067.
142. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28: 2731-2739.
143. Sambrook J, Russel DW. In Vitro Amplification of DNA by the DNA Polymerase Chain Reaction. In: Argentine J, Irwin N, Janssen KA, Curtis S, Zierler M, McInerney N, Brown D and Susan Schaefer (Editors). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 3rd Edition, Volume 2 New York: Cold Spring Harbor 2001: A8.46.
144. Roehrig JT, Hombach J, Barrett AD. Guidelines for plaque-reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. *Viral Immunol* 2008; 21: 123-132.
145. Karagöz Y. SPSS 22 Uygulamalı Biyoistatistik. 2. baskı, Ankara, Nobel: 2015.
146. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA, Palladino MA. *Concepts of Genetics*. 10th Edition, Wilmington DE, Pearson: 2011.
147. Çatık S, Cihan H, Mecitoğlu Z, Özyiğit MÖ, Şentürk S. Ephemeral Fever Outbreak in a Dairy Herd in Adana Region. *J Biol Environ Sci* 2015; 9: 27-32.
148. Weiner DB. DNA vaccines: crossing a line in the sand. Introduction to special issue. *Vaccine* 2008; 26: 5073-5074.
149. Boxus M, Tignon M, Roels S, et al. DNA immunization with plasmids encoding fusion and nucleocapsid proteins of bovine respiratory syncytial virus induces a strong cell-mediated immunity and protects calves against challenge. *J Virol* 2007; 81:6879-6889.
150. Wang FI, Hsu AM, Huang KJ. Bovine ephemeral fever in Taiwan. *J Vet Diagn Invest* 2001; 13: 462-467.
151. Krogsaard M, Davis MM. How T cells 'see' antigen. *Nat Immunol* 2005; 6: 239-245.
152. Siegrist CA. Vaccine immunology. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA. (Editors). *Vaccines*. Section I. 6th Edition, Philadelphia: Saunders 2012: 14-33.
153. An LL, Whitton JL. A multivalent minigene vaccine, containing B-Cell, cytotoxic T Lymphocyte, and Th epitopes from several microbes, induces appropriate responses in vivo and confers protection against more than one pathogen. *J Virol* 1997; 71: 2292-2302.

8. ÖZGEÇMİŞ

01.02.1989 tarihinde Kayseri'nin Melikgazi ilçesinde doğmuşum. İlk ve ortaokulu aynı ilçedeki Müncübe Cingilhoğlu İlköğretim Okulu'nda (1995-2003), Lise öğrenimini (2003-2007) Kayseri Lisesi'nde tamamladım. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde lisans eğitimine 2008 yılında başladım. Veteriner Hekim olarak 2013 yılında mezun olduktan sonra 2014 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalında araştırma görevlisi kadrosuyla doktora eğitimine başladım. Doktora eğitimime halen aynı Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak devam etmekteyim.