

**ZONGULDAK İLİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN *APODEMUS* VE *MYODES*
(MAMMALIA: RODENTIA) TÜRLERİNİN POPULASYON YAPISI VE BU
TÜRLERİN TAŞIDIKLARI KUDUZ (LYSSAVIRUS)’UN BELİRLENMESİ**

Tuğçe CEYLAN

**Bülent Ecevit Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalında
Yüksek Lisans Tezi
Olarak Hazırlanmıştır**

**ZONGULDAK
EYLÜL 2014**

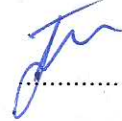
KABUL:

Tuğçe CEYLAN tarafından hazırlanan "ZONGULDAK İLİ'NDE YAYILIŞ GÖSTEREN *APODEMUS* VE *MYODES* (MAMMALIA: RODENTIA) TÜRLERİNİN POPULASYON YAPISI VE BU TÜRLERİN TAŞIDIKLARI KUDUZ (*LYSSAVIRUS*)' UN BELİRLENMESİ" başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 01/09/2014

Başkan: Prof. Dr. Mustafa SÖZEN
Bülent Ecevit Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Ferhat MATUR
Bülent Ecevit Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. İbrahim Mehmet Ali ÖKTEM
Dokuz Eylül Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç. Dr. Muhammet ÖREN
Bülent Ecevit Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç. Dr. Şenol ALAN
Bülent Ecevit Üniversitesi



ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım./...../2014



Prof. Dr. Şadi ŞEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadankaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”

T. Ceylan

Tuğçe CEYLAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ZONGULDAK İLİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN *APODEMUS* VE *MYODES* (MAMMALIA: RODENTIA) TÜRLERİNİN POPULASYON YAPISI VE BU TÜRLERİN TAŞIDIKLARI KUDUZ (LYSSAVIRUS)'UN BELİRLENMESİ

Tuğçe CEYLAN

Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ferhat MATUR

2. Tez Danışmanı: Prof. Dr. İ. Mehmet Ali ÖKTEM

Eylül 2014, 93 sayfa

Bu çalışmada, Zonguldak ilinin Çaycuma ilçesinde bulunan 15 lokaliteden toplam 242 *Apodemus* spp. ve *Myodes glareolus* türlerine ait örnekler kullanıldı. Bu örneklerden elde edilen beyin dokularından Rabies virus (RABV) taraması yapılmış, pozitif bant elde edilen lokalitelerdeki 45 örneğin kas ve dalak dokularından mikrosatelit belirteçler kullanılarak populasyonların genetik çeşitliliği incelenmiştir.

PZT yöntemi ile RABV taraması sonuçlarına göre 8 örnekte RABV pozitifliğine rastlanmıştır. Ancak sekans sonuçları gözlenen pozitifliği desteklememiştir.

Genetik karakterizasyonu çalışması sonuçlarına göre *Myodes* populasyonlarına ait toplam 60, *Apodemus* populasyonlarına ait 96 farklı allel belirlenmiştir. Heterozigotluk değerleri incelendiğinde *Myodes* populasyonlarında gözlenen heterozigotluk değerinin (H_o) 0,000 ile

ÖZET (devam ediyor)

0,625 arasında, *Apodemus* populasyonlarında gözlenen heterozigotluk değerinin (H_o) 0,367 ile 0,833 arasında değiştiği belirlenmiştir. Populasyonlar için hesaplanmış olan Fis değerleri *Myodes* populasyonları için -0,233 ile 0,600 arasında, *Apodemus* populasyonları için -1 ile 0,056 arasında değişim göstermektedir. Çalışmada *Myodes* populasyonları için Hardy-Weinberg dengesinden sapma olmadığı tespit edilirken, *Apodemus* populasyonlarında sadece Filyos populasyonunda 2 lokus açısından Hardy-Weinberg dengesinden sapma görülmüştür.

Bu çalışma ile Türkiye’de ilk defa kemiricilerde ters transkriptaz PZT yöntemi ve sekans analizi ile RABV taraması yapılmış, hem de ilk defa *Myodes* ve *Apodemus* populasyonlarında mikrosatelit belirteçler kullanılarak genetik karakterizasyon çalışması yapılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar çerçevesinde kemirici populasyonları ve taşıdıkları kuduz virüsü arasındaki korelasyonun saptanması içintemel oluşturulmuştur.

Anahtar Sözcükler: Kemirici, Kuduz, HNPCR, Dizi analizi, Populasyon Yapısı, Mikrosatelit, *Apodemus*, *Myodes*, Zonguldak.

Bilim Kodu: 401.04.04

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

POPULATION STRUCTURE OF *APODEMUS* AND *MYODES* (MAMMALIA: RODENTIA) SPECIES FROM ZONGULDAK AND DETERMINATION OF RABIES (LYSSAVIRUS) ON THESE SPECIES

Tuğçe CEYLAN

Bülent Ecevit University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Ferhat MATUR

Thesis Co-advisor: Prof. İ. Mehmet Ali ÖKTEM

September 2014, 93 pages

In this study, 242 *Apodemus* spp. and *Myodes glareolus* specimens collected from 15 localities in province Zonguldak, Çaycuma district were used. Brain tissues of these specimens were scanned for Rabies virüs (RABV). Muscle and spleen tissues of 45 specimens collected from localities, where we obtained positive bands were observed, to investigate genetical diversity via microsatellite markers.

Even results of PCR, 8 specimens are positive for RABV, positivity could not be support with sequence results.

According to genetical characterization, 60 different alleles belong to *Myodes* populations and 96 different alleles belong to *Apodemus* populations were determined. Heterozygosity (H_o) of *Myodes* populations were changing between 0,000 - 0,625, and heterozygosity of *Apodemus*

ABSTRACT (continued)

populations were between 0,367 - 0,833. Fis values that calculated for populations were changing between -0,233 - 0,600 for *Myodes* populations, and between -1 - 0,056 for *Apodemus* populations. It was observed that there is no deviation of Hardy-Weinberg equilibrium for the *Myodes* populations. For the *Apodemus* populations, there was only 2 locuses from Filyos populations have a of Hardy-Weinberg equilibrium deviation.

With this study, for the first time, RABV scanning of rodents by reverse transcriptase PCR method and sequence analysis and genetical characterization of *Myodes* and *Apodemus* populations by microsatellite markers had been conducted for Turkey. Obtained results were provide a basis for determinating the corelation between rodent populations and rabies virus.

Keywords: Rodents, Rabies, HNPCR, Sequence analysis, Population structure, Microsatellite, *Apodemus*, *Myodes*, Zonguldak

Science Code: 401.04.04

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisansa başladığım günden itibaren fikirleriyle beni yönlendiren, çalışmanın sonuna kadar bana güvenip destek veren, proje zarfında kendisinden çok şey öğrendiğim danışman hocam Doç. Dr. Ferhat MATUR'a, laboratuvarının kapılarını sonuna kadar açan ve moleküler teknikleri öğrenmemde çok büyük emeği olan, deneyimlerini ve bilgi birikimini benden esirgemeyen eş danışman hocam Prof. Dr. İ. Mehmet Ali ÖKTEM'e, eğitim sürecim boyunca bilgi birikimi ve tecrübeleriyle gelişmemde büyük katkısı olan hocam Prof. Dr. Mustafa SÖZEN'e,

Örneklerin toplanması, laboratuvarda işlenmesi/hazırlanması ve tez yazımı süresince hep yanımda olan, yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Ortaç ÇETİNTAŞ, Sercan IRMAK, Muhsin ÇOĞAL, Arş. Gör. Faruk ÇOLAK, Dr. Murat SEVİNDİK, Yasemin SANCAR ve Arş. Gör. Deniz ŞENOL'a, laboratuvar çalışmaları ve tez yazımındaki yardımlarından dolayı Arş. Gör. Ayşe Dilek ÖZÇELİK'e,

Dokuz Eylül Üniversitesi'nde yaptığım laboratuvar çalışmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Ceylan POLAT ve Özge ÖZTUNA'ya,

Bu günlere gelmemde emeklerini hiçbir zaman yadsıyamayacağım, hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, beni her zaman maddi ve manevi yönden destekleyen, her koşulda sabır ve hoşgörüsünü esirgemeyen babam Muzaffer CEYLAN'a ve annem Jale CEYLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 2012- 10- 06- 02) ve Tübitak TBAG (Proje No: 112T070) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
EK AÇIKLAMALAR DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
 BÖLÜM 1 GİRİŞ	 1
 1.1 VİRÜS BİYOLOJİSİ.....	 1
1.1.1 Rhabdoviridae	2
1.1.1.1 Özellikler ve taksonomi	2
1.1.2 Kuduz Virüsü (RABV)	3
1.1.2.1 Tarihçe	3
1.1.2.2 Sınıflandırma, Genom yapısı, Viral Proteinler ve Özellikleri	3
1.1.2.3 RABV Yaşam Döngüsü	8
1.1.2.4 Viral patogeneze	10
1.1.2.5 Epidemiyoloji.....	11
1.2 KEMİRİCİLER (RODENTIA)	13
1.2.1 Kemiricilerin Populasyon Yapısı.....	14
1.2.1.2 RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi)	15
1.2.1.3 AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)	15
1.2.1.4 Mikrosatellitler	16

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
BÖLÜM 2 MATERYAL VE METOT	19
2.1 ARAZİ ÇALIŞMALARI.....	19
2.2 VİRÜS ÇALIŞMALARI.....	21
2.2.1 Diseksiyon ve Örneklerin Hazırlanması	21
2.2.2 RABV-RNA'nın Saptanması.....	21
2.2.2.1 RNA Ekstraksiyonu	21
2.2.3 Öncüllerin Belirlenmesi.....	22
2.2.4 cDNA Sentezi	27
2.2.5 RABV İçin Tasarlanan Öncüllerle Yapılan PZT Optimizasyonu	27
2.2.6 Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT).....	28
2.2.6.1 Tasarlanan Öncüllerle Yapılan Polimeraz Zincir Tepkimesi.....	28
2.2.6.2 Referans Öncüller ile Yapılan Polimeraz Zincir Tepkimesi.....	29
2.2.7 Agaroze Jel Elektroforezi	31
2.3 POPULASYON ÇALIŞMALARI	32
2.3.1 Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT).....	32
2.3.2 Agaroze Jel Elektroforezi	34
2.3.3 İstatistiksel Analizler	34
BÖLÜM 3 SONUÇLAR.....	35
3.1 VİRÜS ÇALIŞMALARI.....	35
3.1.1 PZT Optimizasyon Bulguları.....	35
3.1.2 Örneklerin PZT Taraması Bulguları	40
3.2 POPULASYON ÇALIŞMALARI	42
3.2.1 Genotiplerin Belirlenmesi.....	42
3.2.2 <i>Myodes</i> populasyonlarına ait bulgular	43
3.2.2.1 Populasyon içi genetik varyasyon ve heterozigotluk düzeyi	43
3.2.2.2 F parametreleri	49
3.2.2.3 Hardy-Weinberg Dengesi	50
3.2.3 <i>Apodemus</i> populasyonlarına ait bulgular	51

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
3.2.3.1 Populasyon içi genetik varyasyon ve heterozigotluk düzeyi	51
3.2.3.2 F parametreleri	57
3.2.3.3 Hardy- Weinberg Dengesi	58
 BÖLÜM 4 TARTIŞMA	 61
4.1 VİRÜS ÇALIŞMALARI	61
4.2 POPULASYON ÇALIŞMALARI	64
4.2.1 <i>Myodes</i> populasyonları	65
4.2.2 <i>Apodemus</i> populasyonları	66
 KAYNAKLAR.....	 69
 EK AÇIKLAMALAR A ANALİZLERDE KULLANILAN VERİLER	 83
EK AÇIKLAMALAR B ÇALIŞMA FOTOĞRAFLARI	87
 ÖZGEÇMİŞ	 93

ŞEKİLLER DİZİNİ

No	Sayfa
1.1 Mononegavirales ordosunun üyelerini temsil eden köksüz ağaç.....	2
1.2 Kuduz virusü (RABV)'nün şematik yapısı.	4
1.3 RABV genom yapısı ve proteinleri.	6
1.4 Tüm Lyssavirus N geni nükleotid dizilerine dayalı köksüz filogenetik ağacı.....	7
1.5 RABV'nün yaşam döngüsü.	9
1.6 RABV'nün sinir hücrelerine girişi ve hücre içindeki taşınımı.	10
1.7 Kuduz hastalığının bulaş şeması.	10
1.8 Dünya'daki kuduz risk bölgeleri.	11
1.9 Türkiye'de 1990- 2013 yılları arasındaki kuduz olguları.	12
2.1 Örnek toplanan lokaliteler.	20
3.1 PZT optimizasyonu- Tasarlanan PZT ile R+ kontrol ve öncüllerin çalışmasının kontrolü.	35
3.2 PZT optimizasyonu-öncül konsantrasyonu ve R+ kontrol dilüsyon denemesinden elde edilen jel görüntüsü.	36
3.3 PZT optimizasyonu- dilüsyon denemesi sonucu elde edilen jel görüntüsü.	36
3.4 Optimizasyonu- iki farklı PZT yöntemi denemesinden elde edilen jel görüntüsü.	37
3.5 PZT Optimizasyonu- iki farklı PZT yöntemi denemesinden elde edilen jel görüntüsü. ...	37
3.6 PZT Optimizasyonu- dilüsyon denemesinden elde edilen jel görüntüsü.	38
3.7 PZT Optimizasyonu- dilüsyon denemesi jel görüntüsü.....	38
3.8 PZT Optimizasyonu- Mg ⁺⁺ konsantrasyon denemesi jel görüntüsü.	39
3.9 PZT Optimizasyonu- DMSO konsantrasyon denemesi.	39
3.10 PZT Optimizasyonu- DMSO konsantrasyon denemesi.	40
3.11 Tasarladığımız öncüllerle yapılan PZT sonucunda pozitif örneklerin jel görüntüleri. ...	40
3.12 Referans öncüllerle hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilen PZT sonucunun jel görüntüsü.	41
3.13 Jelde Pozitif çıkan örneklerin yayılış yerleri.	41

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
3.14 MS Af-16 (6-FAM, Mavi) mikrosatellit lokusu bakımından heterozigot (112/116) genotipine sahip örneğin genotipinin fragment analizi ile belirlenmesi.	43
3.15 MSCg-20 (VIC, Yeşil) mikrosatellit lokusu bakımından homozigot (158/158) genotipine sahip örneğin genotipinin fragment analizi ile belirlenmesi.	43
3.17 MSCg-4 mikrosatellit lokusu açısından populasyonlar arasında allel görülme sıklıkları.	45
3.18 MSCg-9 mikrosatellit lokusu açısından populasyonlar arasında allel görülme sıklıkları.	45
3.19 MSCg-15 mikrosatellit lokusu açısından populasyonlar arasında allel görülme sıklıkları.	45
3.20 MSCg-19 mikrosatellit lokusu açısından populasyonlar arasında allel görülme sıklıkları.	46
3.21 MSCg-20 mikrosatellit lokusu açısından populasyonlar arasında allel görülme sıklıkları.	46
3.22 Populasyonlarda gözlenen genetik parametrelerin değişim grafiği.	49
3.23 MS Af-16 mikrosatellit lokusu açısından populasyonlar arasında allel görülme sıklıkları.	52
3.24 MS Af-22 mikrosatellit lokusu açısından populasyonlar arasında allel görülme sıklıkları.	53
3.25 MS Af-7 mikrosatellit lokusu açısından populasyonlar arasında allel görülme sıklıkları.	53
3.26 MS Af-8 mikrosatellit lokusu açısından populasyonlar arasında allel görülme sıklıkları.	53
3.27 Populasyonlarda gözlenen genetik parametrelerin değişim grafiği.	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
2.1	Lokalitelere göre türlerin dağılımı. 20
2.2	Öncül tasarımında kullanılan dizilerin GenBank bilgileri. 23
2.3	PZT için RABV’ün N genine göre tasarlanan öncüller. 25
2.4	Kuduz (RABV) ve kuduz benzeri virüslerin (RRV) hnRT-PCR amplifikasyonu için kullanılan Oligonükleotid öncülleri 26
2.5	1. PZT’de kullanılan karışımın içeriği. 28
2.6	1. PZT uygulaması amplifikasyon koşulları. 28
2.7	2. PZT’de kullanılan karışımın içeriği. 29
2.8	2. PZT uygulaması amplifikasyon koşulları. 29
2.9	1. PZT’de kullanılan karışımın içeriği. 30
2.10	1. PZT uygulaması amplifikasyon koşulları. 30
2.11	2. PZT’de kullanılan karışımın içeriği. 31
2.12	2. PZT uygulaması amplifikasyon koşulları. 31
2.13	Mikrosatelit PZT çalışmalarında kullanılan karışımın içeriği. 32
2.14	Mikrosatelit PZT uygulaması amplifikasyon koşulları. 32
2.15	İkili PZT çalışmalarında “MSAf16+ MSAf22” gen bölgeleri için kullanılan karışımın içeriği. 33
2.16	“MSAf16+ MSAf22” gen bölgeleri için yapılan ikili PZT amplifikasyon koşulları. 33
2.17	İkili PZT çalışmalarında “MSCg9 + MSCg15” gen bölgeleri için kullanılan karışımın içeriği. 33
2.18	“MSCg9 + MSCg15” gen bölgeleri için yapılan ikili PZT amplifikasyon koşulları..... 34
3.1	Pozitif çıkan örnekler ve bilgileri. 41
3.2	<i>Myodes</i> populasyonlarında allel genişlikleri, gözlenen allel sayılarının populasyon ve lokuslar açısından dağılımı, populasyon başına ve lokus başına gözlenen allel sayıları ve ortalamaları. 44
3.3	Tüm populasyonlardaki tespit edilen allellerin lokus ve populasyonlara göre allel frekansları. 46
3.4	Populasyonlarda her bir lokus için gözlenen ve beklenen heterozigotluk değerleri..... 48

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
3.5 Genetik parametre ortalamaları ve ortalamaya ait standart hatalar.	48
3.6 Populasyonların lokuslara göre hesaplanan FIS (fiksasyon indeks) değerleri.	49
3.7 Tüm lokuslardaki Nei (1987)'in F istatistikleri ve gen akışı (Nm).	50
3.8 Hardy-Weinberg değerleri.	50
3.9 <i>Apodemus</i> populasyonlarında allel genişlikleri, gözlenen allel sayılarının populasyon ve lokuslar açısından dağılımı, populasyon başına ve lokus başına gözlenen allel sayıları ve ortalamaları.	52
3.10 Tüm populasyonlardaki tespit edilen allellerin lokus ve populasyonlara göre allel frekansları.	54
3.11 Populasyonlarda her bir lokus için gözlenen ve beklenen heterozigotluk değerleri.....	56
3.12 Genetik parametre ortalamaları ve ortalamaya ait standart hatalar.	56
3.13 Populasyonların lokuslara göre hesaplanan FIS (fiksasyon indeks) değerleri.	57
3.15 Hardy-Weinberg değerleri.	58

EK AÇIKLAMALAR DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Ek A.1	<i>Myodes</i> populasyonlarına ait örneklerin MSCg-4, MSCg-9, MSCg-15, MSCg-19 ve MSCg-20 lokusları bakımından allel büyüklükleri..... 85
Ek A.2	<i>Apodemus</i> populasyonlarına ait örneklerin MSAf-16, MSAf-22, MSAf-7 ve MSAf-8 lokusları bakımından allel büyüklükleri..... 86
Ek B.1	Çalışma alanına ait habitat görüntüsü..... 89
Ek B.2	Kapanlama çalışmaları (Fotoğraflakiler: Tuğçe CEYLAN, Muhsin ÇOĞAL, Yasemin SANCAR)..... 90
Ek B.3	Arazi ekibi (Fotoğraflakiler: Tuğçe CEYLAN, Muhsin ÇOĞAL, Ortaç ÇETİNTAŞ, Yasemin SANCAR, Deniz ŞENOL)..... 91
Ek B.4	Laboratuvar ekibi (Fotoğraflakiler: Prof. Dr. İ. Mehmet Ali ÖKTEM, Özge ÖZTUNA, Tuğçe CEYLAN, Ceylan POLAT, Sercan IRMAK, Yasemin SANCAR, Uğur KAYIŞ, Ortaç ÇETİNTAŞ)..... 92

SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
G	: Glikoprotein
g	: Savurma kuvveti birimi
L	: RNA bağımlı RNA Polimeraz
M	: Matriks proteini
N	: Nükleoprotein
P	: Fosfoprotein
U	: Ünite
V	: Volt

KISALTMALAR

µl	: Mikrolitre
(NH ₄) ₂ SO ₄	: Amonyum sülfat
ABLV.	: Australian bat lyssavirus
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
BUL	: Bulgaristan
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid
DUVV	: Duvenhage virus
EBLV-1	: European bat lyssavirus
EBLV-2	: European bat lyssavirus
ER	: Endoplazmik retikulum
GPS	: Küresel konumlama sistemi
GR	: Yunanistan

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

IRQ	: Irak
kDa	: Kilodalton
LBV	: Lagos Bat virus
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorid
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MOKV	: Mokola virus
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
nAchRs	: Nikotinik asetilkolin reseptörleri
pH	: Potansiyel Hidrojen
pmol	: Pikomol
PZT	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
R+	: Kuduz pozitif
RABV	: Rabies virus
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	: Ribonükleik asit
RNP	: Ribonükleoprotein
RT	: Ters transkripsiyon
RUS	: Rusya
sn	: Saniye
TAE	: Tris-acetate-EDTA
TR	: Türkiye
UKR	: Ukrayna
UV	: Ultraviyole

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 VİRÜS BİYOLOJİSİ

Virüsler yalnızca konakçı hücreler içerisinde çoğalabilen bulaşıcı (enfektif) birimlerdir (Madigan 2012). Virüsler bilinen tüm tipleriyle canlıların üç domeyninde de (Archaea, Bacteria, Eukarya) bulunurlar (Kallies 2010). Virüs partikülü proteinlerle çevrili bir nükleik asit içerir. Bazı virüs ailelerinde (özellikle hayvan virüslerinde) nükleik asit ve onun etrafını saran proteinin oluşturduğu nükleokapsidin etrafında çift katlı bir lipid zar bulunur. Virüsler konak hücrenin reseptörlerine tutunarak hücre içine girerler (Abacıoğlu 2008). Hücreye girişin gerçekleşmesiyle beraber hücrenin metabolik fonksiyonlarını yeniden düzenleyerek kendi replikasyonlarını ve yeni virionların oluşmasını sağlarlar. Organizmanın bu şekilde bir virüsle enfekte olması bazen hastalıkla sonuçlanır (Madigan 2012).

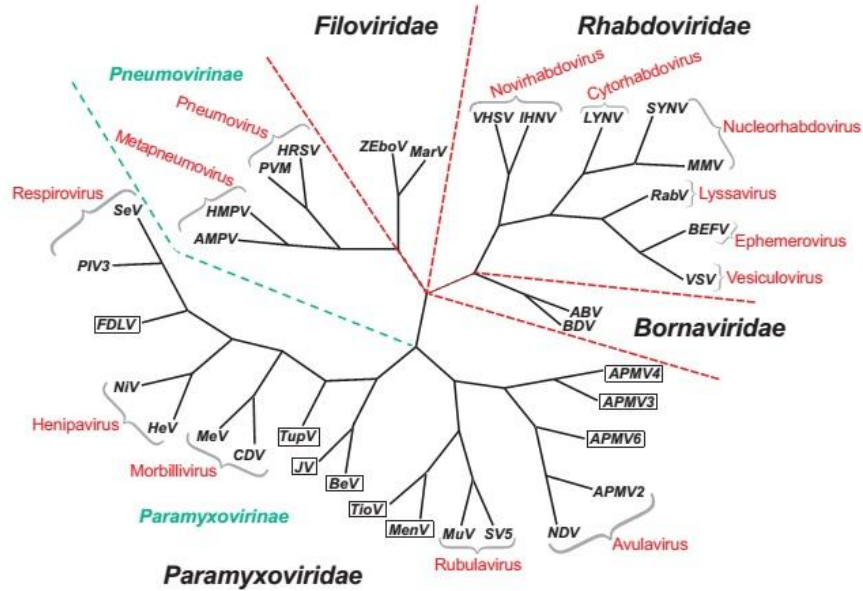
Zoonotik hastalıklar, insanlar ve diğer omurgalılar arasında doğal olarak taşınan enfeksiyonlar ve hastalıklardır. Rezervuar konak olan hayvan patojen taşıdığı için enfeksiyon kaynağı vazifesi görmektedir. Her geçen gün yeni bir patojen ve hastalık ortaya çıkmaktadır. Bu hastalık ve patojenlerin ise %80'i zoonotiktir (URL-1 2013). Dünyada insan ve hayvanlarla ilişkili 200'den fazla zoonotik hastalık mevcutken, ülkemizde bu rakam 40 civarındadır (URL-2 2013). Zoonozlar ve neden oldukları semptomlar oldukça çeşitlidir. Zoonozlara neden olan virüsler insanlarda asemptomatik ya da hafif enfeksiyonla seyreden veya ciddi ve fatal enfeksiyonlara neden olan geniş spektrumda hastalıklara neden olurlar. Önemli zoonotik hastalıklar arasında örneğin Kırım Kongo Kanamalı Ateşi hastalığı, hantavirüs enfeksiyonları, kuduz ve tularemi hastalıkları yer almaktadır (Us 2008). Zoonotik ajan olan birçok hayvan grubu mevcuttur. Bunlardan bir tanesi de kemiricilerdir. Kemiriciler hem insanlarla sıkça yaşanan temaslarından dolayı hem de memeliler içerisinde en fazla üyesi bulunan grup olmalarından dolayı zoonotik hastalıklar konusunda önemli bir yerdedirler. Bu nedenle yayılımı

alanlarının, taşıdıkları virüslerin, çevrelerindeki canlılarla ilişkilerinin ve yaydıkları hastalıkların bilinmesi, insan hastalıklarının anlaşılması konusunda oldukça önemlidir.

1.1.1 Rhabdoviridae

1.1.1.1 Özellikler ve taksonomi

Rhabdoviridae familyası Mononegavirales ordosu içinde sınıflandırılmıştır (Murphy 1996). Bugüne kadar 6 cins (Vesiculovirus, Lyssavirus, Ephemerovirus, Novirhabdovirus, Cytorhabdovirus ve Nucleorhabdovirus) ve 160'dan fazla türle temsil edilmektedir (Van Regenmortel et al. 2000, Fauquet et al. 2005).



Şekil 1.1 Mononegavirales ordosunun üyelerini temsil eden köksüz ağaç (King et al. 2012).

Rhabdovirüsler geniş yelpazede birçok konağı enfekte edebilen oldukça geniş virüs ailesidir (Van Regenmortel et al. 2000, Fu 2005). Sürekli yeni türlerin keşfedilmesi ile birlikte (Travassos Da Rosa et al. 2002, Kuzmin et al. 2003, Fu 2005) bugüne kadar bitkiler, omurgasızlar ve omurgalılarından (Wagner 1987, Fu 2005) 160 dan fazla Rhabdovirüs türü izole edilmiştir (Van Regenmortel et al. 2000, Fu 2005). Rhabdovirüslerin Vesiculovirus, Lyssavirus ve Ephemerovirus cinsleri insanlar ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara neden olurlar (Fu 2005, Gönen 2010). Diğerleri ise özellikle tarım bitkileri üzerinde hastalıklara neden olurlar (Wagner 1987, Fu 2005).

Rhabdoviridae üyeleri benzer morfoloji, yapı ve replikasyon mekanizması göstermelerine rağmen memeliler, kuşlar, balıklar, bitkiler, omurgasızlar gibi çok çeşitli konakları enfekte ederler. Memeli merkezi sinir sisteminde replike olmaya adapte olmaları ve direk temasla bulaşmaları, ancak böceklerde taşınmaları ve doğal replikasyon geçirmemeleri Rhabdovirüs içindeki tüm Lyssaviruslar için karakteristiktir (Nel and Markotter 2007). En iyi bilinen Lyssavirüs RABV'dir.

Rhabdovirüslerin çoğu böcek vektörler aracılığıyla taşınmaktadır (Wagner 1987, Fu 2005). Ancak Lyssavirüsler ve balık Rhabdovirüsleri böcek konaklardan izole edilmezler (Wagner 1987, Fu 2005).

1.1.2 Kuduz Virüsü (RABV)

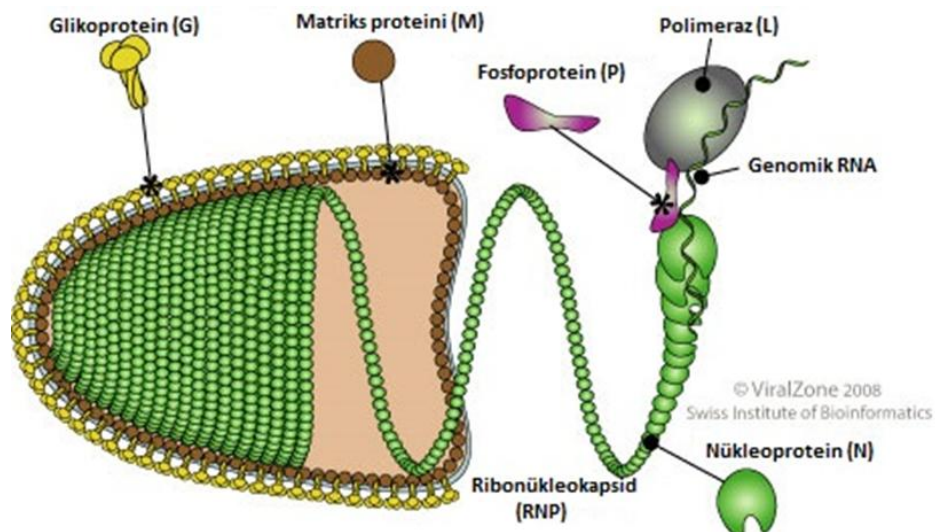
1.1.2.1 Tarihçe

Kuduz hastalık olarak ilk defa 4000 yıl önce tanımlanmıştır. Çinli bilim adamları milattan önce kuduz köpeklerin tehlikesi konusunda insanları uyarmışlardır (Kaplan and Koprowski 1980, Kienzle et al. 2007). Rönesans boyunca ise Avrupa'da birçok kuduz kurt, köpek ve tilkinin varlığı bildirilmiştir. Amerika'nın keşfinden kısa bir süre sonra psikopos Petrus Matyr-Anglerius'ün ilk defa kuduzun vampir yarasalar tarafından geçtiğine dair anlattığı olay kuduzun yarasalar ile bulaştığına dair ilk kayıt olmuştur. Kuzey Amerika'daki ilk kayıt ise 1753 yılında bir tilki olmuş, daha sonraki kayıtlar 1780'lerde kuzeyden Yeni İngiltere'ye, 19. yy boyunca da batıya doğru yayıldığını göstermiştir. 1802 yılında George Zinke kuduzun hasta bireyden sağlıklı bireye tükürük yoluyla geçtiğini ve hastalığın oluştuğunu göstermiştir. Kuduzun tedavisi konusundaki en önemli gelişme ise 1885 yılında Louis Pasteur'ün kuduz aşısını bulması olmuştur (Kienzle et al. 2007).

1.1.2.2 Sınıflandırma, Genom yapısı, Viral Proteinler ve Özellikleri

RABV, Rhabdoviridae ailesinin Lyssavirus genusu içinde sınıflandırılmıştır (King et al. 2012). Lyssavirusgenusu zarfsız virüsleri içeren Mononegavirales ordosu içerisindeki Rhabdoviridaefamilyasına ait 6 genustan biridir. Bu ordo bilinen tüm negatif yönelimli, tek zincirli ve segmentsiz RNA virüslerini içerir (Nel and Markotter 2007).

RABV, 12kb’lık RNA genomu 3ucundan 5’ ucuna doğru nükleoprotein (N), fösfoprotein (P), matriks proteini (M), glikoprotein (G) ve RNA polimeraza bağımlı RNA (L) olmak üzere 5 viral protein kodlar, ve tüm bu viral proteinler virion içerisinde mevcuttur (Tordo and Poch 1988, URL-3 2013). Virüs helikal simetrik nükleokapsid yapısındadır. Ribonükleoprotein (RNP) kompleksini oluşturan nükleokapsid proteinleri (N, P ve L) viral genomik RNA ile bağlantı içerisinde. RNP kompleksi G ve M proteinleri ile bağlantılı olan iki katmanlı bir lipid ile çevrilidir (Goto et al. 2000). Genomik RNA ile yakın ilişkili olan L proteini RNA’ya bağımlı RNA polimeraz etkinliği gösterir. Viral zarf üzerinde virüsün zarf glikoproteinleri bulunur ve virüsün hücreye tutunmasında görev alırlar (Thoulouze et al. 1998). Trimer formdaki bu G proteinleri (Gaudin et al. 1992) patojenlikte kritik bir rol oynar (Dietzschold et al. 1983). Viral zarfı oluşturan lipid tabakanın hemen altında ise viral matriks proteini yer alır. M proteini nükleokapsid ve zarf arasında bir tabaka oluşturur, ayrıca viral gelişim ve karakteristik mermi şekilli virionlardan sorumludur (Mebatsion et al. 1999). Genom G ve L proteinleri arasında “pseudogen” ya da “Ψ” bölgesi olarak adlandırılan intergenik bölgede çeşitli kodlanmayan bölgeler içermektedir. Ayrıca bu bölgeler virüsün evrimi boyunca baskılanmış ve bozulmuştur (Tordo et al. 1986, Schnell et al. 2009).



Şekil 1.2 Kuduz virusü (RABV)'nün şematik yapısı (URL-3 2013).

Nükleoprotein (N proteini): N proteini nükleokapsidin başlıca proteinidir. Molekül ağırlığı 56 kilodalton (kDa)'dur ve 450 aminoasit içermektedir. RNA transkripsiyonu ve replikasyonundan sorumludur (Wunner 1991, Yang et al. 1998, Özkütük 2002). N proteini kapsidi ile pozitif yönelimli kılavuz RNA'nın viral nükleik asidini kuşatır ve diğer bir genomik RNA'nın transkripsiyonunu engeller (Wunner 1991, Yang et al. 1998). Protein çeşitli antijenik ve immunodominant kısımlar içerir. I. antijenik kısım 374-383. pozisyonundaki aminoasitleri, III. antijenik kısım ise 313-337 pozisyonundaki aminoasitleri içermektedir. Bilinen immunodominant kısımlardan biri de 404-418 pozisyonunda yer almaktadır (Ertl et al. 1989, Dietzschold et al. 1990, Meslin et al. 1996). Nükleoprotein, yardımcı T hücrelerini uyarıp kuduz ve kuduz benzeri virüsler arasında çapraz reaksiyona neden olan en önemli antijendir (Jackson and Wunner 2002, Özkütük 2002).

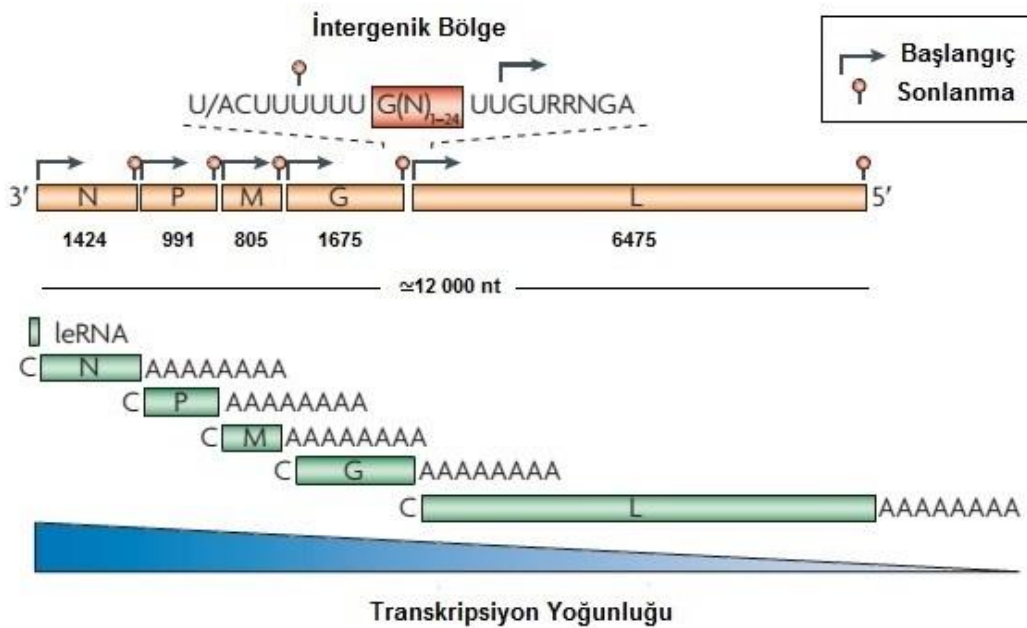
Fosfoprotein (P proteini): P proteini 297 amino asit içermektedir ve molekül ağırlığı 38 kDa'dur (Özkütük 2002, Metlin 2008). N ve L proteinleri ile bağlantılı olarak işlev görmektedir. N proteini ile birlikte viral RNA nükleik asidini uygun şekilde çevreleyerek destekler. L proteini ile birlikte ise RNA'nın polimerizasyonunda kofaktör olarak işlev görmektedir (Chenik et al. 1994, Chenik et al. 1998, Jacob et al. 2001). Ayrıca P geni birden fazla protein kodlayan tek gendir (Chenik et al. 1995, Metlin 2008). 75-90 pozisyonunda lokalize olan iki tane antijenik bölgesi bulunmaktadır. 191-206 pozisyonunda lokalize olan immünodominant bölge yer almaktadır (Larson et al. 1991).

Matriks Proteini (M proteini): Lipoprotein yapıdadır. Matriks proteini 202 amino asit içeren bir proteindir ve molekül ağırlığı 26 kDa'dur. Lipitlerle birleşerek viral zarfı oluşturur (Özkütük 2002). Virüs için biraraya gelme ve bağlanma olaylarında rol almaktadır. RNP'nin etrafını çevirerek sıkı formda bulunmalarına yardımcı olur. Glikoprotein ile birlikte de kurşun şeklinde tomurcuklanarak şeklin korunmasında görev almaktadır (Rupprecht et al. 1995, Gönen 2010).

Glikoprotein (G proteini): Glikoprotein kuduz virüsünün en çok çalışılan proteindir. Molekül ağırlığı 67 kDa olan G proteini 524 amino asit içermektedir. G proteini sadece nasent proteinde bulunan ve ilk 19 aminoasitlik kısmıyla sinyal alanı oluşturan trimerik yapıya sahiptir (Gaudin et al. 1992). Tanı ve tedavide önemli rol oynar (Özkütük 2002). G proteini çeşitli antijenik bölgeler ve epitoplar içermektedir. Antijenik epitop I olgun (mature) proteinin 231. pozisyonundaki tek bir aminoasit ile temsil edilmektedir. II. antijenik bölge 34-42 ve

198-200 pozisyonlarında aralıklı, iki ayrı uzantı içermektedir. III. Antijenik bölge 330-338 pozisyonunda lokalize olmuştur (Lafon et al. 1983a, Lafon et al. 1983b, Seif et al. 1985, Prehaud et al. 1988, Bunschoten et al. 1989, Benmansour et al. 1991). G proteini nötralizan antikorların uyarılması ve konak hücre reseptörlerine yapışmadan sorumludur. Ayrıca tipe özgü viral antijendir. Glikoprotein içeren aşılar kuduz hastalığına karşı koruyuculuk sağlayabilirler. Aşıların etkinliğinin ölçümünde bu proteine karşı oluşan antikorların araştırılması yeterli olmaktadır (Özkütük 2002, Gönen 2010).

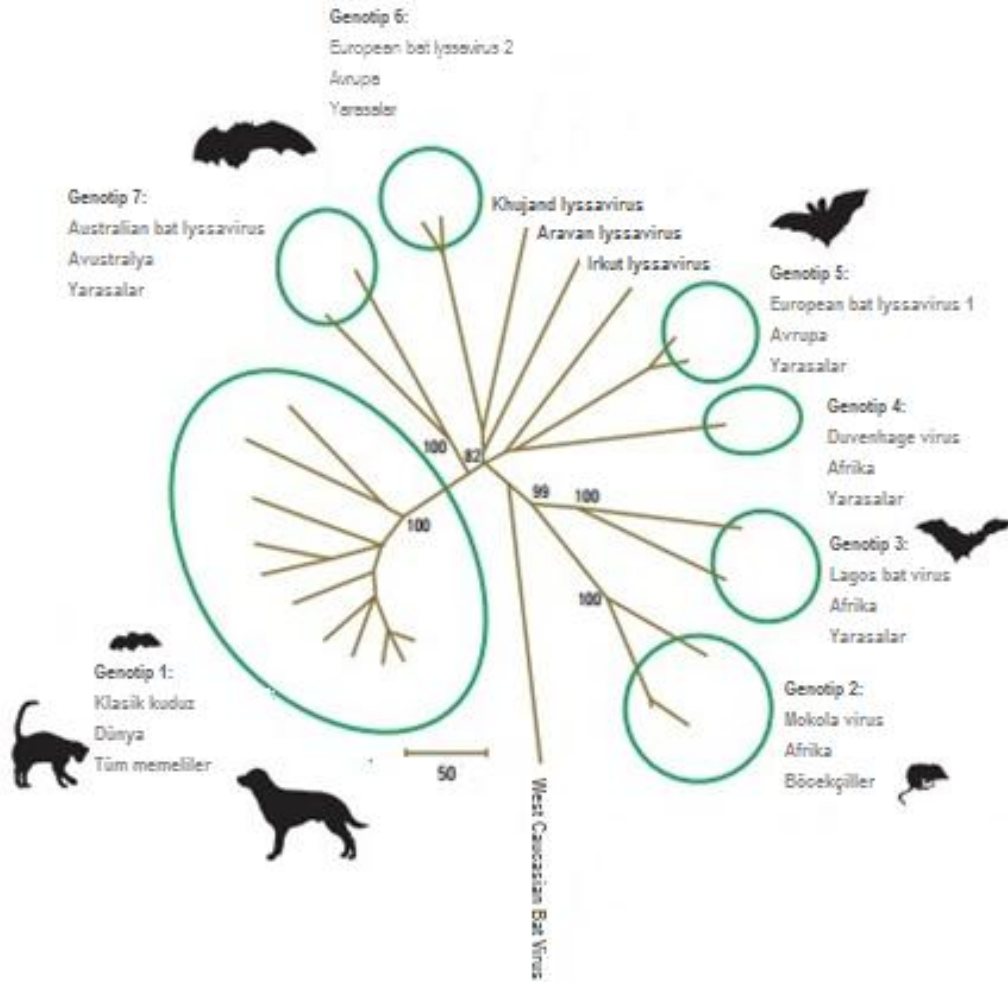
RNA bağımlı RNA Polimeraz (L proteini): L proteini bir transkriptaz proteinidir. Kuduz virüsünün en büyük proteini olan L proteinin molekül ağırlığı 190 kDa'dur (Özkütük 2002, Metlin 2008). Negatif sarmallı viral RNA transkripsiyonu için gerekli olan L proteini P proteini ile kompleks oluşturmaktadır (Rupprecht et al. 1995, Jackson and Wunner 2002, Gönen 2010).



Şekil 1.3 RABV genom yapısı ve proteinleri (Schnell et al. 2009).

1956'da kuduz-benzeri virüslerin ilk defa Amerika'da izole edilmesine kadar kuduz virüsünün (RABV) antijenik olarak benzersiz olduğu düşünülüyordu. Ancak yapılan sonraki araştırma ve gözlemlerde ansefalitten sorumlu kuduz-benzeri virüsler Lyssavirus genusu içerisinde sınıflandırmıştır. Genus ilk olarak serum ve monoklonal antikorlarla antijenik çapraz reaktivite gösterme kriterleriyle RABV (serotip 1), Lagos Bat virus (LBV) (serotip 2),

Mokola virus (MOKV), Duvenhage virus (DUVV) olmak üzere 4 serotipte sınıflandırılmıştır. Genetik yöntemlerin ortaya çıkışı ve Avustralya'dan sonra Avrupa'da da yarasadan lyssavirüs izole edilmesinden sonra sınıflandırmada önemli değişiklikler olmuştur. Özellikle N, G ve P gibi çeşitli genomik bölgelerin genetik karakterizasyonunun gerçekleştirilmesiyle önceki bilgilere ek olarak genus 7 genotipte sınıflandırılmıştır. Bu genotipler: RABV (genotip 1), Lagos Bat virus (LBV) (genotip 2), Mokola virus (MOKV) (genotip 3), Duvenhage virus (DUVV) (genotip 4), European bat lyssavirus 1 (EBLV-1) (genotip 5), European bat lyssavirus 2 (EBLV-2)(genotip 6), Australian bat lyssavirus (ABLV) (genotip 7) tur. Lyssavirüs genotipleri kendi içlerinde 1-4-5-6-7 ve 2-3 olmak üzere 2 ana filogruba ayrılmaktadır (Kissi et al. 1995, Kuzmin et al. 2005, King et al. 2012).

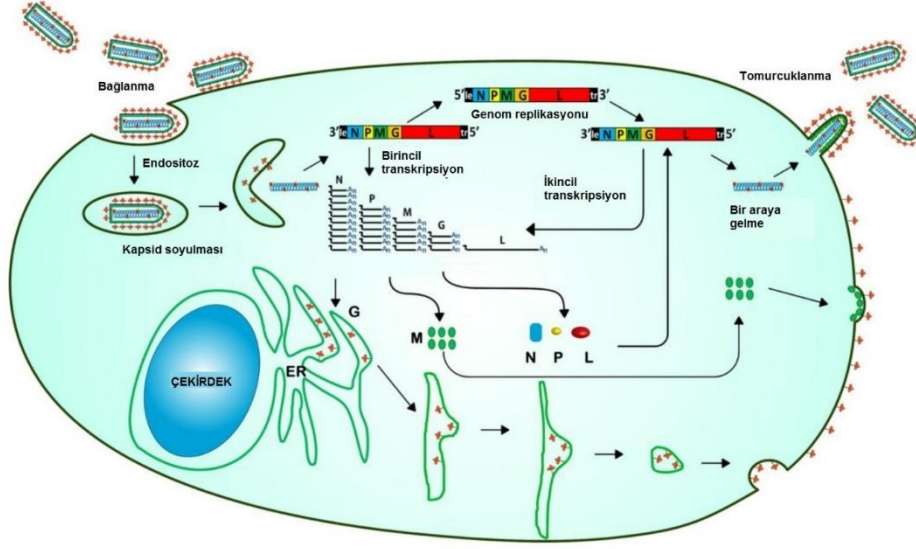


Şekil 1.4 Tüm Lyssavirus N geni nükleotid dizilerine dayalı köksüz filogenetik ağacı (Kissi et al. 1995, Kuzmin et al. 2005).

1.1.2.3 RABV Yaşam Döngüsü

Enfeksiyon viral G proteinin konakçı hücrenin yüzeyindeki reseptöre tutunması ile başlamaktadır. Günümüze kadar kuduz virüsü için üç adet hücresel reseptör tanımlanmıştır. Bunlar nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChRs) (Gastka et al. 1996), nöral adhezyon molekülü (Thoulouze et al. 1998) ve düşük afiniteli sinir büyüme faktörü reseptörü (Tuffereau et al. 1998) dür (Kienzle et al. 2007). Proteinin reseptörlere tutunmasının ardından virion reseptör-bağımlı endositoz ile hücre içerisine alınır. Virüs zarfının ve vezikül zarının birleşmesi sırasında vezikül içerisindeki pH düşmeye başlar (pH'a bağımlı). G proteini tarafından füzyon katalizlenir ve rinonükleoprotein kompleksinin konakçı hücre sitoplazması içerisinde serbest bırakılmasına öncülük eder (Rigaut et al. 1991). M proteini RNP kompleksinden ayrılır ve kuduz virüsünün replikasyon döngüsünün kapsid soyulması basamağı tamamlanmış olur (Kienzle et al. 2007).

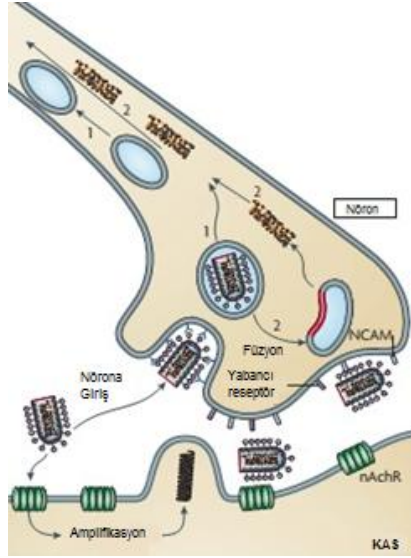
Kapsid soyulmasından hemen sonra kuduza özgül mRNA'ların ya da L-P kompleksinin transkripsiyonu başlar. L Proteini polimeraz aktivitesine sahipken, P proteini ise fosforilasyon işlemini modifiye ederek L proteinini kontrol eder. Transkripsiyonun polimerazın 50 nükleotidlik bir öncül sentezlediği 3' ucundan başlamasıyla 5 viral proteini kodlayan her bir mRNA sırasıyla genomun 3' ucundan kopyalanır. mRNA'ların sentezini tamamlanmasıyla sitoplazmada bulunan hücresel ribozomlarda translasyon başlar. G proteinin translasyonu serbest ribozomlarda başlar, konakçı hücre zarıyla birleşmesini sağlayan karbonhidrat modifikasyonlarının olduğu endoplazmik retikulum (ER)'da sona erer. M proteini hücre zarının içindeki ceplerde birikir. Bu bölgeler tomurcuklanmanın görüldüğü alanlardadır (Kienzle et al. 2007).



Şekil 1.5 RABV'nün yaşam döngüsü (Dricu 2012).

M proteininin birikimi yeni genomik RNA moleküllerinin replikasyonunu tetikler. Yeni gelişen genomik RNA oluşurken, PLN kompleksi enkapside olur veya RNP yeni RNP komplekslerine bağlanır. Bu durum yeni virionlar oluşturan bağlanma işleminin ilk basamağıdır. Enkapside olmuş RNP kompleksi konakçı hücre membranında özellikle M ve G proteinlerince zengin olan bölgelere göç eder. RNP hücre zarı ile birleşirken, M proteini RNP nin karakteristik bobin şeklini almasını sağlayan yoğunlaşma ve paketlenme işlemini başlatır (Pattnaik et al. 1997, Kienzle et al. 2007).

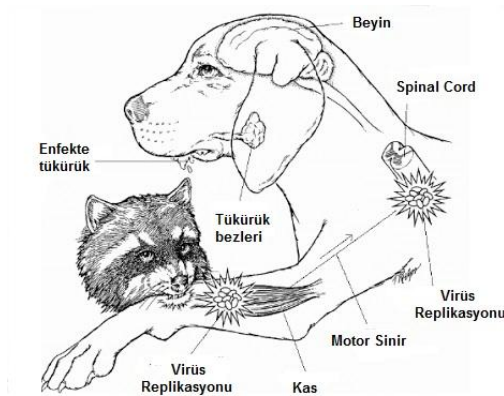
Yoğunlaşma başladığında konakçı hücre zarında tomurcuklanma oluşur. Bu durum kuduz virüsünün replikasyonunun son basamağıdır ve yeni oluşmuş virionların salınmasını sağlar. Virionlar tomurcuklandıklarında konakçı hücre zarının bir bölümü ile kaplıdırlar. Herhangi bir hücre ile ilişkisi olmayan yeni oluşmuş virüsler artık başka konak hücreleri enfekte yeteneğine ve replikasyon döngüsünü baştan başlama yeteneğine sahiptir (Mebatsion et al. 1999, Kienzle et al. 2007, Schnell et al. 2009, Dricu 2012).



Şekil 1.6 RABV'nün sinir hücresine girişi ve hücre içindeki taşınımı (Schnell et al. 2009).

1.1.2.4 Viral patogenezi

RABV enfekte hayvanın tükürüğünde bulunur ve ısırma sonucu diğer memelilere bulaşır. Virüs ısırık çevresindeki kas dokusunda replike olur ve miyelinsiz motor ve duyu sinirlerindeki ters aksoplazmik akımla merkezi sinir sistemine ulaşmaktadır. Daha sonra beyin dokusundaki replikasyonunun ardından sinirler aracılığıyla diğer dokulara yayılmakta ve tükürük bezlerine yerleşmektedir. Kuduz virüsünün enfektivitesi ısırılan bölgenin yeri ve ısırığın şiddetine göre değişiklik göstermektedir. Hastalık riski; yüz bölgesindeki ısırıklarda %60, el ve kol bölgesindeki ısırıklarda %15-40, bacak bölgesindeki ısırıklarda %3-10 arasında değişmektedir. Virüs ısırılmanın yanısıra yarasalar gibi koloni halinde yaşayan hayvanlarda aerosolle de bulaşabilmektedir (Us 2008, URL-4 2013).

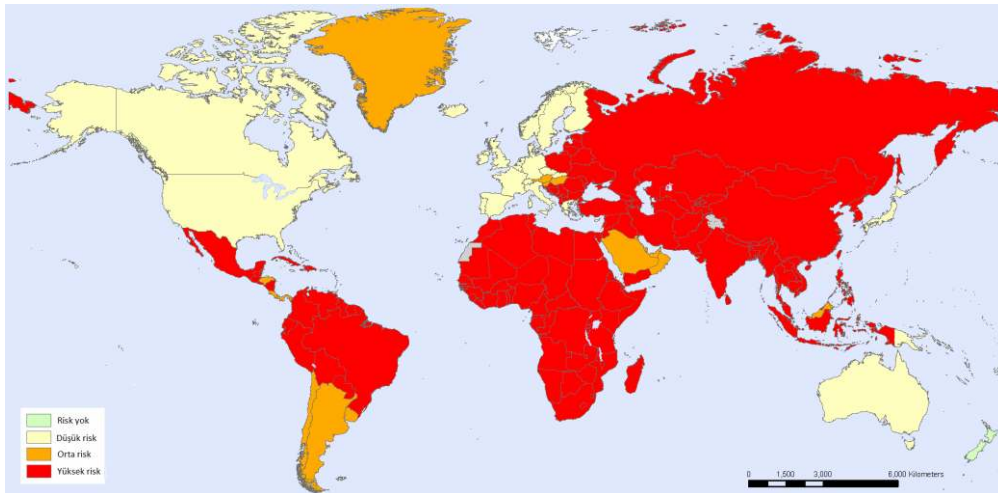


Şekil 1.7 Kuduz hastalığının bulaş şeması (URL-4 2013).

1.1.2.5 Epidemiyoloji

Kuduz, 5000 yıllık tarihsel geçmişi olan bir hastalıktır (Fu 1997, Lackay et al. 2008). Avustralya ve bazı ada ülkeleri hariç tüm dünyada yaygın bir dağılım gösteren kuduz (Us 2008, Buzgan et al. 2009). Önemli bilimsel gelişmelere rağmen hala küresel bir hastalık olarak varlığını sürdürmektedir (Meslin et al. 1993). Hastalığın genellikle evcil hayvanlarda görülen kentsel formu ve yaban hayatında görülen silvatik formu olmak üzere iki epidemiyolojik formu mevcuttur (Özkütük 2002).

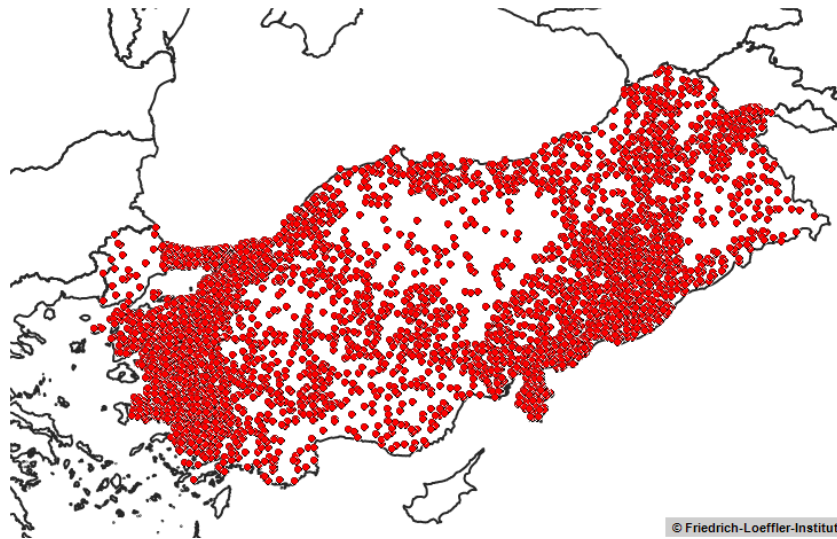
Kuduzun dünyada her yıl yaklaşık olarak 40000-70000 ölüme neden olduğu tahmin edilmektedir ve bu ölümlerin neredeyse hepsi gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir (Fu 1997, Lackay et al. 2008). Gelişmiş ülkelerde, kuduz çoğunlukla yabani hayvanlarda görülen ve bu konaklardan evcil hayvanlara ve insanlara bulaşan bir hastalıktır (Meslin et al. 1993, Kilic et al. 2006). Hayvan kuduzunun epizootiyolojisi insan kuduzunun epidemiyolojisini yansıtmaktadır (Özkütük 2002, Buzgan et al. 2009). Tüm dünyada hayvan kuduzunun %54'ünün köpeklerden, %42'sinin karasal yaban hayvanlarından, %4'ünün ise yarasalardan kaynaklandığı bildirilmiştir (Mandell et al. 2004). Sincap ve fare gibi küçük kemirgenlerin ise nadiren doğal rezervuar ya da insan kuduzuna neden olan vektörler oldukları bilinmektedir (WHO 1994, Özkütük 2002). Kuduzun Asya ve Afrika'da yaygın olarak görülmesi bu kıtalarda hayvan kontrolünün, aşılama programlarının ve etkin insan teması sonrası profilaksisinin efektif bir şekilde uygulanmamasından kaynaklanmaktadır (Knobel et al. 2005, Zhang et al. 2006). Başiboş hayvan kontrol programları ve köpek aşılamanın düzenli yapıldığı ABD'nde kuduz olgusu 20 yıllık süreçte yılda 40 vakadan 2'ye düşmüştür (Anderson et al. 1984, Özkütük 2002, URL-5 2014).



Şekil 1.8 Dünya'daki kuduz risk bölgeleri (URL-5 2014).

Kuduzun tek bir konağı olmamakla birlikte, virüs türler arası etkileşimle enfekte hayvandan diğerine hızlı bir şekilde yayılmaktadır. Memeli türlerinin çoğu kuduz virüsü ile enfekte olabilmektedir. Ancak türlerin virüse duyarlılıkları oldukça çeşitlilik göstermektedir. Tilki, çakal, kurt virüse karşı oldukça duyarlıyken kokarca, rakun, maymun ve gelincik türleri orta derecede duyarlılık göstermektedir. Opossum ise kuduz virüsüne karşı oldukça dirençlidir (URL-6 2014).

Türkiye köpek kuduzunun hala yaygın olduğu tek Avrupa ülkesidir. Türkiye’de insan kuduzu ve kuduz şüpheli hayvan ısırıkları hala önemli bir sağlık sorunudur (Kilic et al. 2006, URL-7 2014). Ülkemizde kuduza yakalanma ihtimali olan hayvan türleri kurt, tilki, çakal, yaban kedisi, kokarca, gelincik, köpek, kedi, sığır, koyun, keçi ve attır. Sağlık Bakanlığı’nın 2005 yılında yayınlanan kuduz korunma ve kontrol yönergesi gereği kuduza yakalanma ihtimali olan türlerden herhangi birinin teması sonucu aşılama uygulanmaktadır. Ancak yönergede bildirildiği üzere “fare gibi diğer küçük kemiriciler tarafından ısırılan ve teması olanlara” herhangi bir aşılama yapılmamaktadır (Torun 2010, URL-8 2013). Çin’in Zhejiang bölgesinden toplanan 57 *Apodemus agrarius* örneğinden 1 tanesinde kuduz pozitifliğine rastlanmıştır (Lei et al. 2009). Ayrıca Özsoy ve ark. 2000 yılı içerisinde şüpheli hayvan ısırtığıyla Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Kuduz Aşı istasyonuna gelen hastalardan 92 (%6)’si fare ısırtığı nedeniyle bu birime başvurduğunu bildirmiştir (Özsoy et al. 2002).



Şekil 1.9 Türkiye’de 1990- 2013 yılları arasındaki kuduz olguları (URL-7 2014).

Zonguldak ilinde de Çaycuma ilçesinde sıklıkla kuduz vakaları görülmektedir. Zonguldak Sağlık İl Müdürlüğü verilerine göre Zonguldak ili Çaycuma ilçesinde de hayvan kaynaklı kuduzdan birçok köy karantina altına alınmaktadır ve karantina altına alınan bölgede kuduz kaynağı olarak kurt, çakal gibi karnivorlar verilmektedir.

1.2 KEMİRİCİLER (RODENTIA)

Kemiriciler memeli sınıfının en büyük takımıdır. 29 familyaya ait 400'ü aşkın cins ve 2000'den fazla tür ile temsil edilmektedir (Wilson and Reeder 2005, Yiğit et al. 2006, Çoğal 2011). Kutup bölgeleri hariç dünyanın her yerinde yayılış göstermektedirler (Yiğit et al. 2006). Türkiye sınırları içerisinde 9 familyaya ait 65 kemirici türü bulunmaktadır (Kryštufek et al. 2009). Farklı ekolojik koşullara adapte olmuşlardır. Bazıları toprak üstünde yaşarken, bazıları toprak altı yaşamına adapte olmuştur. Bazı türler suculdur. Bazıları ise çöl yaşamına uyum sağlamışlardır (Montuire 2001).

Apodemus ve *Myodes* türleri aynı orman habitatında yaygın olan türlerdir. İki tür de aynı habitat gereksinimlerine sahip olmalarına rağmen, popülasyonların devinim ve taşıma kapasitesi gibi nedenlerden dolayı farklılık gösterirler. *Myodes* türleri kuru karışık ve yaprak döken ağaçların olduğu bölgeleri tercih ederken (Gurnell 1985, Çolak and Kıvanç 1991, Kozakiewicz et al. 2009), *Apodemus* türleri nemli her tip habitatta yayılış gösterebilmektedir (Pucek 1983, Kozakiewicz et al. 2009). *Apodemus* türleri *Myodes* türlerinden daha büyük olduklarından dolayı baskın türlerdir (Wolton and Flowerdew 1985). Bu nedenle ev aralıkları daha geniştir, daha hareketli ve daha geniş alanlarda yayılış gösteren türlerdir (Wolton and Flowerdew 1985, Bąkowski and Kozakiewicz 1988, Mazurkiewicz and Rajska-Jurgiel 1998, Szacki 1999).

Kemiricilerin evrimsel olarak Miosen periyodunda ortaya çıkışları ile Dünya'daki otlakların oluşması aynı periyoda denk gelmektedir. Bu nedenle kemiricilerin çoğu morfolojik ve fizyolojik olarak herbivor ya da granivordur. İnsanlar da tarih boyunca ormanlık alanları ya da çayırları tarımsal olarak değerlendirmektedirler. Kemiriciler ve insanlar birbirleriyle her zaman yakın temas içerisinde olmuşlardır. Besin tercihlerinin birbirleri ile aynı olması konusunda rakip olsalar da genellikle de aynı patojenin konakları olmuşlardır. Bu iki nedenden dolayı kemiriciler insan sağlığı ve evcil hayvanlar için zararlı olmaktadır (Smith et al. 1988) ve kemiricilerin bazı türlerinin taşıdıkları hastalıklar kolayca insanlara

bulaşmaktadır (Buckle and Smith 1994). Dünya genelinde kemirici kaynaklı yaklaşık 35 hastalık bulunmaktadır (URL-9 2013).

1.2.1 Kemiricilerin Populasyon Yapısı

Çoğu memeli türü küçük populasyon boyutu, sosyal ve davranışsal çiftleşmenin sonucunda düşük dağılıma oranlarına bağlı olarak ayrı seviyelerde populasyon alt bölümlerine ayrılırlar (Chepko-Sade and Halpin 1987). Ancak büyük memelilerin aksine küçük rodentlerde dağılımın frekansı ve uzaklığı ev aralığı ile bağlantılıdır (Gaines and McClenaghan Jr 1980, Gliwicz 1988, Zhang and Usher 1991, Gliwicz 1992, Krebs 1992, Stenseth and Lidicker 1992, Halle 1993). Eğer populasyon geniş yayılım gösterirse, populasyonun genetik yapısı düşük seviyelerdedir (Slatkin 1987). Populasyonlar arasındaki genetik farklılık derecesi gen akışının tekrarlanması ve bunun sonucu olarak da coğrafik uzaklıktan etkilenmektedir. Yapılan çoğu çalışma populasyonların yayılma potansiyeline rağmen genetik olarak farklılaştıklarını ispatlamaktadır (Calhoun and Greenbaum 1991, Mossman and Waser 2001, Berthier et al. 2005). Türler arasında tutarsızlık görülüyorsa, bu onların heterojen olarak alt bölümlere ayrıldığını gösterir. Bu nedenle bu gibi durumlarda populasyonların yapısı ve dağılımlarıyla ilgili varsayımlarda bulunulamaz. Eğer türler arasındaki gen akışı düşük oranlarda ise populasyon birçok küçük altpopulasyon içerebilir (Dallas et al. 1995).

Populasyonların genetik çeşitliliklerinin belirlenmesi populasyondaki türlerin genetik kaynaklarının korunması ve kullanılması açısından oldukça önemlidir. Geçmişte populasyon ile ilgili yapılan tüm çalışmalar morfolojik ve davranışsal temele dayanıyordu. 1960'lı yıllardan itibaren gelişen moleküler teknikler sayesinde genetik belirteçler ile yapılan çalışmalar artmaya başlamıştır (Hillis et al. 1996). Bu yöntemlerin gelişmesi araştırmacılara populasyonlar arasındaki genetik ilişkiyi daha doğru bir şekilde kavrama imkanı vermiş ve filogenetik ilişkilerini daha doğru bir şekilde ortaya koymalarını sağlamıştır (Hillis et al. 1996, Kayhan Ayan 2007). Bu nedenle genetik belirteçler populasyonlardaki genetik çeşitlilik hakkında çıkarım yapmamızı sağlayan önemli araçlar haline gelmişlerdir. Genetik çeşitlilik analizlerinde kullanılan birçok belirteç bulunmaktadır. Bunların en önemlilerini hibridizasyona dayalı RFLP (Botstein et al. 1980) ve PZT'ne dayalı AFLP (Vos et al. 1995, Liu et al. 1999), RAPD (Welsh and McClelland 1990, Williams et al. 1990), mikrosatelit (O'reilly et al. 1998, Ujino et al. 1998) gibi belirteçlerin kullanıldığı yöntemler oluşturmaktadır. En çok tercih edilenler PZT'ne dayalı olanlardır. Çünkü bu teknikler

maliyeti daha az, işgücü ve zaman bakımından güç tasarrufu sağlamaktadırlar. Son yıllarda mikrosatelit belirteçlerin kullanımı yaygın hale gelmiştir (Devos and Gale 1992).

1.2.1.2 RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi)

RFLP, ilk keşfedilen moleküler belirteçtir. DNA dizisindeki varyasyonun miktarının ölçülmesi amacıyla kullanılmaktadır. RFLP verileri restriksiyon enzimleri aracılığıyla 4-6 baz uzunluğundaki özel DNA bölgelerinin kesilmesi ile elde edilmektedir. RFLP analizleri tüm genom üzerinde yapılabileceği gibi DNA'nın belirli bir parçası üzerinde de yapılabilir. RFLP metodu DNA'nın bir ya da birkaç enzim kullanılarak parçalanması ve elde edilen DNA parçalarının jelde yürütülmesi işlemlerinden oluşmaktadır. Jel üzerinde yürütülüp büyüklüklerine göre birbirinden ayrılmış olan parçaları özel bir membran üzerine aktarılır. Membrana floresan probalar ile işaretlenmiş olan tek iplikli hedef DNA kopyaları eklenir ve aktarılan DNA parçalarının işaretli DNA parçaları ile hibridizasyonu gerçekleşir. Daha sonra otoradyografi işlemiyle hibridize olmuş parçalar gözlemlenir. Bireyler arasındaki işaretli bant sayısı ve büyüklükleri genetik benzerlikleri hakkında tahmin yapmamızı sağlar. RFLP metodu genom haritalanmasında, babalık testinde, hastalık riskinin belirlenmesi ve genetik bozukluklarda genlerin yerleşiminin belirlenmesi gibi alanlarda kullanılan, sonuçların güvenilirliği konusunda ve ko-dominant belirteç sistemine sahip önemli bir yöntemdir. Ancak metod oldukça zahmetli, zaman alıcı ve çok fazla DNA'ya ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle son yıllarda DNA dizi tekniklerinin de çoğalmasıyla bu yöntemin kullanılmasından uzaklaşmıştır (Freeland et al. 2011).

1.2.1.3 AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)

AFLP tekniği 1995 yılında DNA parmakizi tekniği olarak adlandırılmış, PZT'ye dayalı dominant belirteç veren ve son zamanlarda oldukça kullanılan bir moleküler belirteç tekniğidir (Vos et al. 1995, Gür and Şeker 2012). Teknik temel olarak üç basamakta gerçekleşmektedir:

- 1- Restriksiyon enzimi ile genomik DNA'nın parçalara ayrılması ve oligonükleotid adaptörlerin bağlanması
- 2- Seçici PZT ile kesilmiş parçacık setlerinin çoğaltılması
- 3- Çoğaltılmış parçacıkların jel analizinin yapılması

PZT ürünleri poliakrilamid jelde yürütülerek oluşan polimorfizme göre değerlendirme yapılmaktadır. Bu teknikle genellikle 50-100 tane DNA parçacığı amlifiye edilip, poliakrilamid jel üzerinde bantlar belirlenebilmektedir. AFLP tekniğinin polimorfizminin yüksek olması ve çok sayıda lokusu aynı anda taraması gibi özellikleri nedeniyle parmak izi analizi için oldukça elverişli bir metoddur. Ayrıca heterozigot ve homozigot bireyler arasındaki farklılıkları saptamada da başarılı bir tekniktir. Ancak avantajlarının yanı sıra tekniğin önemli dezavantajları da mevcuttur: dominant belirteç vermesi ve farklı genetik haritalar arasında transfer güçlüğü olması gibi (Kaçar 2001, Gür and Şeker 2012).

1.2.1.4 Mikrosatelitler

Mikrosatelit terimi ilk olarak Litt ve Luty tarafından 1989 yılında kullanılmıştır (Litt and Luty 1989). Mikrosatelitler yaklaşık 1-6 bp uzunluğundaki basit dizi tekrarları (SSRs) veya kısa tandem tekrarları (STRs) olarak bilinen DNA parçalarıdır. Ökaryot hücrelerde birli, ikili, üçlü, dördü ya da beşli basit dizi tekrar motifleri olarak bulunurlar (Powell et al. 1996). Bu basit dizi tekrarlarının sayısı 5-100 arasında değişim göstermektedir (Powell et al. 1996) ve bu tekrar sayılarındaki varyasyonlar polimorfizmi oluşturmaktadır (Küçük 2010). Memelilerdeki en yaygın mikrosatelit motifleri ikili tekrarlar olan GT/AC dir ve yaklaşık her 30 kb'da bir ortaya çıkmaktadır (Dunham 2004, Ceyhun 2007).

Mikrosatelitler, Mendel yasalarına göre nesilden nesile aktarılmaktadırlar (Sander 2000) ve tüm genoma hemen hemen esit olarak dağılmaktadırlar (Ceyhun 2007). Bu nedenle özellikle taksonomik çalışmalar, populasyon analizlerinde, genom haritalandırma projelerinde, ebeveynlik testlerinde ve kanser teşhislerinde çok kullanılan genetik belirteçlerdir (Goldstein et al. 1995, Gillet 1999, Ceyhun 2007). Çoğunlukla mikrosatelit lokusları yakın akraba türler arasında korunmuş olarak bulunmaktadır (Provan et al. 2004).

Mikrosatelitler diğer dizi tiplerinden daha hızlı mutasyona uğrarlar. Yaklaşık mutasyon oranı farelerde 10^{-3} - 10^{-4} tür (Dallas 1992). Bu yüksek mutasyon oranından dolayı her lokusta çoklu allel bulunur ve bu yüksek polimorfizm mikrosatelitleri populasyonların genetik olaylarını ortaya koymak (Lexer et al. 1997) ve yakın akraba genotiplerin ayrılmasında kullanılmak için uygun hale getirir (Kumar et al. 2009). Dolayısıyla populasyon çalışmalarında da kullanılabilmektedirler (Küçük 2010). Ayrıca çok az miktarda DNA kullanımına da imkan vermesi mikrosatelitleri çok kullanışlı hale getirmektedir (Powell et al. 1996). Mikrosatelitler

herhangi bir hedef organizmadan kolayca izole edilebilmesinin yanısıra tekrar ve komşu tekrarları içeren tüm lokusu da dizilebilir. Mikrosatelit tekrar bölgelerindeki polimorfizm PZT yardımıyla kolayca gözlemlenebilir (Gillet 1999). Bunun için DNA'daki tekrar bölgesinin tamamlayıcısı olan lokus-spesifik öncüller kullanılır (Queller et al. 1993). Bu öncüller mikrosatelitlerin yan bölgelerinde bulunan 20-25 bp uzunluğundaki bölgeden elde edilmektedir (Kumar et al. 2009, Küçük 2010). Öncüller aracılığıyla istenen motif PZT'nde çoğaltılmakta ve bu PZT ürünleri uygun elektroforez sisteminde koşturularak polimorfizm görünür hale getirilmektedir. Populasyon içindeki çeşitlilik ve yapı mikrosatelit belirteçlerin bu yüksek polimorfizmi sayesinde kolayca belirlenmektedir (Morgante and Olivieri 1993).

BÖLÜM 2

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma için 2011-2012 yılları arasında Zonguldak ili Çaycuma ilçesi'nden Sherman tipi kapanlar kullanılarak kemirici örnekleri toplanmıştır. Örneklerin tür teşhislerinde morfolojik veriler, elde edilen örneklerden alınan dokularda RABV taranması için viral RNA ekstraksiyonu, cDNA sentezi, yuvalanmış (nested) RT-PZT ve görüntülemek için de agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Ayrıca populasyon yapısı çalışmaları için agaroz jel elektroforezinde pozitif bant veren örneklerin lokalitelerinden toplam 45 örneğin mikrosatelit çalışmaları hizmet alımı ile yaptırılmıştır.

2.1 ARAZİÇALIŞMALARI

Bu çalışma 2011-2012 yılları arasında Zonguldak ili Çaycuma ilçesinde gerçekleştirilen birer günlük arazi çalışmaları sonucunda 197 *Apodemus* spp. ve 45 *Myodes glareolus* türünden toplam 242 kemirici örneği elde edilerek yapılmıştır. Kemiricilerin yakalanması için öldüren kapanlara göre çeşitli avantajları olan Sherman tipi kapanlar kullanılmıştır. Bu kapanlar hayvandan dokuların toplanmasına dek geçen süre içinde canlı kalmasını sağlayarak enfeksiyona yol açan olası Lyssavirüslerin RNA'larının denatüre olması ihtimalini minimize eder. Ayrıca kapana yakalanan hayvanın yabani doğadaki etçiller tarafından yenerek tüketilmesi ya da harab edilmesi olasılığını ortadan kaldırır. Kapanlarda çikolata ve fındık karışımından elde edilen yemler kullanılmıştır. Kapanlar ormanlık alanda bitki örtüsünün yoğun olduğu yerlere, ağaç kovuklarına ve taşlık alanlara kurulmuştur.

Lokalite seçimi yapılırken Zonguldak Sağlık İl Müdürlüğü'ne başvurulmuştur. Zonguldak Sağlık İl Müdürlüğü verilerine göre son iki yılda kuduz kaydı yapılmış lokalite verileri temel alınarak örneklemin yapılacağı alan belirlenmiştir. Kapanlama yapılan tüm lokalitelerin GPS kayıtları alınmıştır. Lokaliteler ve GPS noktaları Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Belirlenen lokaliteler ve lokalitelere göre örnek sayıları Çizelge 2.1'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1 Örnek toplanan lokaliteler.

Çizelge 2.1 Lokalitelere göre türlerin dağılımı.

LOKALİTE	TÜR		
	<i>Myodes glareolus</i>	<i>Apodemus spp.</i>	TOPLAM
Akpınar	2	17	19
Temenler	13	7	20
Türkali	-	12	12
Derecikören	7	14	21
Çömlekçi	7	6	13
Yeşilköy	2	6	8
Çomranlı	-	1	1
Yeşilyayla	-	4	4
Y. İhsaniye	3	9	12
A. İhsaniye	1	5	6
Sazköy	2	18	20
Sarmasık	-	27	27
Sarmasık yakınları	6	29	35
Olukyanı köyü	-	11	11
Filyos	2	31	33
TOPLAM	45	197	242

2.2 VİRÜS ÇALIŞMALARI

2.2.1 Diseksiyon ve Örneklerin Hazırlanması

Elde edilen örnekler diseksiyon işleminden önce arazi defterine örnek numarası verilerek ve hayvanın burun anüs mesafesi, kuyruk boyu, ardayak boyu, kulak boyu, cinsiyeti ve ağırlığı belirlenerek kayıt edilmiştir.

Hayvan eterle bayıltılır. Bayıldıktan sonra boynu kırılarak hızlıca öldürülür. Viral RNA çalışması için her bir hayvanın bütün beyin dokusu foramen magnum'dan pastör pipeti yardımıyla kafatasına zarar vermeden dikkatlice alınır (Iamamoto et al. 2011). Alınan beyin dokuları RNA koruma çözeltisi içerisine alındıktan sonra -80 °C'de saklanmıştır. Elde edilen örneklerin kafatasları tür teşhisinde kullanılmak üzere laboratuvarda temizlenmiş olup, temizleme işlemi kafataslarının 80-90 °C'deki amonyaklı suda 10-15 dakika bekletilmesi sonucunda üzerlerindeki yağ ve kas dokusundan ayrılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Kafatasları Bülent Ecevit Üniversitesi Moleküler Sistemik Laboratuvarı'nda saklanmaktadır.

2.2.2 RABV-RNA'nın Saptanması

Hedef kemiricilerin (*Apodemus* spp. ve *Myodes glareolus*) toplan 242 beyin dokusundan RABV genomik RNA'sının saptanması için aşağıdaki işlemler gerçekleştirilmiştir:

2.2.2.1 RNA Ekstraksiyonu

Acide-guanidium-phenol-chloroform yöntemi ile RNA ekstraksiyon işlemi yapılmıştır (Chomczynski and Sacchi 2006). Bu amaçla ticari bir RNA ekstraksiyon solusyonu olan RNAtidy G üretici firmanın önerilerine göre aşağıdaki iş akışı ile kullanılmıştır:

1. 1 ml RNAtidy G içerisine 50-100 mg doku konuldu ve tekrarlı pipetleme yapılarak karıştırıldı. Dokular iyice parçalandı.
2. Homojenize örneklerin her biri RNA/ protein komplekslerinin ayrışması için kısa bir süre (3-5 dk) inkübe edildi.
3. Lizat üzerine kloroform eklendi. İlk homojenleşmede her 1 ml RNAtidy G için 0,2 ml kloroform kullanmak gereklidir.

4. Tüp dikkatlice kapatıldı ve kuvvetlice sallandı.
5. Tüp RNA'nın saflığının artmasını sağlamak için 15-25°C' de 10 dakika inkübe edildi.
6. Solüsyonu 3 faza ayırmak için, tüpler 12000 g ve 4 °C'de 15 dakika santrifüjlendi.
7. Üstteki sulu faz yeni tüpe aktarıldı ve üzerine sulu fazla aynı hacimde izopropanol eklendi.
8. Tüp kapatıldıktan sonra birkaç kez ters çevrilerek iyice karıştırıldı.
9. Örnek, RNA'nın çökmesi için 15 dakika buz üzerinde bekletildi.
10. 12000 g ve 4 °C'de 15 dakika santrifüjlenir. Süpernatant uzaklaştırıldı.
11. Her santrifüj tüpüne %75 ethanol eklendi. İlk homojenizasyon prosedüründe her 1 ml RNAtidy G için %75'lik etanolden en azından 1 ml kullanmak gereklidir.
12. Vorteks ile RNA pelleti etanolde yıkandı.
13. Örnek, 7500 g'de 4 °C veya oda sıcaklığında 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
14. Her santrifüj tüpüne %100 ethanol eklendi. İlk homojenizasyon prosedüründe kullanılan her 1 ml RNAtidy G için %100'lik etanolden en azından 1 ml kullanıldı.
15. Vorteks ile RNA pelleti etanolde yıkandı.
16. Örnek, 7500 g'de 4 °C veya oda sıcaklığında 15 dakika santrifüjlendi.
17. RNA pelletindeki fazla ethanol havada 10-15 dakika bekletilerek ortadan kaldırıldı.
18. RNA pelleti, 20 µl RNase-free enjeksiyonluk suda tekrar süspansiyon haline getirildi ve -80 °C'ye kaldırılarak saklandı.

2.2.3 Öncüllerin Belirlenmesi

Bu çalışmada hem "Hemi-nested" PZT için bir ileri, iki geri öncül tasarlanmış, hem de Heaton ve arkadaşlarının referans öncülleri kullanılmıştır (Heaton et al. 1997). Öncüllerin tasarlanması için GenBank veri tabanındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) Türkiye, Rusya, Irak, Ukrayna, Bulgaristan ve Yunanistan'dan bildirilmiş farklı türlerden köken alan RABV dizileri indirilerek MEGA 5.2.1 sürümü ile hizalanmıştır (Kumar et al. 2008). Diziler ile ilgili bilgiler çizelge 2.3'de gösterilmiştir. İleri ve geri öncüller tüm genom içerisindeki korunmuş bölge olan N geni içerisinde seçilerek, 300 nükleotidlik bölge çoğaltılacak şekilde tasarlandı. Seçilen öncüllerin uygunluğunun tespiti için Integrated DNA Technologies (<http://eu.idtdna.com/>) sitesine girilerek öncüllerin erime sıcaklığı, GC yüzdesi, self-dimer ve hair-pin durumları gözden geçirildi, ayrıca BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programı ile de dizilerin uyumluluklarına bakılarak öncüllerin hangi organizmaları yakaladığı kontrol edildi.

Çizelge 2.2 Öncül tasarımında kullanılan dizilerin GenBank bilgileri.

Dizi Kodu	GenBank No	Konak	Ülke
TR1	AY956352.1	Sığır	Türkiye
TR2	AY956351.1	Köpek	Türkiye
TR3	AY536258.1	Tilki	Türkiye
TR4	AY536257.1	Çakal	Türkiye
TR5	AY536256.1	Çakal	Türkiye
TR6	AY536254.1	Çakal	Türkiye
TR7	EU180618.1	İnsan	Türkiye
TR8	EU180617.1	İnsan	Türkiye
TR9	EU180616.1	İnsan	Türkiye
TR10	EU180615.1	İnsan	Türkiye
TR11	DQ837480.1	Köpek	Türkiye
TR12	DQ837479.1	Köpek	Türkiye
TR13	DQ837478.1	Köpek	Türkiye
TR14	DQ837476.1	Köpek	Türkiye
TR15	DQ837474.1	İnek	Türkiye
TR16	AY091618.1	Sığır	Türkiye
TR17	AY091615.1	Tilki	Türkiye
TR18	AY091614.1	Tilki	Türkiye
TR19	AY091613.1	Tilki	Türkiye
TR20	AY091611.1	Tilki	Türkiye
TR21	AY091609.1	Kurt	Türkiye
TR22	AY091608.1	Köpek	Türkiye
TR23	AY091630.1	Tilki	Türkiye
TR24	AY091629.1	Tilki	Türkiye
RUS1	KC595283.1	Kızıl Tilki	Rusya
RUS2	KC595282.1	Kızıl Tilki	Rusya
RUS3	KC595281.1	Kedi	Rusya
RUS4	KC595280.1	Kızıl Tilki	Rusya
RUS5	JQ944707.1	Geyik	Rusya
RUS6	JQ944706.1	Köpek	Rusya
RUS7	JQ944705.1	Köpek	Rusya
RUS8	JQ944704.1	Rakun	Rusya
RUS9	EF542830.1	-	Rusya
IRQ1	JX524176.1	İnek	Irak
IRQ2	JX524178.1	İnek	Irak
IRQ3	JX524177.1	Köpek	Irak
IRQ4	EF611869.1	Köpek	Irak
UKR1	JN656511.1	Köpek	Ukrayna
UKR2	JN656510.1	Kedi	Ukrayna

Çizelge 2.2 (devam ediyor)

Dizi Kodu	GenBank No	Konak	Ülke
UKR3	JN656509.1	Köpek	Ukrayna
UKR4	JN656508.1	Kedi	Ukrayna
UKR5	JN656507.1	Sansar	Ukrayna
UKR6	JN656506.1	Köpek	Ukrayna
UKR7	JN656505.1	Tilki	Ukrayna
UKR8	JN656504.1	Kedi	Ukrayna
UKR9	JN656503.1	Köpek	Ukrayna
UKR10	JN656502.1	Tilki	Ukrayna
UKR11	JN656501.1	Kokarca	Ukrayna
UKR12	JN656500.1	Kedi	Ukrayna
UKR13	JN656499.1	Kedi	Ukrayna
UKR14	JN656498.1	Tilki	Ukrayna
UKR15	JN656494.1	Tilki	Ukrayna
UKR16	JN656493.1	Kedi	Ukrayna
UKR17	JN656492.1	Tilki	Ukrayna
UKR18	JN656474.1	Öküz	Ukrayna
UKR19	JN656514.1	Rakun	Ukrayna
BUL1	JQ973873.1	Tilki	Bulgaristan
BUL2	JQ973872.1	Tilki	Bulgaristan
BUL3	JQ973871.1	Tilki	Bulgaristan
BUL4	JQ973870.1	Tilki	Bulgaristan
BUL5	JQ973869.1	Tilki	Bulgaristan
BUL6	JQ973868.1	Çakal	Bulgaristan
BUL7	JQ973866.1	Tilki	Bulgaristan
BUL8	DQ300304.1	İnsan	Bulgaristan
BUL9	DQ300303.1	Köpek	Bulgaristan
BUL10	DQ300301.1	Çakal	Bulgaristan
BUL11	DQ300300.1	Tilki	Bulgaristan
BUL12	DQ300299.1	İnek	Bulgaristan
BUL13	DQ300298.1	Köpek	Bulgaristan
BUL14	DQ300296.1	Tilki	Bulgaristan
BUL15	DQ300294.1	Tilki	Bulgaristan
BUL16	DQ300293.1	Tilki	Bulgaristan
GR1	KC011844.1	Kızıl Tilki	Yunanistan

Çizelge 2.3 PZT için RABV'ün N genine göre tasarlanan öncüller.

Öncül	Dizi	Polaritesi	Pozisyon	Nükleotit sayısı	%GC	Tm	Hairpin Tm	Self-dimer (kcal/mole)
RABV-F	5'-ATGGATGCGAYAAAGATTG-3'	Sense	1-19	19	% 42.1	50.0°C	-	-
RABV-R1	5'-GTC ART TCC AWG CCT CCT G-3' Reverse komplementeri: 5'- CAG GAG GCW TGG AAY TGA C -3'	Antisense	368-386	19	% 55.3	54.6°C	-	-
RABV-R2	5'- ACG YTT TAT BTC YAC CAG AGA -3' Reverse komplementeri: 5'- TCT CTG GTR GAV ATA AAR CGT -3'	Antisense	319-339	21	% 41.3	52.5°C	-	-

Çizelge 2.4 Kuduz (RABV) ve kuduz benzeri virüslerin (RRV) hnRT-PCR amplifikasyonu için kullanılan Oligonükleotid öncülleri (Heaton et al. 1997).

Öncül	Dizi	Sense	Pozisyon
JW12	ATGTAACACC(C/T)CTACAATTG	M	55-73
JW6 (DPL)	CAATTCGCACACATTTTGTG	G	660-641
JW6 (E)	CAGTTGGCACACATCTTGTG	G	660-641
JW6 (M)	CAGTTAGCGCACATCTTATG	G	660-641
JW10 (DLE2)	GTCATCAAAGTGTG(A/G)TGCTC	G	636-617
JW10 (ME1)	GTCATCAATGTGTG(A/G)TGTTTC	G	636-617
JW10 (P)	GTCATTAGAGTATGGTGTTC	G	636-617
SB1	GATCA(A/G)TATGAGTACAAGTACCCTGC	M	140-165
SB2	GATCAATATGAATATAAATATCCCGC	M	140-165

2.2.4 cDNA Sentezi

RABV RNA virüsünün PZT ile DNA'sının çoğaltılabilmesi için öncelikle cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi üretici firmanın (Fermentas #EP0352) tavsiyelerine göre yapıldı:

1. 5µL kalıp RNA 200µL'lik tüpe konuldu.
2. 0.2 µg Random hexamer eklendi.
3. Son hacim 11.5 µL olacak şekilde DEPC-treated water ile tamamlandı.
4. Tüp ısı döngü cihazında 65°C'da 5 dakika inkübe edildi ve ardından buzda soğutuldu.
5. 5x reaksiyon tamponundan 4µL, 10mM dNTP'den 2µL, ribonükleaz inhibitöründen 0.5 µL (20u) ve M-MuVL enzimden 2µL (40u) eklendi.
6. Karışım ısı döngü cihazında 37 °C'de 60 dakika, ardından 25°C'da 10 dakika inkübe edildi.
7. Reaksiyon, tüpün 70°C'da 10 dakika ısıtılarak durduruldu ve 4°C'da soğutuldu.
8. Sentezlenen cDNA -20°C'da saklandı.

2.2.5 RABV İçin Tasarlanan Öncüllerle Yapılan PZT Optimizasyonu

Optimizasyon çalışmalarında polimeraz zincir tepkimesinin duyarlılığının maksimum düzeyde olması ve dokuda bulunan en düşük miktardaki RNA'nın yakalanabilmesi hedeflendi. Bunun için öncelikle başlangıç miktarı bilinen (10^4 kopya/ml) pozitif kontrol dilüsyonları kullanıldı. "Hemi-nested" PZT ve "Touchdown" PZT uygulamaları ile en duyarlı ve özgül sonuçları veren reaksiyon karışımı konsantrasyonları, döngüler ve bağlanma (annealing) sıcaklıkları belirlendi. Çalışmalar sırasında elde edilen PZT sonuçları mümkün olan en düşük konsantrasyondaki pozitif kontrol miktarını smear ve özgül olmayan bağlanma olmaksızın yakalayabilen şartlar optimum olarak kabul edildi.

Optimum şartların belirlenmesi amacıyla Öncül konsantrasyonu, Mg^{++} konsantrasyonu, bağlanma (annealing) sıcaklığı, döngü sayısı gibi değişkenlerle oynanarak yapılan denemeler sonucunda en duyarlı sonuçlar belirlendi. Bu duyarlılık düzeylerinde özgül olmayan bağlanmaların giderilmesi amacıyla ise ortama farklı konsantrasyonlarda dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek uygun konsantrasyon belirlendi.

2.2.6 Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT)

2.2.6.1 Tasarlanan Öncüllerle Yapılan Polimeraz Zincir Tepkimesi

Yapılan optimizasyon sonucunda belirlenen çoğaltma işlemi iki aşamalı olarak yapıldı. Çoğaltma için öncelikle dış sonra iç öncüller kullanıldı. Reaksiyonlar 50µL hacimde yapıldı. Çoğaltma işlemi ısı döngü cihazında aşağıdaki döngüler doğrultusunda gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar ışığında örneklerin taranması için en uygun PZT karışımları ve tepkime şartları aşağıdaki şekilde belirlendi

Çizelge 2.5 1. PZT’de kullanılan karışımın içeriği.

Bileşen	Miktar
H ₂ O	36,5 µl
Buffer 10X (NH ₄) ₂ SO ₄	5 µl
MgCl ₂ (25mM)	3 µl
dNTP (10mM)	1 µl
Öncül RABV F (25 pmol/ µl)	1 µl
Öncül RABV R1 (25 pmol/ µl)	1 µl
DMSO (%2)	1 µl
Taq polimeraz	0.5 µl
cDNA	1 µl

Çizelge 2.6 1. PZT uygulaması amplifikasyon koşulları.

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Ön denatürasyon	94	3 dk.	1
Denatürasyon	94	30 sn	10
Bağlanma	51	30 sn	
Uzatma	72	45 sn	
Denatürasyon	94	30 sn	10
Bağlanma	50	30 sn	
Uzatma	72	45 sn	
Denatürasyon	94	30 sn	15
Bağlanma	48	30 sn	
Uzatma	72	45 sn	
Son uzatma	72	5 dk	1
Saklama	+4		∞

Çizelge 2.7 2. PZT’de kullanılan karışımın içeriği.

Bileşen	Miktar
H ₂ O	36,5 µl
Buffer 10X (NH ₄) ₂ SO ₄	5 µl
MgCl ₂ (25mM)	3 µl
dNTP (10mM)	1 µl
Öncül RABV F (25 pmol/ µl)	1 µl
Öncül RABV R1 (25 pmol/ µl)	1 µl
DMSO (%2)	1 µl
Taq polimeraz	0.5 µl
cDNA	1 µl

Çizelge 2.8 2. PZT uygulaması amplifikasyon koşulları.

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Ön denatürasyon	94	3 dk.	1
Denatürasyon	94	45 sn	10
Bağlanma	51	45 sn	
Uzatma	72	45 sn	
Denatürasyon	94	45 sn	25
Bağlanma	48	45 sn	
Uzatma	72	45 sn	
Son uzatma	72	5 dk	
Saklama	+4		∞

2.2.6.2 Referans Öncüller ile Yapılan Polimeraz Zincir Tepkimesi

Çalışma için belirlenen öncüllerin sentezlenmesi ve PZT protokolünün (Heaton et al. 1997) uygulanması BM Yazılım Danışmanlık ve Laboratuvar Sistemleri Ltd. Şti. tarafından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Örneklerin taranması için kullanılan PZT karışımları ve tepkime şartları aşağıdaki şekildedir:

Çizelge 2.9 1. PZT’de kullanılan karışımın içeriği.

Bileşen	Stok Konsantrasyonu	Reaksiyon Konsantrasyonu
PCR Buffer	10X	1X
MgCl2	25mM	1,5 mM
dNTP mix	20 mM	0,2 mM
JW6-E	20 µM	0,4 µM
JW6-DPL	20 µM	0,4 µM
JW6-M	20 µM	0,4 µM
JW12	20 µM	0,7 µM
Hot Start Taq DNA Polymerase	5U/ µl	2.5 U
cDNA	2 µl	
PCR grade su ile 25 µl'ye tamamlanır		

Çizelge 2.10 1. PZT uygulaması amplifikasyon koşulları.

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
95	15 dk.	1
95	60 sn	5
45	90 sn	
50	20 sn	
72	60 sn	
95	30 sn	
45	60 sn	40
50	20 sn	
72	60 sn	
95	30 sn	
45	90 sn	1
50	20 sn	
72	10 dk.	
+8	∞	

Çizelge 2.11 2. PZT’de kullanılan karışımın içeriği.

Bileşen	Stok Konsantrasyonu	Reaksiyon Konsantrasyonu
PCR Buffer	10X	1X
MgCl2	25mM	1,2 mM
dNTP mix	20 mM	0,2 mM
JW10-DLE2	20 µM	0,2 µM
JW10-MEI	20 µM	0,2 µM
JW10-P	20 µM	0,2 µM
JW12	20 µM	0,4 µM
Hot Start Taq DNA Polymerase	5U/ µl	2 U
PCR Ürünü	1 µl	
PCR grade su ile 35 µl'ye tamamlanır		

Çizelge 2.12 2. PZT uygulaması amplifikasyon koşulları.

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
95	15 dk.	1
95	45 sn	25
59	30 sn	
72	35 sn	
72	5 dk.	1
8	∞	

2.2.7 AgaroZ Jel Elektrofözezi

PZT ürünlerini görüntölemek amacıyla agaroZ jel elektrofözezi yapıldı. Jel hazırlanırken 100 mL 1xTAE içerisinde 1gr agaroZ karıştırıldı. Mikrodalga fırında orta güçte agaroZ eritildi. İçerisine 8.0 µL etidyum bromid (10mg/mL) karıştırıldı ve tarağı hazır jel kabına dökölüp donması için oda ısısına bırakıldı. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice jelin içerisinde çıkarıldı ve jel kalıp ile birlikte elektroföze tankına yerleştirildi. 10 µL PZT ürününe 10xDNA yükleme tamponundan 2 µL karıştırıldı ve jelde açılmış kuyulara yüklendi. Kuyulardan birisine “marker” yüklendi. Elektroföze güç kaynağı 120V’a ayarlandı ve jel 40 dakika yürütölldü. Jel translüminatörde orta dalga UV’de (280-340 nm) görüntölendi ve Vilber Lourmat Infinity-1000/26MX cihazıyla fotoğrafı çekildi. Görüntölün bant büyüklöri “marker” ile karşılaştırıldı.

2.3 POPULASYON ÇALIŞMALARI

RABV taraması sırasında Agaroze jel elektroforezinde pozitif bant veren örneklerin lokalitelerine ait toplam 45 örneğin mikrosatelit çalışmaları BM Yazılım Danışmanlık ve Laboratuvar Sistemleri Ltd. Şti. tarafından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

2.3.1 Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT)

Mikrosatelit çalışmalarında kullanılan karışımların içerikleri ve amplifikasyon koşulları ile ilgili bilgiler aşağıda verilmiştir.

Çizelge 2.13 Mikrosatelit PZT çalışmalarında kullanılan karışımın içeriği.

Bileşen	Stok Konsantrasyonu	Reaksiyon Konsantrasyonu
PCR Buffer	10X	1X
MgCl ₂	25mM	1,2 mM
dNTP mix	20 mM	0,2 mM
İleri Öncül	20 µM	0,4 µM
Geri Öncül	20 µM	0,4 µM
Hot Start Taq DNA Polymerase	5U/ µl	2 U
DNA	2 µl	
PCR grade su ile 35 µl'ye tamamlanır		

Çizelge 2.14 Mikrosatelit PZT uygulaması amplifikasyon koşulları.

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
95	13 dk.	1
95	30 sn	32
59	30 sn	
72	28sn	
72	5 dk.	1
8	∞	

Çizelge 2.15 İkili PZT çalışmalarında “MSAf16+ MSAf22” gen bölgeleri için kullanılan karışımın içeriği.

Bileşen	Stok Konsantrasyonu	Reaksiyon Konsantrasyonu
PCR Buffer	10X	1X
MgCl ₂	25mM	1,2 mM
dNTP mix	20 mM	0,2 mM
MSAF16-F	20 µM	0,5 µM
MSAF16-R	20 µM	0,5 µM
MSAF22-F	20 µM	0,4 µM
MSAF22-R	20 µM	0,4 µM
Hot Start Taq DNA Polymerase	5U/ µl	2,2 U
DNA	2 µl	
PCR grade su ile 35 µl'ye tamamlanır		

Çizelge 2.16 “MSAf16+ MSAf22” gen bölgeleri için yapılan ikili PZT amplifikasyon koşulları.

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
95	13 dk.	1
95	30 sn	35
58	30 sn	
72	25sn	
72	5 dk.	1
8	∞	

Çizelge 2.17 İkili PZT çalışmalarında “MSCg9 + MSCg15” gen bölgeleri için kullanılan karışımın içeriği.

Bileşen	Stok Konsantrasyonu	Reaksiyon Konsantrasyonu
PCR Buffer	10X	1X
MgCl ₂	25mM	1,2 mM
dNTP mix	20 mM	0,2 mM
MSCg9-F	20 µM	0,6 µM
MSCg9-R	20 µM	0,4 µM
MSCg15-F	20 µM	0,3 µM
MSCg15-R	20 µM	0,6 µM
Hot Start Taq DNA Polymerase	5U/ µl	2,2 U
DNA	3 µl	
PCR grade su ile 35 µl'ye tamamlanır		

Çizelge 2.18 “MSCg9 + MSCg15” gen bölgeleri için yapılan ikili PZT amplifikasyon koşulları.

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
95	13 dk.	1
95	30 sn	35
58	30 sn	
72	25sn	
72	5 dk.	1
8	∞	

2.3.2 Agaroz Jel Elektroforezi

PZT ile elde edilen amplifikasyon sonuçlarını görüntülemek amacıyla agaroz jel elektroforezi yapıldı. Jel hazırlanırken 100 mL 1x TBE tampon içerisinde 2.2 gr agaroz karıştırıldı. Mikrodalga fırında orta güçte agaroz eritildi. İçerisine 8.0 µL etidyum bromid (10mg/mL) karıştırıldı ve tarağı hazır jel kabına dökülüp donması için oda ısısına bırakıldı. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice jelin içerisinden çıkarıldı ve jel kalıp ile birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Jelde açılmış kuyulardan birisine “marker”, diğer kuyulara ise PZT ürünleri yüklendi. 100 volt akımda 120 dakika elektroforezde yürütüldü veUV ışığında görüntüsü alındı.

2.3.3 İstatistiksel Analizler

Zonguldak İli’nin Çaycuma ilçesindeki kuduz görülen lokalitelerden alınan *Myodes* ve *Apodemus* populasyonlarına ait örneklerin toplam 9 mikrosatellit lokusu bakımından tanımlanmasında kullanılan çeşitli istatistiksel değerlerin hesaplanması ve uygun analizlerin yapılması için Peak ScannerTM Software v1.0, POPGENE v 1.31 (Yeh et al. 1999), Arlequin v. 3.1 (Excoffier et al. 2006), GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse 2012) yazılımlarından yararlanılmıştır.

BÖLÜM 3

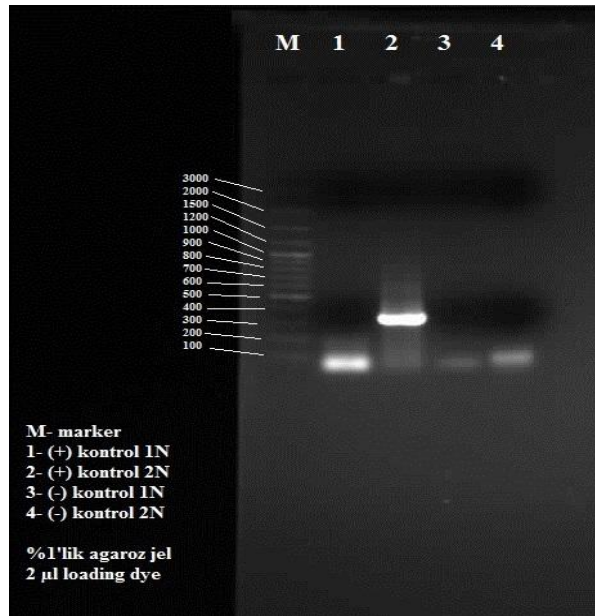
SONUÇLAR

3.1 VİRÜS ÇALIŞMALARI

Bu çalışmada Zonguldak İli'nin Çaycuma İlçesinde yer alan ve Sağlık İl Müdürlüğü'nün verilerine göre belirlenen 16 lokaliteden toplanan 242 örnekte “Hemi-nested” ve “Touchdown” PZT yöntemleriyle RABV taraması yapılmıştır.

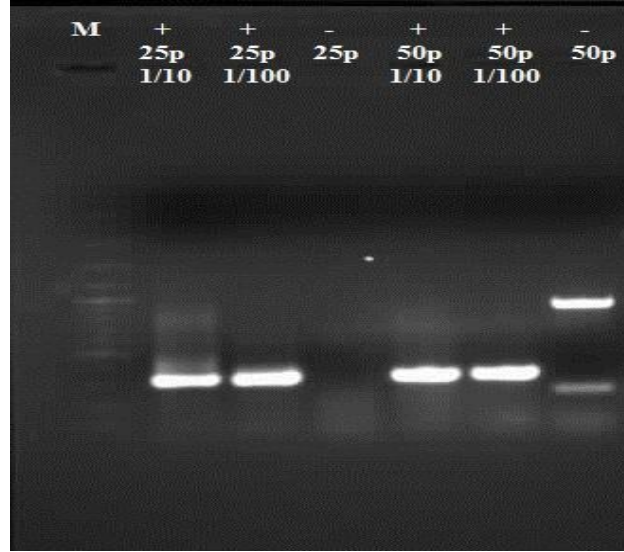
3.1.1 PZT Optimizasyon Bulguları

Tasarlanan PZT sonucunda öncüllerin ve R+ kontrolün çalıştığı tespit edildi. R+ kontrolün bant büyüklüğünün beklenen ile aynı olduğu gözlemlendi (Şekil 3.1).



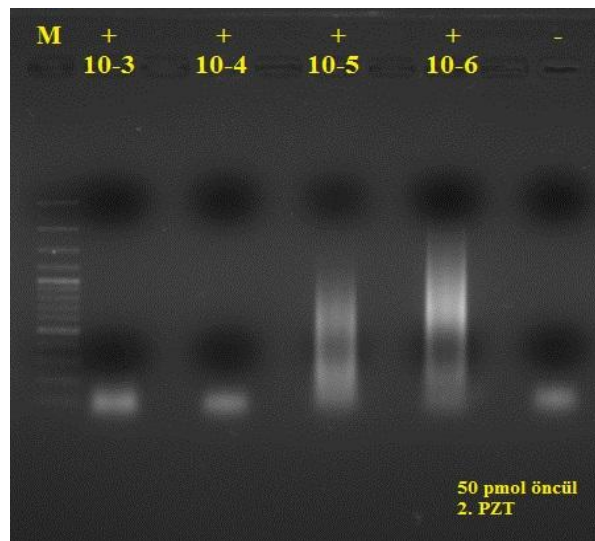
Şekil 3.1 PZT optimizasyonu-tasarlanan PZT ile R+ kontrol ve öncüllerin çalışmasının kontrolü.

Farklı dilüsyonlarda yaptığımız PZT denemelerinden en olumlu sonucu veren 50 pmol/ μ l lik öncülle R+ kontrolün 10^{-2} dilüsyonundan elde edilen ürünün verdiği gözlenmiştir (Şekil 3.2).



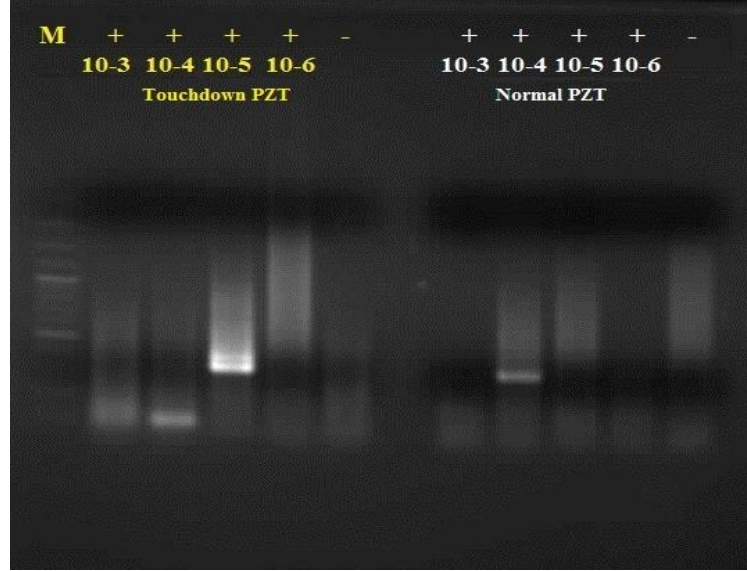
Şekil 3.2 PZT optimizasyonu-öncül konsantrasyonu ve R+ kontrol dilüsyon denemesinden elde edilen jel görüntüsü.

R+ kontrolün hücre kültüründen elde edildiğinden içeriğinin çok yoğun olması ve dokularda bu kadar yoğun ürün bulunamayacağı için, duyarlılığın artırılması gerektiğine karar verilmiştir. Bu amaçla 50 pmol/ μ l lik öncülle ve R+'ın 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} dilüsyonları ile hazırlanan PZT sonucunda elde edilen jel görüntüsü Şekil 3.3'de verilmiştir. R+ kontrolün 10^{-3} ve 10^{-4} dilüsyonlarından elde edilen PZT ürünlerinde bant gözlenmezken, 10^{-5} ve 10^{-6} ise smear'lerin olduğu gözlemlendi (Şekil 3.3).



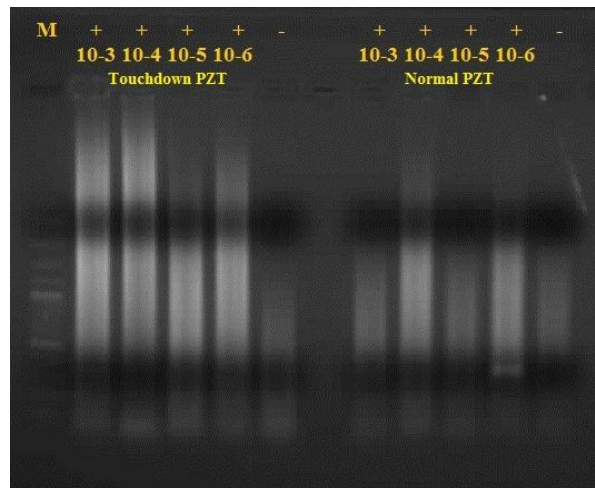
Şekil 3.3 PZT optimizasyonu-dilüsyon denemesi sonucu elde edilen jel görüntüsü.

Bir önceki denemede ortaya çıkan non-spesific bağlanmaların önlenmesi için yapılan deneme sonucunda touchdown PZT’de 10^{-5} , normal PZT’de 10^{-4} ’de bant olduğu ancak non-spesific bağlanmalarla ilgili bir düzelme olmadığı tespit edildi (Şekil 3.4).



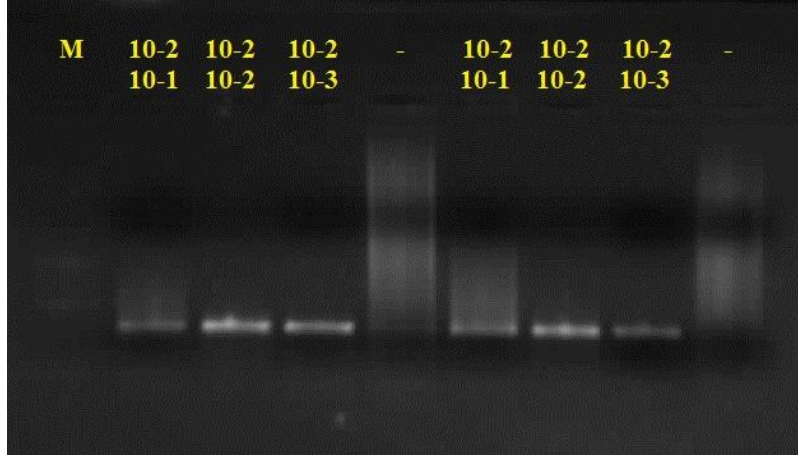
Şekil 3.4 Optimasyonu-iki farklı PZT yöntemi denemesinden elde edilen jel görüntüsü.

Bir önceki denemede 50 pmol/ μ l lik öncülle ve R+ kontrolün 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} dilasyonları ile hazırlanan PZT, sadece öncül konsatrasyonu 25 pmol/ μ l’e düşürülerek tekrarlanmıştır. Şekil 10 ‘da verilen jel görüntüsü sonucunda smear’lerin devam ettiği tespit edildi (Şekil 3.5).



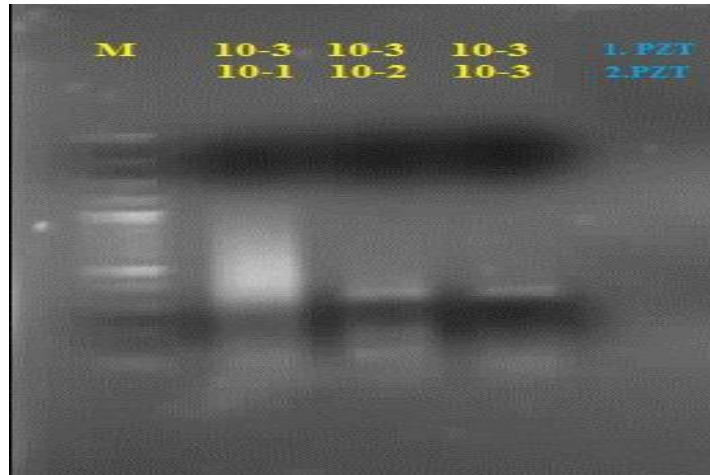
Şekil 3.5 PZT Optimasyonu-iki farklı PZT yöntemi denemesinden elde edilen jel görüntüsü.

Smear'lerin ürün fazlalığından kaynaklanmasını engellemek için daha önce yapılan denemelerde R+ kontrolün 10^{-2} dilüsyonunun kalıp olarak kullanıldığı 1. PZT ürününün 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} dilüsyonları hazırlandı. Bu dilüsyonların 2. PZT'de kalıp olarak kullanıldığı PZT'nin sonucunda tüm dilüsyonların bant verdiği gözlemlendi. Ancak 2. PZT'de kalıp olarak kullanılan 10^{-2} ve 10^{-3} dilüsyonlarının verdiği ürünlerin daha kuvvetli bantlar verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.6).



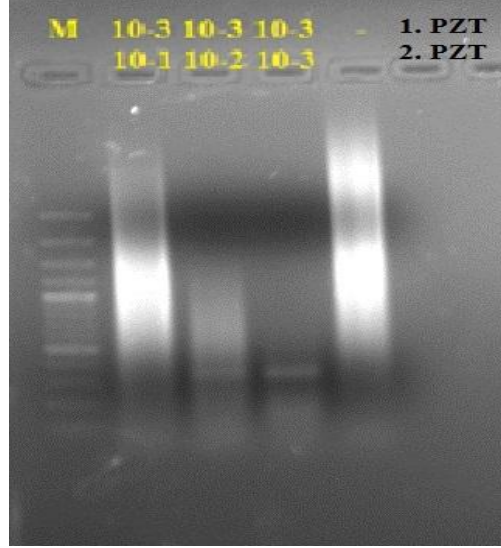
Şekil 3.6 PZT Optimizasyonu-dilüsyon denemesinden elde edilen jel görüntüsü.

Dokularındaki viral yükü düşük olan örneklerde de bant yakalanabilmesi için PZT'nin daha duyarlı hale gelmesi gerekmektedir. Bu nedenle R+ kontrolün 10^{-3} dilüsyonu ile 1. PZT yapıp, bu ürünün de 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} dilüsyolarını kullanarak 2. PZT yapılmıştır. Şekil 12'deki PZT sonucuna göre $10^{-3}/10^{-2}$ ve $10^{-3}/10^{-3}$ dilüsyonlarıyla yapılmış PZT ürünlerinin bant verdiği tespit edilmiştir. Ancak smearlerin halen devam ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.7).



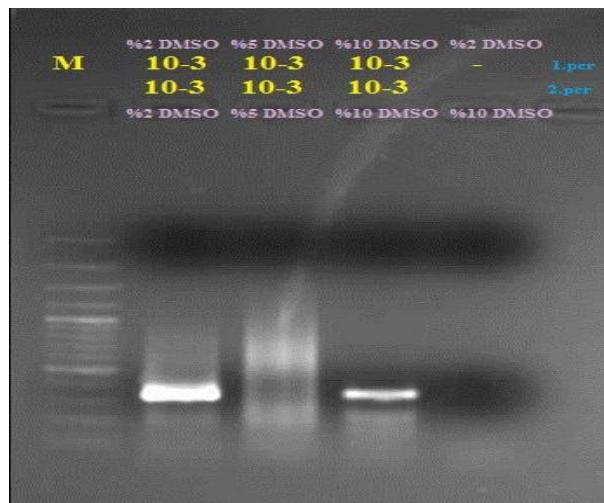
Şekil 3.7 PZT Optimizasyonu-dilüsyon denemesi jel görüntüsü.

Yapılan dilüsyon denemeleri sonucunda smearlerin devam ettiği gözlenmiştir. Non-spesifik bağlanmaların hatalı Mg^{++} konsantrasyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığını gözlemlemek için Karışım içerisindeki Mg^{++} miktarı 3 μl 'den 4 μl 'ye çıkarılarak PZT tekrarlanmıştır (Şekil 3.8).

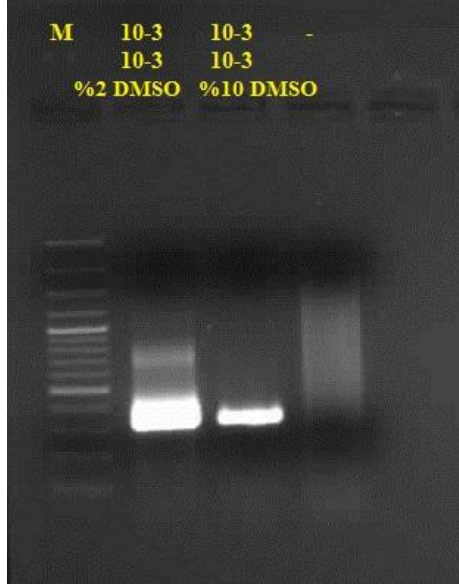


Şekil 3.8 PZT Optimizasyonu- Mg^{++} konsantrasyon denemesi jel görüntüsü.

Yapılan DMSO konsantrasyon denemeleri sonucunda non spesifik bağlanmaların oluşmadığı gözlemlendi. %2'lik ve %10'luk DMSO konsantrasyonların non-spesifik bağlanmalar üzerine iyileştirici etkisi olduğu gözlenmiştir (Şekil 14). Tekrarlığının kontrolü için %2'lik ve %10'luk DMSO konsantrasyonlarıyla PZT tekrarlanmıştır. Sonuç olarak en iyi sonucun %2'lik DMSO konsantrasyonunda alındığı gözlenmiştir (Şekil 3.9, 3.10).



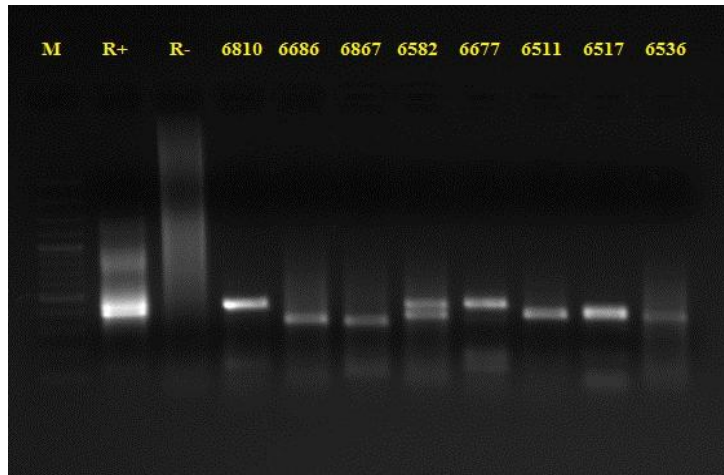
Şekil 3.9 PZT Optimizasyonu-DMSO konsantrasyon denemesi.



Şekil 3.10 PZT Optimizasyonu-DMSO konsantrasyon denemesi.

3.1.2 Örneklerin PZT Taraması Bulguları

Örneklerin beyin dokularından yapılan RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezi sonucunda yapılan PZT taraması sonuçlarına 8 lokaliteye ait toplam 8 örnekte RABV pozitifliği saptanmıştır (Şekil 3.11). Referans öncüllerle yapılan PZT taraması sonucu Şekil 3.12’de gösterilmiştir. Pozitiflik saptanan örneklerin toplandığı lokaliteler ve örneklerle ilgili bilgiler ise çizelge 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.11 Tasarladığımız öncüllerle yapılan PZT sonucunda pozitif örneklerin jel görüntüleri.



Şekil 3.12 Referans öncüllerle hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilen PZT sonucunun jel görüntüsü.

Çizelge 3.1 Pozitif çıkan örnekler ve bilgileri.

Örnek no	Tür	Lokalite
6511	<i>Apodemus</i> spp.	Filyos
6517	<i>Apodemus</i> spp.	Türkali
6536	<i>Myodes glareolus</i>	Çömlekçi
6810	<i>Myodes glareolus</i>	Filyos
6686	<i>Apodemus</i> spp.	Yukarı İhsaniye
6867	<i>Apodemus</i> spp.	Olukyanı
6582	<i>Myodes glareolus</i>	Temenler
6677	<i>Myodes glareolus</i>	Yeşilköy

Ancak bu bulguların daha ileri derecede DNA sekansı düzeyinde doğrulanması gerektiğinden, pozitif örneklerin 2. PZT ürünleri DNA sekans analizi yapılmak üzere MacroGen firmasına gönderilmiştir.



Şekil 3.13 Jelde Pozitif çıkan örneklerin yayılış yerleri.

Sekans analizinden gelen sonuçlar Bioedit programı ile düzenlendikten sonra, yine aynı programla align edilmiştir. 8 örnekten ortalama 340 bp'lık diziler elde edilmiştir. Ancak blast analizlerinde, sadece iki örneğin yayınlanmış Rabies virüslerinin dizileri ile düşük oranda benzerlik gösterdiği bulunmuştur.

3.2 POPULASYON ÇALIŞMALARI

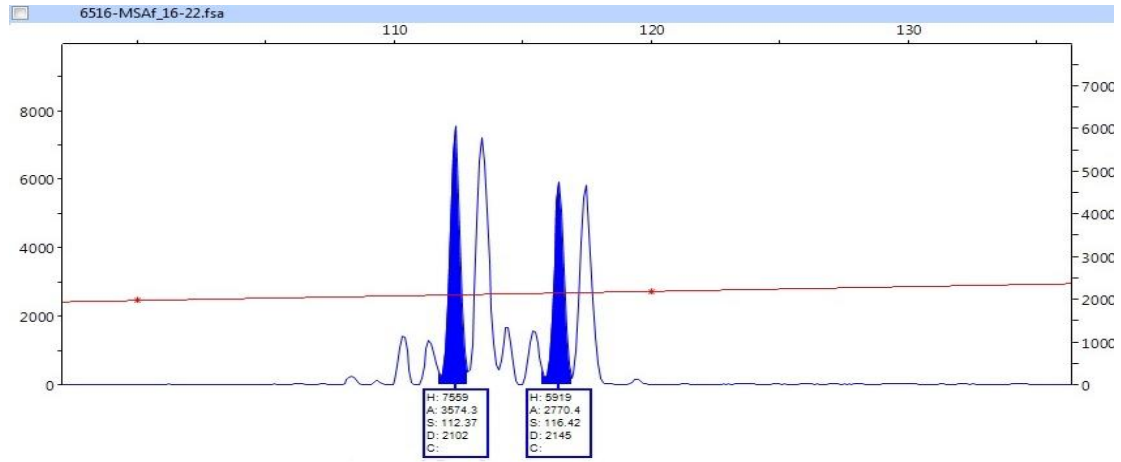
Populasyon çalışmasında, virüs çalışmasında kuduz pozitif olarak belirlenen örneklerin lokalitelerinden *Apodemus* ve *Myodes* populasyonlarına ait toplam 45 örnek ile çalışılmıştır. *Apodemus* cinsine ait 5 populasyon (Filyos, Türkali, Yeşilköy, Yukarı İhsaniye ve Olukyanı) için 4, *Myodes* cinsine ait 4 populasyon (Çömlekçi, Temenler, Yeşilköy ve Filyos) için 5 olmak üzere toplam 9 mikrosatellit lokusu ile çalışılmıştır.

3.2.1 Genotiplerin Belirlenmesi

Çalışmada 4 *Myodes* populasyonu ve 5 *Apodemus*. populasyonuna ait toplam 45 örnek kullanılmıştır. Bu örneklerin genotipleri toplam 9 mikrosatellit lokusu bakımından BM Yazılım Danışmanlık ve Laboratuvar Sistemleri Ltd. Şti. tarafından hizmet alımı şeklinde fragment analizi yapılarak belirlenmiştir. Allel büyüklükleri Peak ScannerTM Software v1.0 yazılımı kullanılarak tespit edilmiştir.

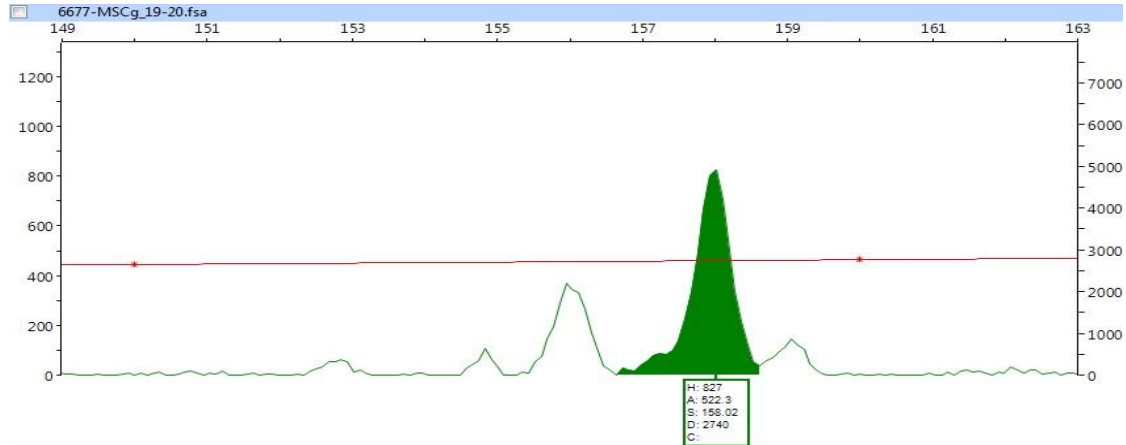
Bir lokus bakımından herhangi bir örnek incelendiğinde, örneğin mikrosatellit fragment analizi sonucu küsürlü bir sayı (örn. 112,37) olarak belirlenirse, allel büyüklüğü en yakın tam sayıya yuvarlanarak örneğin genotipi belirlenmektedir.

Apodemus populasyonlarında MSaf-16 lokusunda 114-159 bç aralığında toplam 16 allel belirlenmiştir. Bu lokus bakımından Şekil 3.14'de gösterilen fragment analizi sonucunda 112 (112,37) ve 114 (114,42) bç'lik allel bakımından iki pik noktası elde edilmiştir. Buna göre 6516 nolu örneğin MSaf-16 lokusu bakımından elde edilen genotipi heterozigot (112/114) olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.14 MSAf-16 (6-FAM, Mavi) mikrosatelit lokusu bakımından heterozigot (112/116) genotipine sahip örneğin genotipinin fragment analizi ile belirlenmesi.

Myodes populasyonlarında MSCg-20 lokusunda 136-156 bç aralığında toplam 5 allel belirlenmiştir. Bu lokus bakımından Şekil 3.15’de gösterilen fragment analizi sonucunda 158 (158.02) bç’lik allel bakımından iki pik noktası elde edilmiştir. Buna göre 6677 nolu örneğin MSCg-20 lokusu bakımından elde edilen genotipi homozigot (158/158) olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.15 MSCg-20 (VIC, Yeşil) mikrosatelit lokusu bakımından homozigot (158/158) genotipine sahip örneğin genotipinin fragment analizi ile belirlenmesi.

3.2.2 Myodes populasyonlarına ait bulgular

3.2.2.1 Populasyon içi genetik varyasyon ve heterozigotluk düzeyi

Myodes populasyonlarının lokuslara göre allel genişlikleri Çizelge 3.2 ‘de verilmiştir. Myodes populasyonları için allel genişlikleri (AG) sırasıyla MSCg-4 (117-174 bç). MSCg-9 (126-166

bç), MSCg-15 (127-141 bç), MSCg-19 (127-141 bç) ve MSCg-20 (125-160 bç)'dir. En fazla allel genişliği MSCg-4 lokusunda, en az allel genişliği ise MSCg-15 lokusunda tespit edilmiştir.

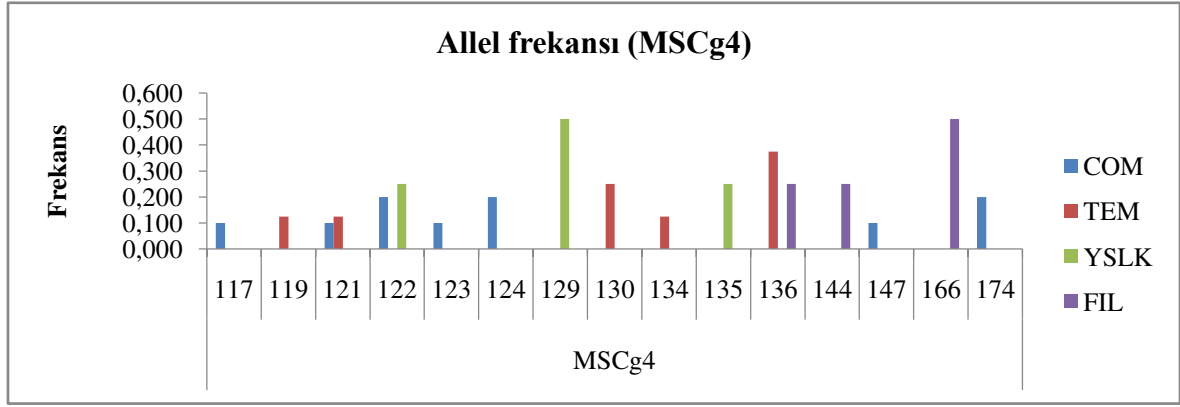
Myodes populasyonları için 5 lokusta toplam 60 allel gözlenmiştir. Allel sayıları (Na) lokuslar seviyesinde incelendiğinde en az sayıdaki allel MSCg-20 (5 adet), en fazla sayıdaki allel MSCg-4 (15 adet) lokuslarında bulunmaktadır. Tüm lokuslar bakımından ortalama allel sayısı $9,200 \pm 3,768$ olarak hesaplanmıştır.

Populasyonlarda tespit edilen lokus başına düşen allel sayıları ve ortalama allel sayılarının dağılımları, her bir lokusta gözlenen allel sayılarının populasyonlara göre dağılımları ve ortalama allel sayıları ile lokusların allel genişlikleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

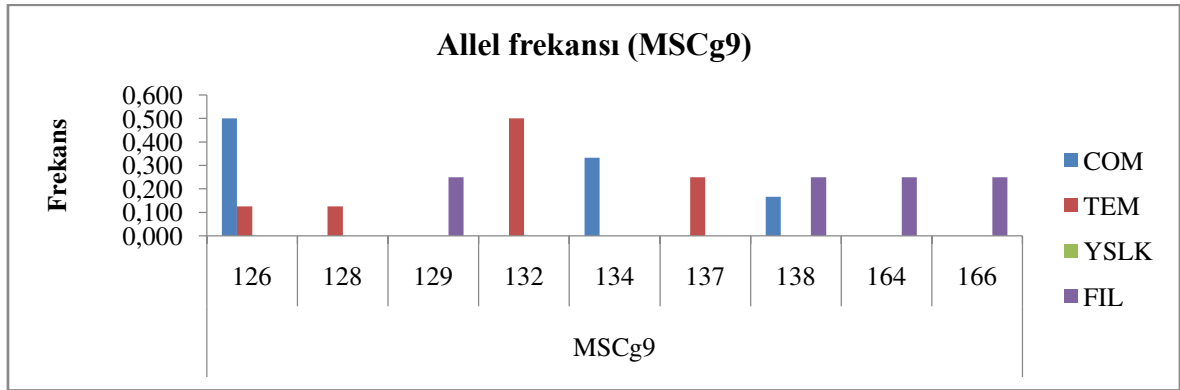
Çizelge 3.2 *Myodes* populasyonlarında allel genişlikleri, gözlenen allel sayılarının populasyon ve lokuslar açısından dağılımı, populasyon başına ve lokus başına gözlenen allel sayıları ve ortalamaları.

	AG	COM	TEM	YSLK	FIL	Toplam	Ortalama
MSCg-4	117-174	7	5	3	3	18	4,5
MSCg-9	126-166	3	4	0	4	11	2,75
MSCg-15	127-141	7	6	1	2	16	4
MSCg-19	104-149	2	4	0	3	9	2,25
MSCg-20	125-160	0	3	2	1	6	1,5
Toplam		19	22	6	13	60	
Ortalama		3,8	4,4	1,2	2,6		3

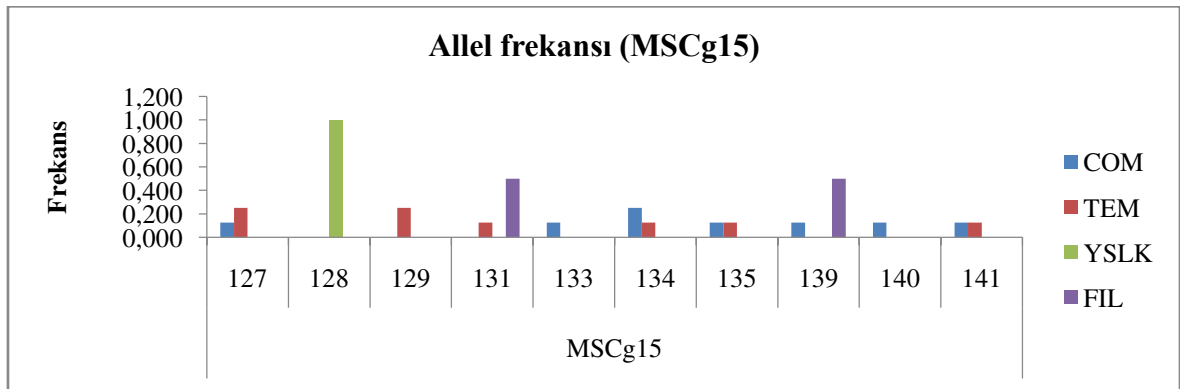
Populasyonlarda en fazla allel sayısı Çömlekçi populasyonunda (7 allel/lokus) MSCg-4 ve MSCg-15 lokuslarında gözlenmiştir. En az allel ise Yeşilköy (1 allel/lokus) ve Filyos (1 allel/lokus) populasyonlarında gözlenmiş olup, gözlendiği lokuslar MSCg-15 ve MSCg-20 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada *Myodes* populasyonları için kullanılan lokusların allel frekanslarının populasyonlara göre dağılımı Çizelge 3.3'te ve Şekil 3.17-3.21'de gösterilmiştir.



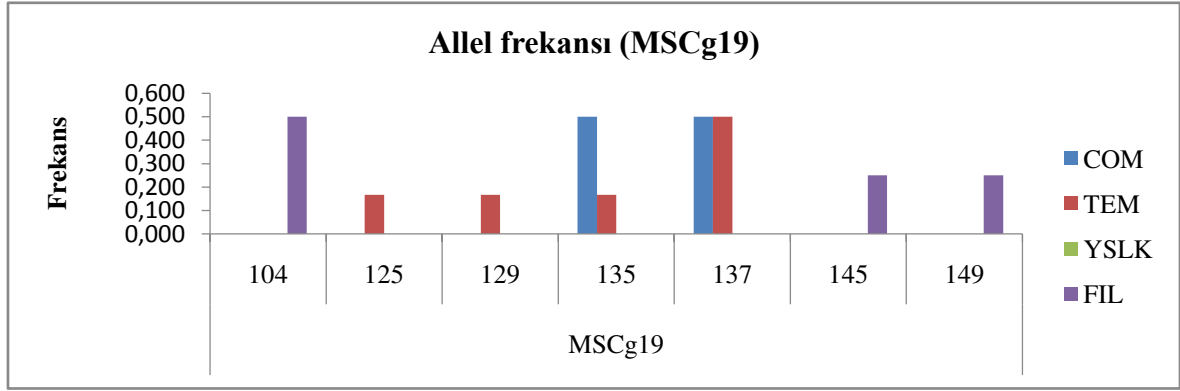
Şekil 3.17 MSCg-4 mikrosatellit lokusu açısından populasyonlar arasında allel görülme sıklıkları.



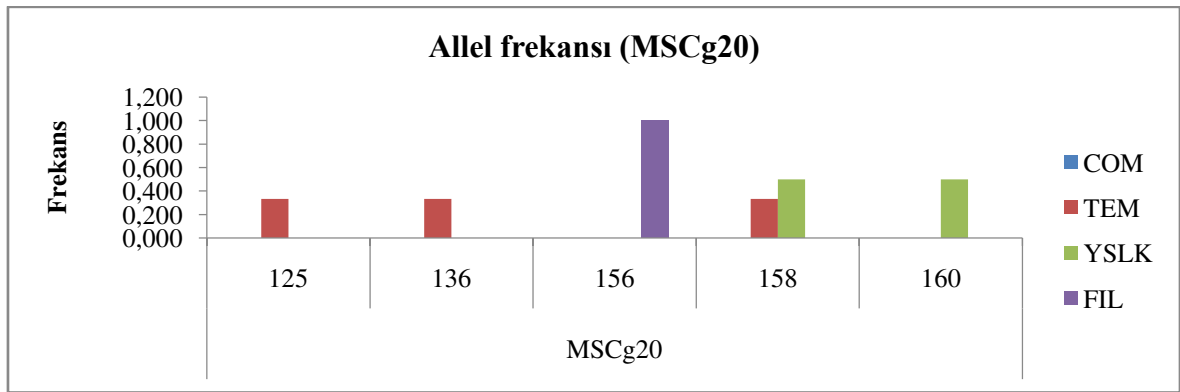
Şekil 3.18 MSCg-9 mikrosatellit lokusu açısından populasyonlar arasında allel görülme sıklıkları.



Şekil 3.19 MSCg-15 mikrosatellit lokusu açısından populasyonlar arasında allel görülme sıklıkları.



Şekil 3.20 MSCg-19 mikrosatellit lokusu açısından populasyonlar arasında allel görülme sıklıkları.



Şekil 3.21 MSCg-20 mikrosatellit lokusu açısından populasyonlar arasında allel görülme sıklıkları.

Çizelge 3.3 Tüm populasyonlardaki tespit edilen allellerin lokus ve populasyonlara göre allel frekansları.

	Allel	COM	TEM	YSLK	FIL	TOPLAM
MSCg-4	117	0,1000	-	-	-	0,0385
	119	-	0,1250	-	-	0,0385
	121	0,1000	0,1250	-	-	0,0769
	122	0,2000	-	0,2500	-	0,1154
	123	0,1000	-	-	-	0,0385
	124	0,2000	-	-	-	0,0769
	129	-	-	0,5000	-	0,0769
	130	-	0,2500	-	-	0,0769
	134	-	0,1250	-	-	0,0385
	135	-	-	0,2500	-	0,0385
	136	-	0,3750	-	0,2500	0,1538
	144	-	-	-	0,2500	0,0385
	147	0,1000	-	-	-	0,0385
	166	-	-	-	0,5000	0,0769
	174	0,2000	-	-	-	0,0769
MSCg-9	126	0,5000	0,1250	-	-	0,2222
	128	-	0,1250	-	-	0,0556

Çizelge 3.3 (devam ediyor)

	Allel	COM	TEM	YSLK	FIL	TOPLAM
MSCg-9	129	-	-	-	0,2500	0,0556
	132		0,5000	-	-	0,2222
	134	0,3333	-	-	-	0,1111
	137	-	0,2500	-	-	0,1111
	138	0,1667	-	-	0,2500	0,1111
	164	-	-	-	0,2500	0,0556
	166	-	-	-	0,2500	0,0556
MSCg-15	127	0,1250	0,2500	-	-	0,1500
	128	-	-	1,0000	-	0,1000
	129	-	0,2500	-	-	0,1000
	131	-	0,1250	-	0,5000	0,1000
	133	0,1250	-	-	-	0,5000
	134	0,2500	0,1250	-	-	0,1500
	135	0,1250	0,1250	-	-	0,1000
	139	0,1250	-	-	0,5000	0,1000
	140	0,1250	-	-	-	0,5000
	141	0,1250	0,1250	-	-	0,1000
MSCg-19	104	-	-	-	0,5000	0,1667
	125	-	0,1667	-	-	0,0833
	129	-	0,1667	-	-	0,0833
	135	0,5000	0,1667	-	-	0,1667
	137	0,5000	0,5000	-	-	0,3333
	145	-	-	-	0,2500	0,0833
	149	-	-	-	0,2500	0,0833
MSCg-20	125	-	0,3333	-	-	0,1667
	136	-	0,3333	-	-	0,1667
	156	-	-	-	1,0000	0,1667
	158	-	0,3333	0,5000	-	0,3333
	160	-	-	0,5000	-	0,1667

Myodes populasyonlarında her lokus için gözlenen (H_o) ve beklenen heterozigotluk (H_e) değerleri çizelge 3.4’te verilmiştir. Populasyonlarda gözlenen heterozigotluk değerleri 0- 1 arasında, beklenen heterozigotluk değerleri ise 0- 0,844 arasında değişim göstermektedir. En yüksek gözlenen heterozigotluk değeri 1 olup, Çömlekçi ve Filyos populasyonlarında görülmüştür. Çömlekçi populasyonu için MSCg-15 ve MSCg-19 lokusları, Filyos populasyonunda ise MSCg-9 ve MSCg-15 lokusları gözlenen heterozigotluğun en yüksek olduğu lokuslar olarak tespit edilmiştir. En düşük heterozigotluk ise 0,250 değeri ile Temenler populasyonunda gözlenmiştir. Ortalama gözlenen heterozigotluk değerleri ele alındığında en yüksek heterozigotluk değerinin 0,542 ile az sayıda allelin tespit edildiği MSCg-19 lokusunda, en düşük heterozigotluk değerinin 0,396 ile toplamda 11 allelin tespit edildiği bir diğer lokus olan MSCg-9 lokusu olduğu belirlenmiştir.

Ortalama beklenen heterozigotluk değerleri ele alındığında en yüksek beklenen heterozigotluğun 0,710 ile en çok sayıda allelin tespit edildiği MSCg-4 lokusunda, en düşük beklenen heterozigotluğun ise 0,292 ile en az sayıda allelin tespit edildiği lokus olan MSCg-20 lokusu olduğu belirlenmiştir.

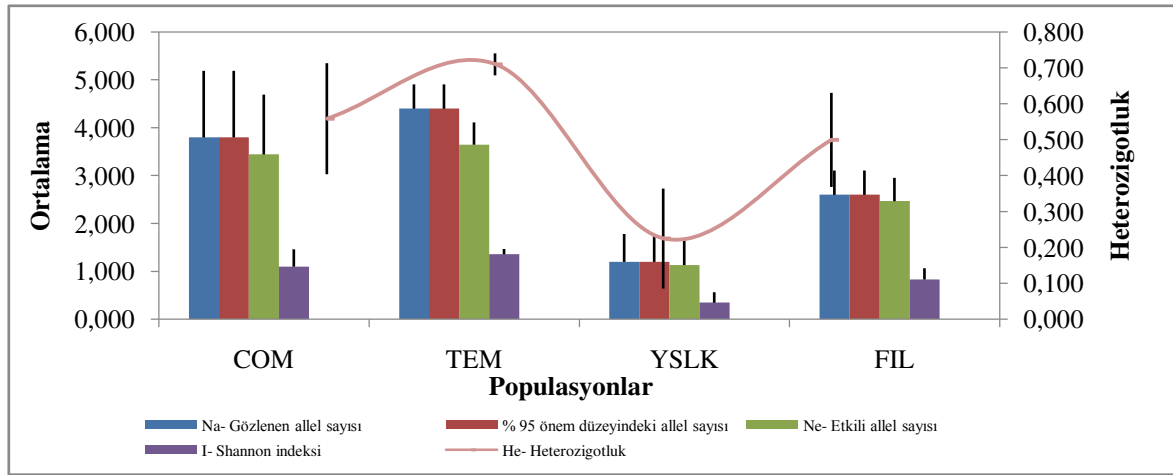
Çizelge 3.4 Populasyonlarda her bir lokus için gözlenen ve beklenen heterozigotluk değerleri.

	COM		TEM		YSLK		FIL		Ort, (Lokus)	
Lokus	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He
MSCg4	0,400	0,840	0,750	0,750	0,500	0,625	0,500	0,625	0,538	0,710
MSCg9	0,333	0,611	0,250	0,656	0,000	0,000	1,000	0,750	0,396	0,504
MSCg15	1,000	0,844	0,500	0,813	0,000	0,000	1,000	0,500	0,625	0,539
MSCg19	1,000	0,500	0,667	0,667	0,000	0,000	0,500	0,625	0,542	0,448
MSCg20	0,000	0,000	0,000	0,667	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,292
Ort, (Pop.)	0,547	0,559	0,433	0,710	0,100	0,225	0,600	0,500		

Populasyonlara ait genetik parametre ortalamaları Çizelge 3.5 ve Şekil 3.22’de verilmiştir. Genetik çeşitliliği gösteren Shannon indeksi populasyonlar arasında kıyaslandığında en fazla Temenler populasyonunda (ort. I=1,356), en az ise Yeşilköy populasyonunda (ort. I= 0,347) bulunmuştur.

Çizelge 3.5 Genetik parametre ortalamaları ve ortalamaaya ait standart hatalar.

	COM		TEM		YSLK		FIL	
	Ort.	SH	Ort.	SH	Ort.	SH	Ort.	SH
Gözlenen allel sayısı (Na)	3,800	1,393	4,400	0,510	1,200	0,583	2,600	0,510
% 95 önem düzeyindeki allel sayısı	3,800	1,393	4,400	0,510	1,200	0,583	2,600	0,510
Etkili allel sayısı (Ne)	3,444	1,251	3,648	0,466	1,133	0,533	2,467	0,490
Shannon indeksi (I)	1,099	0,364	1,356	0,114	0,347	0,219	0,832	0,235
Heterozigotluk (He)	0,559	0,155	0,710	0,031	0,225	0,139	0,500	0,131



Şekil 3.22 Populasyonlarda gözlenen genetik parametrelerin değişim grafiği.

3.2.2.2 F parametreleri

Her bir populasyon için hesaplanan Fis değerleri çizelge 3.6’da verilmiştir. Fis değerleri -1 ve +1 arasında değerler almaktadır. Fis değerinin negatif değerler alması popülasyondaki heterozigotluğun fazlalığını, pozitif değerler alması da heterozigotluğun azlığını ifade etmektedir. Fis değerinin Çömlekçi popülasyonunda MSCg-15 ve MSCg-19 lokuslarında, Filyos popülasyonunun ise MSCg-9 ve MSCg-15 lokuslarında negatif değer aldığı gözlenmiştir. Ortalama Fis Çömlekçi, Temenler, Yeşilköy, Filyos ve tüm popülasyonlar için sırasıyla -0,052, 0,401, 0,600, -0,233 ve 0,138 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.6 Populasyonların lokuslara göre hesaplanan Fis (fiksasyon indeks) değerleri.

	Fis			
Lokus	COM	TEM	YSLK	FIL
MSCg4	0,524	0,000	0,200	0,200
MSCg9	0,455	0,619	-	-0,333
MSCg15	-0,185	0,385	-	-1,000
MSCg19	-1,000	0,000	-	0,200
MSCg20	-	1,000	1,000	-
Ortalama	-0,052	0,401	0,600	-0,233
Genel Ortalama	0,138			

Tüm popülasyonlarda lokuslara göre hesaplanan Fst değerleri ve Fst değerine göre hesaplanmış olan gen akışı (Nm) değerleri çizelge 3.7’de sunulmuştur. Tüm

populasyonlardaki lokuslar için hesaplanan genetik farklılık değeri (Fst) 0,440 olarak hesaplanmıştır. Gen akışı değeri (Nm) ise bu çalışmada ortalama 0,401 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.7 Tüm lokuslardaki Nei (1987)'in F istatistikleri ve gen akışı (Nm).

Lokus	Fis	Fit	Fst	Nm*
MSCg4	0,243	0,408	0,218	0,897
MSCg9	0,215	0,572	0,455	0,299
MSCg15	-0,159	0,271	0,371	0,423
MSCg19	-0,209	0,386	0,492	0,257
MSCg20	1,000	1,000	0,662	0,127
Genel Ortalama	0,218	0,527	0,440	0,401

3.2.2.3 Hardy-Weinberg Dengesi

Çalışmadaki tüm *Myodes* populasyonlarının serbestlik derecesi (SD), Ki-kare (X²), Fis değerleri (P) ve önemlilikleri çizelge 3.8'de verilmiştir. Tüm populasyonlar ve lokuslar ele alındığında Fis değerlerinin istatistiki olarak anlamlı olmadığı ve populasyonların Hardy-Weinberg dengesinde oldukları gözlenmiştir. Çömlekçi populasyonundaki MSCg-20 lokusu, Yeşilköy populasyonundaki MSCg-9, MSCg-15 ve MSCg-19 lokusları ile Filyos populasyonundaki MSCg-20 lokusu monomorfik olduğundan bu lokusların parametreleri hesaplanamamıştır.

Çizelge 3.8 Hardy-Weinberg değerleri.

Populasyon	Lokus	SD	X ²	P	Önem
ÇÖMLEKÇİ	MSCg4	21	30,000	0,092	NS
	MSCg9	3	3,333	0,343	NS
	MSCg15	21	20,000	0,521	NS
	MSCg19	1	1,000	0,317	NS
	MSCg20	Monomorfik			
TEMENLER	MSCg4	10	8,000	0,629	NS
	MSCg9	6	12,000	0,062	NS
	MSCg15	15	20,000	0,172	NS
	MSCg19	6	6,333	0,387	NS

Çizelge 3.8 (devam ediyor)

Populasyon	Lokus	SD	X ²	P	Önem
TEMENLER	MSCg20	3	6,000	0,112	NS
YEŞİLKÖY	MSCg4	3	4,000	0,261	NS
	MSCg9	Monomorfik			
	MSCg15	Monomorfik			
	MSCg19	Monomorfik			
	MSCg20	1	2,000	0,157	NS
FİLYOS	MSCg4	3	4,000	0,261	NS
	MSCg9	6	6,000	0,423	NS
	MSCg15	1	1,000	0,317	NS
	MSCg19	3	4,000	0,261	NS
	MSCg20	Monomorfik			
ns=önemli değil * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001					

3.2.3 *Apodemus* populasyonlarına ait bulgular

3.2.3.1 Populasyon içi genetik varyasyon ve heterozigotluk düzeyi

Apodemus populasyonlarının lokuslara göre allel genişlikleri Çizelge 3.9’da verilmiştir. *Apodemus* populasyonları için allel genişlikleri (AG) ise sırasıyla MSAf-16 (104-159 bç), MSAf-22 (119-183 bç), MSAf-7 (92-168 bç), ve MSAf-8 (119-178 bç)’dir. En fazla allel genişliği MSAf-7 lokusunda, en az allel genişliği de MSAf-16 lokusunda tespit edilmiştir.

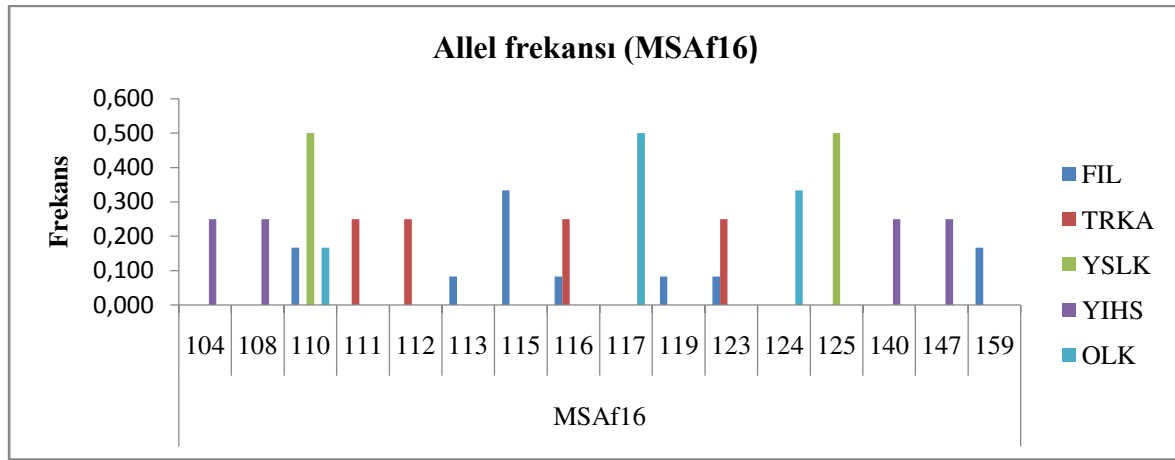
Apodemus populasyonları için 4 lokusta toplam 96 allel gözlenmiştir. *Apodemus* populasyonlarında ise en az allel MSAf-16 (16 adet) ve en fazla sayıdaki allel MSAf-7 (21 adet) lokuslarında bulunmaktadır. Tüm lokuslar bakımından ortalama allel sayısı $18,250 \pm 2,217$ olarak hesaplanmıştır.

Populasyonlarda tespit edilen lokus başına düşen allel sayıları ve ortalama allel sayılarının dağılımları, her bir lokusta gözlenen allel sayılarının populasyonlara göre dağılımları ve ortalama allel sayıları ile lokusların allel genişlikleri Çizelge 3.9’da verilmiştir.

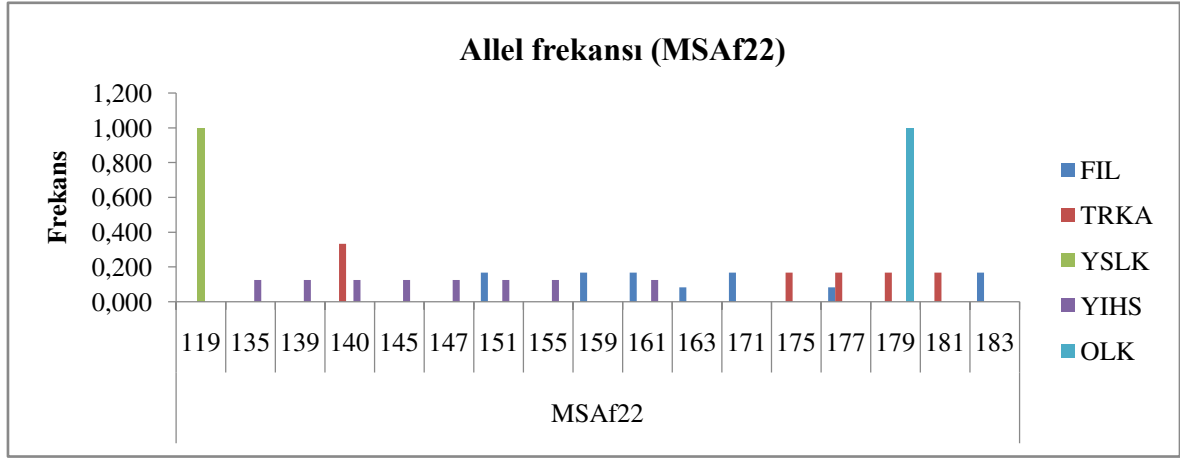
Çizelge 3.9 *Apodemus* populasyonlarında allel genişlikleri, gözlenen allel sayılarının populasyon ve lokuslar açısından dağılımı, populasyon başına ve lokus başına gözlenen allel sayıları ve ortalamaları.

	AG	FIL	TRKA	YSLK	YIHS	OLK	Toplam	Ortalama
MSAf-16	104-159	7	4	2	4	3	20	4
MSAf-22	119-183	7	5	1	8	1	22	4,4
MSAf-7	92-168	7	9	0	3	7	26	5,2
MSAf-8	119-178	8	6	1	7	6	28	5,6
Toplam		29	24	4	22	17	96	
Ortalama		7,25	6	1	5,5	4,25		4,8

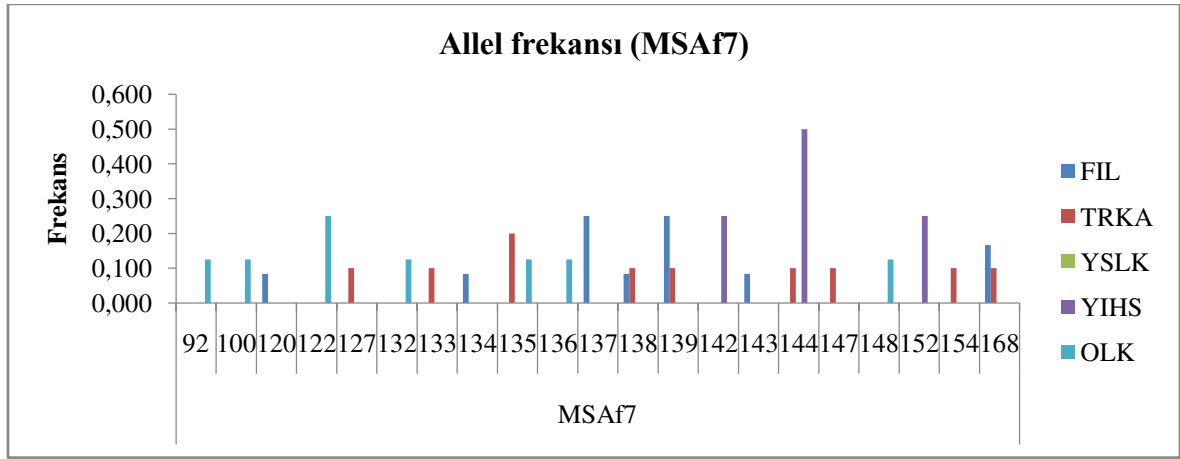
Populasyonlarda en fazla allel sayısı Türkali populasyonunda (9 allel/lokus) MSAf-7 lokusunda gözlenmiştir. En az allel ise Yeşilköy (1 allel/lokus) ve Olukyanı (1 allel/lokus) populasyonlarında gözlenmiş olup, gözlendiği lokuslar MSAf-22 ve MSAf-8 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada *Apodemus* populasyonları için kullanılan lokusların allel frekanslarının populasyonlara göre dağılımı çizelge 3.10’da ve şekil 3.23- 3.26’da gösterilmiştir.



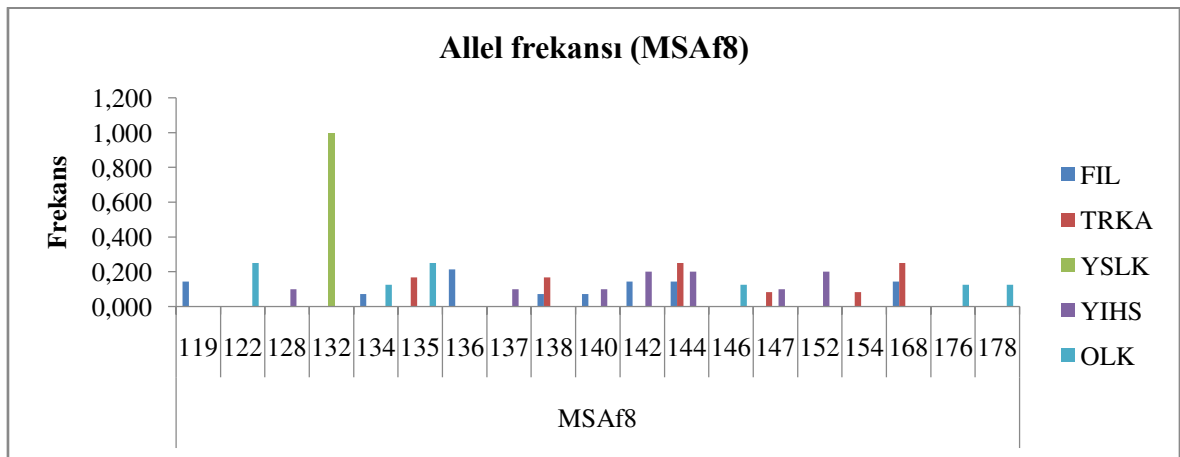
Şekil 3.23 MSAf-16 mikrosatellit lokusu açısından populasyonlar arasında allel görülme sıklıkları.



Şekil 3.24 MSAf-22 mikrosatellit lokusu açısından populasyonlar arasında allel görülme sıklıkları.



Şekil 3.25 MSAf-7 mikrosatellit lokusu açısından populasyonlar arasında allel görülme sıklıkları.



Şekil 3.26 MSAf-8 mikrosatellit lokusu açısından populasyonlar arasında allel görülme sıklıkları.

Çizelge 3.10 Tüm populasyonlardaki tespit edilen allellerin lokus ve populasyonlara göre allel frekansları.

	Allel	FIL	TRKA	YSLK	YIHS	OLK	TOPLAM
MSAF-16	104	-	-	-	0,2500	-	0,0357
	108	-	-	-	0,2500	-	0,0357
	110	0,1667	-	0,5000	-	0,1667	0,1429
	111	-	0,2500	-	-	-	0,0357
	112	-	0,2500	-	-	-	0,0357
	113	0,0833	-	-	-	-	0,0357
	115	0,3333	-	-	-	-	0,1429
	116	0,0833	0,25000	-	-	-	0,0714
	117	-	-	-	-	0,5000	0,1071
	119	0,0833	-	-	-	-	0,0357
	123	0,0833	0,2500	-	-	-	0,0714
	124	-	-	-	-	0,3333	0,0714
	125	-	-	-	-	-	0,0357
	140	-	-	-	0,2500	-	0,0357
	147	-	-	-	0,2500	-	0,0357
	159	0,1667	-	-	-	-	0,0714
MSAF-22	119	-	-	1,0000	-	-	0,0667
	135	-	-	-	0,1250	-	0,0333
	139	-	-	-	0,1250	-	0,0333
	140	-	0,3333	-	0,1250	-	0,1000
	145	-	-	-	0,1250	-	0,0333
	147	-	-	-	0,1250	-	0,0333
	151	0,1667	-	-	0,1250	-	0,1000
	155	-	-	-	0,1250	-	0,0333
	159	0,1667	-	-	-	-	0,0667
	161	0,1667	-	-	0,1250	-	0,1000
	163	0,0833	-	-	-	-	0,0333
	171	0,1667	-	-	-	-	0,0333
	175	-	0,1667	-	-	-	0,0333
	177	0,0833	0,1667	-	-	-	0,0333
	179	-	0,1667	-	-	1,0000	0,1000
	181	-	0,1667	-	-	-	0,0333
	183	0,1667	-	-	-	-	0,0667
MSAF-7	92	-	-	-	-	0,1250	0,0294
	100	0,0833	-	-	-	0,1250	0,0294
	120	-	-	-	-	-	0,0294
	122	-	-	-	-	0,250	0,0588
	127	-	0,1000	-	-	-	0,0294
	132	-	-	-	-	0,1250	0,0294

Çizelge 3.10 (devam ediyor)

	Allel	FIL	TRKA	YSLK	YİHS	OLK	TOPLAM
MSAf-7	133	0,0833	0,1000	-	-	-	0,0294
	134	-	-	-	-	-	0,0294
	135	-	0,2000	-	-	0,1250	0,0882
	136	0,2500	-	-	-	0,1250	0,0294
	137	0,0833	-	-	-	-	0,0882
	138	0,2500	0,1000	-	-	-	0,0588
	139	-	0,1000	-	-	-	0,1176
	142	0,0833	-	-	0,2500	-	0,0294
	143	-	-	-	-	-	0,0294
	144	-	0,1000	-	0,5000	-	0,0882
	147	-	0,1000	-	-	-	0,0294
	148	-	-	-	-	0,1250	0,0294
	152	-	-	-	0,2500	-	0,0294
	154	-	0,1000	-	-	-	0,0294
	168	0,1667	0,1000	-	-	-	0,0882
MSAf-8	119	0,1429	-	-	-	-	0,0435
	122	-	-	-	-	0,2500	0,0435
	128	-	-	-	0,1000	-	0,0217
	132	-	-	1,0000	-	-	0,0435
	134	0,0714	-	-	-	0,1250	0,0435
	135	-	0,1667	-	-	0,2500	0,0870
	136	0,2143	-	-	-	-	0,0652
	137	-	-	-	0,1000	-	0,0217
	138	0,0714	0,1667	-	-	-	0,0652
	140	0,0714	-	-	0,1000	-	0,0435
	142	0,1429	-	-	0,2000	-	0,0870
	144	0,1429	0,2500	-	0,2000	-	0,1522
	146	-	-	-	-	0,1250	0,0217
	147	-	0,0833	-	0,1000	-	0,0435
	152	-	-	-	0,2000	-	0,0435
	154	-	0,0833	-	-	-	0,0217
	168	0,1429	0,2500	-	-	-	0,1087
	176	-	-	-	-	0,1250	0,0217

Apodemus populasyonlarında her lokus için gözlenen (Ho) ve beklenen heterozigotluk (He) değerleri çizelge 3.11’de verilmiştir. Populasyonlarda gözlenen ve beklenen heterozigotluk değerleri 0- 1 arasında değişim göstermektedir. En yüksek gözlenen heterozigotluk değeri 1 olup, Türkali, Yeşilköy ve Yukarı İhsaniye populasyonlarında görülmüştür. Türkali ve Yeşilköy populasyonları için MSAf-16 lokusu, Yukarı İhsaniye populasyonunda ise MSAf-16

ve MSaf-22 lokusları gözlenen heterozigotluğun en yüksek olduğu lokuslar olarak tespit edilmiştir. En düşük heterozigotluk ise 0,167 değeri ile Filyos populasyonunda gözlenmiştir. Ortalama gözlenen heterozigotluk değerleri ele alındığında en yüksek heterozigotluk değerinin 0,833 ile en az sayıda allelin tespit edildiği MSaf-16 lokusunda, en düşük heterozigotluk değerinin 0,367 ile en az sayıda allelin tespit edildiği bir diğer lokus olan MSaf-22 lokusu olduğu belirlenmiştir.

Ortalama beklenen heterozigotluk değerleri ele alındığında en yüksek beklenen heterozigotluğun 0,683 ile ortalama beklenen heterozigotlukta olduğu gibi en az sayıda allelin tespit edildiği MSaf-16 lokusunda, en düşük beklenen heterozigotluğun ise 0,500 ile en az sayıda allelin tespit edildiği bir diğer lokus olan MSaf-22 lokusu olduğu belirlenmiştir.

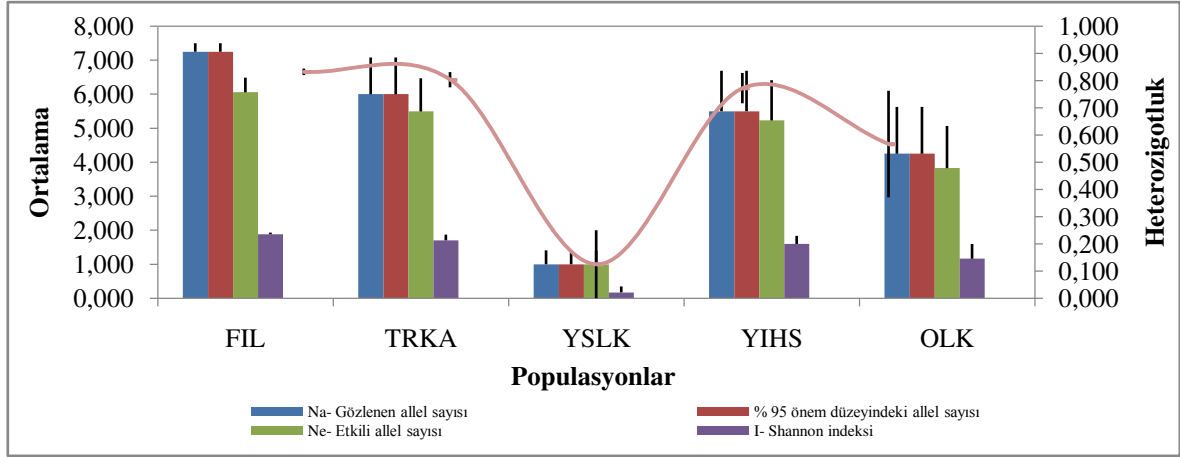
Çizelge 3.11 Populasyonlarda her bir lokus için gözlenen ve beklenen heterozigotluk değerleri.

	FIL		TRKA		YSLK		YİHS		OLK		Ort. (Lokus)	
Lokus	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He
MSAf16	0,500	0,806	1,000	0,750	1,000	0,500	1,000	0,750	0,667	0,611	0,833	0,683
MSAf22	0,167	0,847	0,667	0,778	0,000	0,000	1,000	0,875	0,000	0,000	0,367	0,500
MSAf7	0,500	0,819	0,800	0,880	0,000	0,000	0,500	0,625	0,750	0,844	0,510	0,634
MSAf8	0,286	0,857	0,500	0,806	0,000	0,000	0,800	0,840	0,500	0,813	0,417	0,663
Ort. (Pop)	0,363	0,832	0,742	0,803	0,250	0,125	0,825	0,773	0,479	0,567		

Populasyonlara ait genetik parametre ortalamaları çizelge 3.12 ve şekil 3.27’de verilmiştir. Genetik çeşitliliği gözteren Shannon indeksi populasyonlar arasında kıyaslandığında en fazla Filyos populasyonunda (ort. I=1,882), en az ise Yeşilköy populasyonunda (ort. I= 0,173) bulunmuştur.

Çizelge 3.12 Genetik parametre ortalamaları ve ortalamaaya ait standart hatalar.

	FIL		TRKA		YSLK		YİHS		OLK	
	Ort.	SH	Ort.	SH	Ort.	SH	Ort.	SH	Ort.	SH
Gözlenen allel sayısı (Na)	7,250	0,250	6,000	1,080	1,000	0,408	5,500	1,190	4,250	1,377
% 95 önem düzeyindeki allel sayısı	7,250	0,250	6,000	1,080	1,000	0,408	5,500	1,190	4,250	1,377
Etkili allel sayısı (Ne)	6,057	0,431	5,494	0,975	1,000	0,408	5,229	1,183	3,826	1,240
Shannon indeksi (I)	1,882	0,049	1,704	0,167	0,173	0,173	1,598	0,237	1,163	0,433
Heterozigotluk (He)	0,832	0,012	0,803	0,028	0,125	0,125	0,773	0,056	0,567	0,196



Şekil 3.27 Populasyonlarda gözlenen genetik parametrelerin değişim grafiği.

3.2.3.2 F parametreleri

Her bir populasyon için hesaplanan Fis değerleri çizelge 3.13'te verilmiştir. Fis değerleri -1 ve +1 arasında değerler almaktadır. Fis değerinin negatif değerler alması populasyondaki heterozigotluğun fazlalığını, pozitif değerler alması da heterozigotluğun azlığını ifade etmektedir. Fis değerinin Türkali, Yeşilköy ve Olukyanı populasyonlarının MSAf-16 lokusunda, Yukarı İhsaniye populasyonunun ise MSAf-16 ve MSAf-22 lokuslarında negatif değer aldığı gözlenmiştir. Ortalama Fis Filyos, Türkali, Yeşilköy, Yukarı İhsaniye, Olukyanı ve tüm populasyonlar için sırasıyla 0,560, 0,070, -1,000, -0,057, 0,135 ve 0,106 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.13 Populasyonların lokuslara göre hesaplanan Fis (fiksasyon indeks) değerleri.

	Fis				
Lokus	FIL	TRKA	YSLK	YIHS	OLK
MSAf16	0,379	-0,333	-1,000	-0,333	-0,091
MSAf22	0,803	0,143	-	-0,143	
MSAf7	0,390	0,091	-	0,200	0,111
MSAf8	0,667	0,379	-	0,048	0,385
Ortalama	0,560	0,070	-1,000	-0,057	0,135
Genel Ortalama	0,106				

Tüm populasyonlarda lokuslara göre hesaplanan Fst değerleri ve Fst değerine göre hesaplanmış olan gen akışı (Nm) değerleri çizelge 3.14'te sunulmuştur. Tüm

populasyonlardaki lokuslar için hesaplanan genetik farklılık değeri (Fst) 0,324olarak hesaplanmıştır. Gen akışı değeri (Nm) ise bu çalışmada ortalama 0,554 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.14 Tüm lokuslardaki Nei (1987)'in F istatistikleri ve gen akışı (Nm).

Lokus	Fis	Fit	Fst	Nm*
MSAf16	-0,220	0,092	0,255	0,729
MSAf22	0,267	0,583	0,431	0,330
MSAf7	0,195	0,467	0,338	0,490
MSAf8	0,371	0,543	0,273	0,666
Genel Ortalama	0,153	0,421	0,324	0,554

3.2.3.3 Hardy- Weinberg Dengesi

Çalışmadaki tüm *Apodemus* populasyonlarının serbestlik derecesi (SD), Ki-kare (X^2), Fis değerleri (P) ve önemlilikleri çizelge 3.15’de verilmiştir. Tüm populasyonların Fis değerleri incelendiğinde populasyonlara ait değerlerin Filyos populasyonundaki MSAf-22 ve MSAf-8 lokuslarında $p < 0,05$ ’e göre istatistiki olarak anlamlı olduğu, diğer populasyon ve lokuslarda ise önemli olmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda Türkali, Yeşilköy, Yukarı İhsaniye ve Olukyanı populasyonlarının Hardy-Weinberg dengesinde oldukları gözlenmiştir, Filyos populasyonun ise 2 lokus açısından Hardy-Weinberg dengesinden sapma olduğu görülmüştür. Yeşilköy populasyonundaki MSAf-22, MSAf-7 ve MSAf-8 lokusları ile Olukyanı populasyonundaki MSAf-22 lokusu monomorfik olduğundan bu lokusların parametreleri hesaplanamamıştır.

Çizelge 3.15 Hardy-Weinberg değerleri.

Populasyon	Lokus	SD	X2	P	Önem
FİLYOS	MSAf16	21	25,500	0,226	NS
	MSAf22	21	36,000	0,022	*
	MSAf7	21	25,333	0,233	NS
	MSAf8	28	42,778	0,037	*
TÜRKALİ	MSAf16	6	6,000	0,423	NS
	MSAf22	10	12,000	0,285	NS
	MSAf7	36	40,000	0,297	NS
	MSAf8	15	17,333	0,299	NS

Çizelge 3.15 (devam ediyor)

Populasyon	Lokus	SD	X2	P	Önem
YEŞİLKÖY	MSAf16	1	1,000	0,317	NS
	MSAf22	Monomorfik			
	MSAf7	Monomorfik			
	MSAf8	Monomorfik			
Y, İHSANİYE	MSAf16	6	6,000	0,423	NS
	MSAf22	28	28,000	0,464	NS
	MSAf7	3	4,000	0,261	NS
	MSAf8	21	30,000	0,092	NS
OLUKYANI	MSAf16	3	2,333	0,506	NS
	MSAf22	Monomorfik			
	MSAf7	21	24,000	0,293	NS
	MSAf8	15	20,000	0,172	NS
ns=önemli değil * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001					

BÖLÜM 4

TARTIŞMA

4.1 VİRÜS ÇALIŞMALARI

Çalışma için Zonguldak Çaycuma bölgesi seçilmiştir. Zonguldak Sağlık İl Müdürlüğü'ndeki hayvan kuduz olgularının bildirildiği lokalite kayıtları incelendiğinde bu bölgede her yıl kuduz olguları bildirildiği görülmektedir.

Kuduz, 5000 yıllık tarihsel geçmişi olan bir hastalıktır (Fu 1997, Lackay et al. 2008). Antartika kıtası hariç tüm kıtalarda görülen kuduz (Jackson and Wunner 2002, Sterner and Smith 2006), önemli bilimsel gelişmelere rağmen hala küresel bir hastalık olarak varlığını sürdürmektedir (Meslin et al. 1993). Gelişmiş ülkelerde, kuduz çoğunlukla yabani hayvanlarda görülen ve bu konaklardan evcil hayvanlara ve insanlara bulaşan bir hastalıktır (Meslin et al. 1993, Kilic et al. 2006).

Türkiye'de insan kuduzu ve kuduz şüpheli hayvan ısırıkları hala önemli bir sağlık sorunudur (Kilic et al. 2006) ve bu olguların yoğun olarak görüldüğü yerlerde karantina bölgeleri oluşturulmaktadır. Zonguldak ilinin Çaycuma ilçesinde sıklıkla kuduz vakaları görülmektedir. Zonguldak Sağlık İl Müdürlüğü verilerine göre bu bölgede hayvan kaynaklı kuduzdan birçok köy karantina altına alınmaktadır ve karantina altına alınan bölgede kuduz kaynağı olarak kurt, çakal gibi karnivorlar verilmektedir. Çalışma alanına baktığımız zaman yerleşim alanlarının parçalı olmasından dolayı alandaki karnivorların yayılışları parçalıdır ve tüm alana yayılmaları belirsiz olacaktır. Bu açıdan bakıldığında da kemiricilerin kuduz virüsünü yayacak bir kaynak olma olasılığı yüksektir.

Kuduzun tek bir konağı olmamakla birlikte, virüs türler arası etkileşimle enfekte hayvandan diğerine hızlı bir şekilde yayılmaktadır. Ayrıca konaklarının birbirleriyle etkileşim halinde olmaları nedeniyle de kuduz hayvanların diyetlerindeki canlıların da incelenmesi

gerekmektedir. Kuduzun görüldüğü karnivorların diyetlerinde rodentler önemli bir ekolojik niş üstlenmişlerdir(Mukherjee et al. 2004). Ekolojik nişleri nedeniyle rodentler de kuduz varlığının incelenmesinde ilk sırada yer almaktadır.

Lei ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada *Apodemus agrarius* örneklerinde kuduz virusünün varlığını göstermiştir ve insan kuduzunda rol oynayabileceklerini vurgulamıştır (Lei et al. 2009). Winkler 1953-1970 yılları arasında kuduz olan rodent örneklerinin tanımlandığını ve Amerika Birleşik Devletlerindeki 50 eyaletten 31'inde diğer türlerdeki kadar yaygın rodent kuduzu vakalarına rastlandığını belirtmiş, ayrıca sadece rodent kuduzunun tanımlandığı bölge olmadığından, diğer türlerde kuduz vakalarının görüldüğü yerlerde rodent kuduzuna rastlandığından bahsetmiştir (Winkler et al. 1972). Bu çalışmada 242 örnekten 8 örnekte pozitif bant elde edilmiş ancak sekans sonuçları incelendiğinde bu sekiz örnekten sadece ikisinin sekans dizilerinde kuduz virüsü ile 23 bp'lik bir benzerlik bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda çalışma alanındaki kemiricilerin kuduzu taşıma ihtimali olduğu ifade edilebilir.

Nel ve Markotter, kemiricilerin kuduz virüsü taşıyıcısı olarak düşünülebileceğini belirtmiştir. Ancak Ortadoğu'da kemiriciler arasında sadece sincapgillerin taşıyıcı olduğunu listelerinde göstermiştir (Nel and Markotter 2007). Mukherjee ve arkadaşları, kemiricilerin karnivorların ve kedigillerin besinlerinin önemli bir miktarını oluşturduklarını söylemişlerdir (Mukherjee et al. 2004). Bu çalışmada alanındaki karnivorların önemli besinleri olan iki fare türü için önemli bir örnekleme ile yapılmıştır. Dolayısıyla çalışma, yakalanan örneklerde pozitif şüpheli bantların çıkması kemiricileri tekrar mücadele kapsamına almak ve potansiyel kaynak olarak şüphelenmek için önemli deliller sunmuştur.

Ayrıca kemiriciler alanda bulunan diğer fauna elemanlarına göre daha hızlı üreyip, daha hızlı ve kolay bir şekilde insan ve diğer evcil hayvanlarla temas edebilirler. Çalışma alanı sıklıkla kuduz vakalarının görülmesinden dolayı karantina altına alındığından olası sorumlu kaynakların kemiriciler gibi kontrol edilmeyen bir grubun olması yüksek olasılıktır.

Ülkemizde kuduza yakalanma ihtimali olan hayvan türleri kurt, tilki, çakal, yaban kedisi, kocarca, gelincik, köpek, kedi, sığır, koyun, keçi ve atıdır. Sağlık Bakanlığı'nın 2005 yılında yayınlanan kuduz korunma ve kontrol yönergesi gereği kuduza yakalanma ihtimali olan türlerden herhangi birinin teması sonucu aşılama uygulanmaktadır. Ancak yönergede

bildirildiği üzere “fare gibi diğer küçük kemiriciler tarafından ısırılan ve teması olanlara” herhangi bir aşılama yapılmamaktadır (URL-8 2013). Lei ve arkadaşları Çin’in Zhejiang bölgesinden toplanan 57 *Apodemus agrarius* örneğinden 1 tanesinde kuduz pozitifliğine rastlandığını belirtmiştir (Lei et al. 2009). Ayrıca Özsoy ve arkadaşlarının belirttiğine göre 2000 yılı içerisinde şüpheli hayvan ısırığıyla Refik Saydam Hıfzı Sıhha Merkezi Kuduz Aşı istasyonuna gelen hastalardan 92 (% 6)’si fare ısırığı nedeniyle bu birime başvurmuştur (Özsoy et al. 2002). Kemirici türleri insanlarla ve diğer kuduza yakalanma riski olan türlerle etkileşim halinde olan türler oldukları için, bu çalışmadaki jel sonuçlarına göre pozitif bantların elde edilmesi fareleri kuduz vakalarının görüldüğü alanlarda tekrar mücadele edilecek hayvan grubu içine sokulması, en azından karantina alanlarında kemirici yoğunluğu kontrol edilmesini ve insanla temasının mücadele boyunca en aza indirilmesinin gerekmektedir.

Ayrıca pozitif örnekler 15 farklı lokalitenin 7 tanesinden elde edilmiştir. Aslında bu daha önceki farklı türlerden yapılan çalışmalara göre oran yüksektir. Bazı lokaliteler için bu oran 12’de 1’dir. Buradan da kemiricilerin için kuduz virüsüne konak olarak rol üstlendiklerini iddia edebiliriz.

Yaptığımız çalışma Zonguldak ili Çaycuma bölgesindeki kemiricilerde kuduz virüsü varlığını araştırmak üzerine kurulmuştur. Çalışma ile Türkiye’de kuduz için eksik bir konak bilgisi hakkında veriler elde etmek adına, kuduz virüsünün kemiriciler üzerinde taranması ilk defa detaylı olarak yapılmıştır.

Dizayn edilen ve spesifikliğı yüksek öncüller kontrol grubunda çalışmış ve devamında tüm örnekler kontrol edildiğinde 8 örnekte pozitif bantlar bulunmuştur. Ancak dizi analizinde doğrulanamasa da kemiricilerdeki kuduz varlığı büyük oranda delillendirilmiştir.

Sonuç olarak; bu çalışmada yapılan PZT taraması ile kemiricilere ait pozitif bantlar bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar sekans analizi ile doğrulanamasa da kemiricilerin kuduz vektörü olma şüphesini ortaya çıkarmıştır. Çalışma sonuçlarının doğrulanması için aynı bölgede o bölgede yayılış gösteren farklı kemirici türlerinin de eklenerek, örneklerin serolojik açıdan da taranması gereklidir.

Sonuçların serolojik tarama sonucunda da pozitif çıkması durumunda Sağlık Bakanlığı'nın yönergesine kemirici temaslarında aşılama yapılması hususunda maddenin eklenmesi sağlanacaktır.

4.2 POPULASYON ÇALIŞMALARI

Populasyonların genetik yapıları çevresel bariyerler, tarihsel süreçler ve yaşam öyküleri gibi etkenler tarafından şekillenebilir. Genetik yapı bireylerin kendi aralarındaki genetik kompozisyonun önemli bir sonucu olan populasyondaki bireyler arasındaki allel etkileşimini yansıtmaktadır. Gen akışını ve etkilerini anlamak populasyon genetiği, populasyon ekolojisi, koruma biyolojisi ve epidemiyoloji gibi birçok araştırma alanının merkezinde bulunmaktadır. Bu sayede populasyonların yapısı hakkında önemli bilgiler elde edilmektedir (Balloux and Lugon-Moulin 2002).

Moleküler tekniklerin gelişmesi populasyon içi ve populasyonlar arası genetik çeşitliliğin belirlenmesi gibi populasyonların yapısı hakkındaki detaylı bilgiler elde etmemize imkan sağlamıştır (Hillis et al. 1996). Bu bağlamda genetik belirteçler kullanılarak yapılan karakterizasyon çalışmaları da günden güne atmaktadır.

Günümüzde en çok tercih edilen genetik marker mikrosatellit adı verilen 1-6 bp uzunluğundaki basit dizi tekrarları (SSRs) veya kısa tandem tekrarları (STRs) olarak bilinen DNA parçalarıdır (Powell et al. 1996). Mikrosatellitler ko-dominant olmaları, yüksek polimorfizm göstermeleri, hızla mutasyona uğramaları ve akraba türler arasında korunmuş olarak bulunmalarından dolayı filocoğrafya ve populasyon genetiği çalışmalarında oldukça yaygın olarak kullanılırlar (Zhang and Hewitt 2003).

Bu çalışmada virüs çalışmaları sırasında pozitif bant veren örneklerin lokalitelerinden belirlenen 4 *Myodes* populasyonu ve 5 *Apodemus* populasyonuna ait toplam 45 kemirici örneğinin toplam 9 mikrosatellit kullanılarak populasyon içi ve populasyonlar arası genetik çeşitliliği araştırılmıştır.

4.2.1 *Myodes* populasyonları

Yapılan çalışmada kullanılan lokuslar Gockel ve arkadaşlarının önerdiği polimorfik lokuslar olup (Gockel et al. 1997) *Myodes* populasyonları için toplam 60 allel tespit edilmiştir.

Myodes populasyonlarında lokus başına düşen ortalama allel sayısının 3 olduğu belirlenmiş ve toplamda en fazla allelin MSCg-4 lokusunda, en az allelin ise MSCg-20 lokusunda olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada Gockel et al. (1997)'nin çalışmasındaki aynı lokuslar ile çalışılmıştır. Buna rağmen çalışmada tespit edilen allel sayılarının Gockel et al (1997)'nin çalışmasındaki sonuçlardan farklı olduğu gözlenmiştir. MSCg-4 ve MSCg-15 lokuslarındaki allel sayılarının beklenenden fazla, MSCg-9, MSCg-19 ve MSCg-20 lokuslarında ise beklenenden az olduğu tespit edilmiştir.

Populasyonlarda lokuslar seviyesinde görülen heterozigotluk değerleri incelendiğinde gözlenen heterozigotluk değerinin (H_o) 0,000 ile 0,625 arasında, beklenen heterozigotluğun (H_e) ise 0,292 ile 0,710 arasında değiştiği belirlenmiştir. Bu veriler diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında (Gockel et al. 1997, Barker et al. 2005, Gileva et al. 2008, Rikalainen et al. 2008) bu çalışmadaki heterozigotluk düzeylerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum bu çalışmada kullanılan örnek sayısının azlığından kaynaklanmaktadır.

Populasyonlar için hesaplanmış olan Fis değerleri -0,233 ile 0,600 arasında değişim göstermektedir. Fis değeri +1 ile -1 arasında değer almaktadır. Pozitif olduğu durum heterozigot azlığını, negatif olduğu durum ise heterozigot fazlalığını ifade etmektedir. Çömlekçi ve Filyos populasyonları sırasıyla -0,052 ve -0,233 Fis değerlerini almıştır. Bu değerler populasyonların her birinde heterozigotluğun yüksektir. Bu populasyonlarda saf yetiştirmeden uzaklaşmıştır.

Çalışmada populasyonlarda Hardy-Weinberg dengesinden sapma olup olmadığı test edilmiş ve sonuçlar Çizelge 3.8'de gösterilmiştir. Sonuçlar *Myodes* populasyonlarında F değerlerinin istatistiki olarak anlamlı olmadıklarını yani Hardy-Weinberg dengesinde olduklarını göstermiştir.

4.2.2 *Apodemus* populasyonları

Yapılan çalışmada *Apodemus* populasyonları için toplam 96 allel tespit edilmiştir.

Apodemus populasyonlarında lokus başına düşen ortalama allel sayısının 4,8 olduğu belirlenmiş ve toplamda en fazla allelin MS Af-8 lokusunda, en az allelin ise MS Af-16 lokusunda olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada Gockel et al. (1997)'nin çalışmasındaki aynı lokuslar ile çalışılmıştır. Çalışmada tespit edilen allel sayılarının Gockel et al. (1997)'nin çalışmasındaki lokuslarda görülen allel sayılarından fazla olduğu gözlenmiştir.

Populasyonlarda lokuslar seviyesinde görülen heterozigotluk değerleri incelendiğinde gözlenen heterozigotluk değerinin (H_o) 0,367 ile 0,833 arasında, beklenen heterozigotluğun (H_e) ise 0,500 ile 0,683 arasında değiştiği belirlenmiştir. Tüm populasyondaki H_o ve H_e değerleri karşılaştırıldığında MS Af-16 lokusundaki gözlenen heterozigotluk değeri beklenen heterozigotluktan diğer dört populasyonun aksine yüksek çıkmıştır. Bu veriler diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında (Gockel et al. 1997, Ornishi et al. 1998, Harr et al. 2000) bu çalışmadaki heterozigotluk düzeylerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum bu çalışmada kullanılan örnek sayısının azlığından kaynaklanmaktadır.

Populasyonlar için hesaplanmış olan Fis değerleri -1 ile 0,056 arasında değişim göstermektedir. Yeşilköy ve Yukarı İhsaniye populasyonları sırasıyla -1 ve -0,057 Fis değerlerini almıştır. Bu populasyonlarda saf yetiştirmeden uzaklaşmıştır.

Çalışmada populasyonlarda Hardy-Weinberg dengesinden sapma olup olmadığı test edilmiş ve sonuçlar Çizelge 3.15'de gösterilmiştir. Sonuçlar *Apodemus* populasyonlarında F değerlerinin filyos populasyonundaki MS Af-22 ve MS Af-8 lokuslarında $p < 0,05$ 'e göre istatistiki olarak anlamlı olduğunu, diğer populasyonların F değerlerinin istatistiki olarak anlamlı olmadıklarını yani Hardy-Weinberg dengesinde olduklarını göstermiştir. Filyos populasyonunda ise 2 lokus açısından Hardy-Weinberg dengesinden sapma görülmüştür.

Populasyon çalışmaları ve virüs çalışmalarının sonuçları birlikte değerlendirildiğinde populasyonlardaki heterozigotluğun yani genetik çeşitliliğin yüksek çıkması populasyonlarda az bireyde virüs bulunmasına neden olmuş olabilir. Ayrıca populasyonlardaki heterozigotluğun

yüksek olmasına rağmen populasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olması mikrosatellit çalışmalarının daha fazla örnekleme ile tekrar edilmesi gerektiğini göstermiştir.

Kemiriciler dünyanın her yerinde yayılış göstermekte ve insan populasyonları ile yakın temas içerisinde yaşamaktadırlar. Ayrıca yaban hayatı ve insanların arasında bağ kurarak zoonozların taşınmasında rol oynarlar (Meerburg et al. 2009). Literatür incelendiğinde kemiricilerin taşıdıkları birçok hastalık bulunmasına rağmen bu hastalıklar arasında kuduzun bahsedildiği çok az çalışmanın olduğu görülmektedir. Bu çalışmaların bazılarında pozitif bulgulara rastlanılmış olması ise kemiricilerin kuduz taşıması hakkındaki çelişkileri devam ettirmektedir. Türkiye kemiricileri ile bu konuda yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile Türkiye kemiricilerinde ilk defa kuduz taraması ile ilgili veriler elde edildiği için çalışma orjinaldir.

Evrimsel açıdan türlerin farklılaşmasını ve bir türün bireyleri arasında farklılık oluşmasını genetik çeşitlilik sağlamaktadır (Ekmekçi et al. 2008). Çevresel değişikliklere tepki olarak gelişen populasyonlarda heterozigotluk seviyesi yükselmektedir yani genetik çeşitlilik artmaktadır (Reed and Frankham 2003). Ancak çeşitli nedenlerle populasyonlardaki genetik çeşitliliğin azalması populasyonların uyumunun azalmasına neden olmaktadır. Çok az genetik çeşitliliğe sahip populasyonlar büyük risk altındadırlar. Genetik çeşitliliğin azalması ile populasyonların belirli hastalıklara karşı zayıflığı artabilmektedir. Bu durum tam olarak kanıtlanamamış olmakla beraber Spielman ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada populasyon içerisindeki genetik çeşitliliğin azalması ile hastalıklara karşı direncin azalması arasında pozitif korelasyonun olduğu belirlenmiştir (Spielman et al. 2004).

Bu çalışma ile *Apodemus* spp. ve *Myodes* türlerinde kuduz taraması yapılarak Türkiye’de kemirici kuduzuyla ilgili literatürdeki açığın kapatılması için temel oluşturulmuş, kemirici populasyonlarının genetik çeşitliliği ve elde edilen populasyonlardaki kuduz hastalığının görülmesi arasındaki korelasyonun olabileceğine dair ipuçları elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Abacioğlu H** (2008) Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji.
- Anderson L J, Nicholson K G, Tauxe R V and Winkler W G** (1984) Human Rabies in the United States, 1960 to 1979: Epidemiology, Diagnosis, and Prevention. *Ann. Intern. Med.*, 100 (5): 728-735.
- Bąkowski C and Kozakiewicz M** (1988) The effect of forest road on bank vole and yellow-necked mouse populations. *Acta Theriol*, 33: 345-353.
- Balloux F and Lugon-Moulin N** (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol*, 11 (2): 155-165.
- Barker F, Helyar S, Kemp S and Begon M** (2005) Highly polymorphic microsatellite loci in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Mol Ecol Notes*, 5 (2): 311-313.
- Benmansour A, Leblois H, Coulon P, Tuffereau C, Gaudin Y, Flamand A and Lafay F** (1991) Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J. Virol.*, 65 (8): 4198-4203.
- Berthier K, Galan M, Foltête J C, Charbonnel N and Cosson J F** (2005) Genetic structure of the cyclic fossorial water vole (*Arvicola terrestris*): landscape and demographic influences. *Mol Ecol*, 14 (9): 2861-2871.
- Botstein D, White R L, Skolnick M and Davis R W** (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32 (3): 314.
- Buckle A P and Smith R H** (1994) Rodent pests and their control. CAB international, Wallingford, 403 p.
- Bunschoten H, Gore M, Ivo J T M, Uytdehaag F G, Dietzschold B, Wunner W H and Osterhaus A D** (1989) Characterization of a new virus-neutralizing epitope that denotes a sequential determinant on the rabies virus glycoprotein. *J Gen Virol*, 70 (2): 291-298.
- Buzgan T, Irmak H, Yılmaz G, Torunoğlu M A and Safran A** (2009) Epidemiology of human rabies in Turkey: 1992-2007. *Turk J Med Sci*, 39 (4): 591-597.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Calhoun S W and Greenbaum I F** (1991) Evolutionary implications of genic variation among insular populations of *Peromyscus maniculatus* and *Peromyscus oreas*. *J Mammal*, 248-262.
- Ceyhun S B** (2007) Yerli alabalıklar (*Salmo trutta* sp. L.) arasındaki genetiksel varyasyonun mikrosatelit markırlar kullanılarak belirlenmesi. Doktora tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 95 s.
- Chenik M, Chebli K and Blondel D** (1995) Translation initiation at alternate in-frame AUG codons in the rabies virus phosphoprotein mRNA is mediated by a ribosomal leaky scanning mechanism. *J. Virol.*, 69 (2): 707-712.
- Chenik M, Chebli K, Gaudin Y and Blondel D** (1994) In vivo interaction of rabies virus phosphoprotein (P) and nucleoprotein (N): existence of two N-binding sites on P protein. *j gen virol*, 75: 2889-2896.
- Chenik M, Schnell M, Conzelmann K and Blondel D** (1998) Mapping the interacting domains between the rabies virus polymerase and phosphoprotein. *J. Virol.*, 72 (3): 1925-1930.
- Chepko-Sade B D and Halpin Z T** (1987) Mammalian dispersal patterns: the effects of social structure on population genetics. 1st ed., University of Chicago Press, 360 p..
- Chomczynski P and Sacchi N** (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.*, 1 (2): 581-585.
- Çoğal M** (2011) Zonguldak İli Kemirici Türlerinin Ve Yayılışlarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, *B. E. Ü. Fenbilimleri enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı*, Zonguldak, 139 s.
- Çolak E and Kıvanç E** (1991) Distribution and taxonomic status of genus *Clethrionomys* Tiselius, 1850 (Mammalia: Rodentia) in North Anatolia. *Commun. Fac. Univ. Ank. Series. CV*, 9: 1-16.
- Dallas J, Dod B, Bourso P, Prager E and Bonhomme F** (1995) Population subdivision and gene flow in Danish house mice. *Mol Ecol*, 4 (3): 311-320.
- Dallas J F** (1992) Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mamm Genome*, 3 (8): 452-456.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Davies M, Englert M E, Sharpless G and Cabasso V** (1963) The electron microscopy of rabies virus in cultures of chicken embryo tissues. *Virology*, 21 (4): 642-651.
- Devos K and Gale M D** (1992) The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor Appl Genet*, 84 (5-6): 567-572.
- Dietzschold B, Gore M, Marchadier D, Niu H, Bunschoten H, Otvos L, Wunner W, Ertl H, Osterhaus A and Koprowski H** (1990) Structural and immunological characterization of a linear virus-neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine. *J. Virol.*, 64 (8): 3804-3809.
- Dietzschold B, Wunner W H, Wiktor T J, Lopes A D, Lafon M, Smith C L and Koprowski H** (1983) Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *P Natl Acad Sci*, 80 (1): 70-74.
- Dricu A** (2012) Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment. Intech, Croatia, 310 p.
- Dunham R A** (2004) Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches. CABI, Auburn, 372 p.
- Ekmekçi A, Konaç E and Önen H İ** (2008) Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık. *GEN*, 21 (3): 282-295.
- Ertl H, Dietzschold B, Gore M, Otvos L, Larson J, Wunner W and Koprowski H** (1989) Induction of rabies virus-specific T-helper cells by synthetic peptides that carry dominant T-helper cell epitopes of the viral ribonucleoprotein. *J. Virol.*, 63 (7): 2885-2892.
- Excoffier L, Laval G and Schneider S** (2006) Arlequin ver 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. User manual. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), Institute of Zoology, University of Berne, Switzerland.
- Fauquet C M, Mayo A, Maniloff J, Desselberger U and Ball L A** (2005) Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Science, 1162.
- Freeland J R, Petersen S D and Kirk H** (2011) Molecular Ecology. Wiley, 464 p.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Fu Z F** (1997) Rabies and rabies research: past, present and future. *Vaccine*, 15 S20-S24.
- Fu Z F** (2005) The World of Rhabdoviruses. Springer, Berlin, 208 p.
- Gaines M S and McClenaghan Jr L R** (1980) Dispersal in small mammals. *Annu Rev Ecol Syst*, pp. 163-196.
- Gastka M, Horvath J and Lentz T L** (1996) Rabies virus binding to the nicotinic acetylcholine receptor α subunit demonstrated by virus overlay protein binding assay. *J Gen Virol*, 77 (10): 2437-2440.
- Gaudin Y, Ruigrok R W H, Tuffereau C, Knossow M and Flamand A** (1992) Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology*, 187 (2): 627-632.
- Gileva E, Rakitin S, Fokin M, Abramson N and Mukhacheva S** (2008) Microsatellite DNA variation in Ural bank vole populations. *Russ J Ecol*, 39 (7): 544-547.
- Gillet E M** (1999) Which DNA Marker for Which Purpose? , Hamburg, 362 p.
- Gliwicz J** (1992) Animal Dispersal: Patterns of dispersal in non-cyclic populations of small rodents. Springer, pp 147-159.
- Gliwicz J** (1988) The role of dispersal in models of small rodent population dynamics. *Oikos*, 219-221.
- Gockel J, Harr B, Schlötterer C, Arnold W, Gerlach G and Tautz D** (1997) Isolation and characterization of microsatellite loci from *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Muridae) and *Clethrionomys glareolus* (Rodentia, Cricetidae). *Mol Ecol*, 6 (6): 597-599.
- Goldstein D B, Linares A R, Cavalli-Sforza L L and Feldman M W** (1995) An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, 139 (1): 463-471.
- Gönen İ** (2010) Türkiye'deki Hekimlerin Kuduz Hastalığıyla İlgili Bilgi Ve Tutumlarının Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, *Sağlık Bilimleri Enstitüsü Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Anabilim Dalı*, İstanbul, 115 s.
- Goto H, Minamoto N, Ito H, Ito N, Sugiyama M, Kinjo T and Kawai A** (2000) Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus. *J Gen Virol*, 81 (1): 119-127.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Gür E and Şeker M** (2012) Comparison of AFLP polymorphism white nectarine types with important *Prunus* species. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, *Uludağ Üniversitesi*, 26 (2): 29-36.
- Gurnell J** (1985) Woodland rodent communities. *Symp. Zool. Soc. Lond*, 55: 377-411.
- Halle S** (1993) Wood mice (*Apodemus sylvaticus* L.) as pioneers of recolonization in a reclaimed area. *Oecologia*, 94 (1): 120-127.
- Harr B, Musolf K and Gerlach G** (2000) Characterization and isolation of DNA microsatellite primers in wood mice (*Apodemus sylvaticus*, Rodentia). *Mol Ecol*, 9 (10): 1664-1665.
- Heaton P R, Johnston E P, MCELhinney L M, Cowley R, O'Sullivan E and Whitby J E** (1997) Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J Clin Microbiol*, 35 (11): 2762-2766.
- Hillis D M, Moritz C and Mable B K** (1996) Molecular Systematics. 2nd ed., Sinauer Associates, 655 p.
- Iamamoto K, Quadros J and Queiroz L** (2011) Use of aspiration method for collecting brain samples for rabies diagnosis in small wild animals. *Zoonoses public hlth*, 58 (1): 28-31.
- Jackson A C and Wunner W H** (2002) Rabies. Elsevier Science, 800 p.
- Jacob Y, Real E and Tordo N** (2001) Functional interaction map of lyssavirus phosphoprotein: identification of the minimal transcription domains. *J. Virol.*, 75 (20): 9613-9622.
- Kaçar Y A** (2001) Türkiye’de Yetiştirilen Önemli Kiraz (*Prunus avium* L.) ve Vişne (*Prunus cerasus* L.) Çeşit ve Tiplerinin DNA Parmakizi Yöntemi ile Sınıflandırılması. Doktora tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 190s.
- Kallies R** (2010) Ljungan virus – prevalence in rodents and virus pathogenesis. PhD *Department of Biology, Chemistry and Pharmacy*, Berlin, 156 p.
- Kaplan M M and Koprowski H** (1980) Rabies. *Sci Am*, 242 120-134.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Kayhan Ayan Z** (2007) Ataköy Baraj Gölü Alabalık (*Salmo Trutta*) Populasyon Yapılarının Mikrosatellit Dna Analiz Yöntemi İle İncelenmesi. *Fen bilimleri Enstitüsü*, Tokat, 52 s.
- Kienzle T E, Alcamo I E and Heymann D L** (2007) Rabies: Deadly Diseases and Epidemics. Chelsea House, 143.
- Kilic B, Unal B, Semin S and Konakci S K** (2006) An important public health problem: rabies suspected bites and post-exposure prophylaxis in a health district in Turkey. *Int. J. Infect. Dis.*, 10 (3): 248-254.
- King A M Q, Adams M J, Carstens E B and Lefkowitz E J** (2012) Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Inc., Hardbound, 1338 p.
- Kissi B, Tordo N and Bourhy H** (1995) Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. *Virology*, 209 (2): 526-537.
- Knobel D L, Cleaveland S, Coleman P G, Fèvre E M, Meltzer M I, Miranda M E G, Shaw A, Zinsstag J and Meslin F-X** (2005) Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull WHO*, 83 (5): 360-368.
- Kozakiewicz M, Gortat T, Panagiotopoulou H, Gryczyńska-Sięmiątkowska A, Rutkowski R, Kozakiewicz A and Abramowicz K** (2009) The spatial genetic structure of bank vole (*Myodes glareolus*) and yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*) populations: the effect of distance and habitat barriers. *Anim Biol*, 59 (2): 169-187.
- Krebs C** (1992) The role of dispersal in cyclic rodent populations, Springer, pp. 160-165.
- Kryštufek B, Vohralík V and Janžekovič F** (2009) Mammals of Turkey and Cyprus: Rodentia II : Cricetinae, Muridae, Spalacidae, Calomyscidae, Capromyidae, Hystricidae, Castoridae. Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče, Založba Annales.
- Küçük E** (2010) Kazdağları yerinde (In Situ) muhafaza alanlarındaki kestane (*Castanea sativa* Mill.) populasyonlarının mikrosatellit (SSR) markörleri ile karakterizasyonu. Doktora tezi, *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 115 s.
- Kumar P, Gupta V, Misra A, Modi D and Pandey B** (2009) Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics*, 2 (4): 141.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Kumar P D** (2009) Rabies. Greenwood Press, 172 p.
- Kumar S, Nei M, Dudley J and Tamura K** (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinfo*, 9 (4): 299-306.
- Kuzmin I V, Hughes G J, Botvinkin A D, Orciari L A and Rupprecht C E** (2005) Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition. *Virus Res.*, 111 (1): 28-43.
- Kuzmin I V, Orciari L A, Arai Y T, Smith J S, Hanlon C A, Kameoka Y and Rupprecht C E** (2003) Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. *Virus Res.*, 97 (2): 65-79.
- Lackay S N, Kuang Y and Fu Z F** (2008) Rabies in small animals. *Vet Clin N Am-Small*, 38 (4): 851-861.
- Lafon M, Ideler J and Wunner W** (1983a) Investigation of the antigenic structure of rabies virus glycoprotein by monoclonal antibodies. *Dev. Biol. Stand.*, 57: 219-225.
- Lafon M, Wiktor T J and Macfarlan R I** (1983b) Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: analysis with monoclonal antibodies. *J Gen Virol*, 64 (4): 843-851.
- Larson J K, Wunner W H, Otvos L and Ertl H** (1991) Identification of an immunodominant epitope within the phosphoprotein of rabies virus that is recognized by both class I-and class II-restricted T cells. *J. Virol.*, 65 (11): 5673-5679.
- Lei Y, Wang X, Li H, Chen X, Ye B, Liu F, Lan J, Ye X, Mei J and Tang Q** (2009) [New animal hosts of rabies virus in mountain areas in Zhejiang province]. *Zhonghua liuxingbingxue zazhi*, 30 (4): 344-347.
- Lexer C, Streiff R, Steinkellner H and Glössl J** (1997) Paternity tests for trees with microsatellites. *Österr. Forstztg*, 108 (6): 43-44.
- Litt M and Luty J A** (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 44 (3): 397.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Liu Z, Li P, Kucuktas H, Nichols A, Tan G, Zheng X, Argue B J, Dunham R A and Yant D R** (1999) Development of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers suitable for genetic linkage mapping of catfish. *Trans Am Fish Soci*, 128 (2): 317-327.
- Madigan M T** (2012) Brock Biology of Microorganisms. Benjamin Cummings, 1152 p.
- Mandell G L, Bennett J E and Dolin R** (2004) Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier Churchill Livingstone, 4016 p.
- Mazurkiewicz M and Rajska-Jurgiel E** (1998) Spatial behaviour and population dynamics of woodland rodents. *ZPPNR*, 43 137-161.
- Mebatsion T, Weiland F and Conzelmann K-K** (1999) Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J. Virol.*, 73 (1): 242-250.
- Meerburg B G, Singleton G R and Kijlstra A** (2009) Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Crit Rev Microbiol*, 35 (3): 221-270.
- Meslin F, Fishbein D and Matter H** (1993) Rationale and prospects for rabies elimination in developing countries. *Curr Top Microbiol Immunol*, 187: 1-26.
- Meslin F X, Kaplan M M, Organization W H and Koprowski H** (1996) Laboratory Techniques in Rabies. Organisation Mondiale de la Santé, 476 p.
- Metlin A** (2008) Genetic characteristics of field and attenuated rabies viruses and molecular epidemiology of rabies in Finland and Russia. Academic dissertation, *Department of Basic Veterinary Sciences Faculty of Veterinary Medicine*, Helsinki, 82 p.
- Montuire S** (2001) Rodentia (Rodents). John Wiley & Sons, Ltd.
- Morgante M and Olivieri A** (1993) PCR amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.*, 3 (1): 175-182.
- Mossman C A and Waser P M** (2001) Effects of habitat fragmentation on population genetic structure in the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*). *Can J Zool*, 79 (2): 285-295.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Mukherjee S, Goyal S, Johnsingh A and Leite Pitman M** (2004) The importance of rodents in the diet of jungle cat (*Felis chaus*), caracal (*Caracal caracal*) and golden jackal (*Canis aureus*) in Sariska Tiger Reserve, Rajasthan, India. *J. Zool.*, 262 (4): 405-411.
- Nel L H and Markotter W** (2007) Lyssaviruses. *Crit Rev Microbiol*, 33 (4): 301-324.
- O'reilly P, Herbinger C and Wright J M** (1998) Analysis of parentage determination in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellites. *Anim Genet*, 29 (5): 363-370.
- Ornishi N, Ishibashi Y, Saitoh T, Abe S and Yoshida C** (1998) Polymorphic microsatellite DNA markers in the Japanese wood mouse *Apodemus argenteus*. *Mol Ecol*, 7: 1431-1439.
- Özkütük N** (2002) İnsan Diploid Hücresi Kuduz Aşısı (HCDV) İle İkinci Kuşak Hücre Kültürü Kuduz Aşılarının Etkinliklerinin Karşılaştırılması. Doktora Tezi, *Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı* Manisa, 80 p.
- Özsoy M, Yakıştıran S and Özkan E** (2002) 2000 Yılında Kuduz Aşı Merkezine Başvuran Hastaların Değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 59: 1-6.
- Pattnaik A K, Hwang L, Li T, Englund N, Mathur M, Das T and Banerjee A K** (1997) Phosphorylation within the amino-terminal acidic domain I of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus is required for transcription but not for replication. *J. Virol.*, 71 (11): 8167-8175.
- Peakall R and Smouse P E** (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28 (19): 2537-2539.
- Powell W, Machray G C and Provan J** (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends plant sci*, 1 (7): 215-222.
- Prehaud C, Coulon P, Lafay F, Thiers C and Flamand A** (1988) Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. *J. Virol.*, 62 (1): 1-7.
- Provan J, Wolters P, Caldwell K H and Powell W** (2004) High-resolution organellar genome analysis of Triticum and Aegilops sheds new light on cytoplasm evolution in wheat. *Theor Appl Genet*, 108 (6): 1182-1190.
- Pucek M** (1983) Habitat preference, in Ecology of the bank vole. *Acta Theriol*, 28 (1): 31-40.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Queller D C, Strassmann J E and Hughes C R** (1993) Microsatellites and kinship. *Trends Ecol & Evol*, 8 (8): 285-288.
- Reed D H and Frankham R** (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv Biol*, 17 (1): 230-237.
- Rigaut K, Birk D and Lenard J** (1991) Intracellular distribution of input vesicular stomatitis virus proteins after uncoating. *J. Virol.*, 65 (5): 2622-2628.
- Rikalainen K, Grapputo A, Knott E, Koskela E and Mappes T** (2008) A large panel of novel microsatellite markers for the bank vole (*Myodes glareolus*). *Mol. Ecol. Resour.*, 8 (5): 1164-1168.
- Rupprecht C E, Smith J S, Fekadu M and Childs J E** (1995) The ascension of wildlife rabies: a cause for public health concern or intervention. *Emerg Infect Dis*, 1 (4): 107-14.
- Sander J** (2000) Genetische Charakterisierung wirtschaftlich genutzter Schafrassen. 89 p.
- Schnell M J, McGettigan J P, Wirblich C and Papaneri A** (2009) The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nature Rev Microbiol*, 8 (1): 51-61.
- Seif I, Coulon P, Rollin P and Flamand A** (1985) Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J. Virol.*, 53 (3): 926-934.
- Slatkin M** (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236 (4803): 787-792.
- Smith W H, Cervantes E P, Institute I R R and Control J W F U P o E o E M f V** (1988) Vector-borne Disease Control in Humans Through Rice Agroecosystem Management: Proceedings of the Workshop on Research and Training Needs in the Field of Integrated Vector-Borne Disease Control in Riceland Agroecosystems of Developing Countries, 9-14 March 1987. International Rice Research Institute in collaboration with the WHO/FAO/UNEP Panel of Experts on Environmental Management for Vector Control.
- Spielman D, Brook B W, Briscoe D A and Frankham R** (2004) Does inbreeding and loss of genetic diversity decrease disease resistance? *Conserv Genet*, 5 (4): 439-448.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Stenseth N C and Lidicker W Z** (1992) Animal Dispersal: Small Mammals As a Model. Springer Netherlands.
- Sterner R T and Smith G C** (2006) Modelling wildlife rabies: Transmission, economics, and conservation. *Biol Conserv*, 131 (2): 163-179.
- Szacki J** (1999) Spatially structured populations: how much do they match the classic metapopulation concept? *Landsc Ecol*, 14 (4): 369-379.
- Thoulouze M-I, Lafage M, Schachner M, Hartmann U, Cremer H and Lafon M** (1998) The Neural Cell Adhesion Molecule Is a Receptor for Rabies Virus. *J. Virol.*, 72 (9): 7181-7190.
- Tordo N and Poch O** (1988) Rabies: Structure of rabies virus, Kluwer academic Publisher, Boston, pp. 25-45.
- Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G and Rougeon F** (1986) Walking along the rabies genome: is the large GL intergenic region a remnant gene? *P Natl Acad Sci*, 83 (11): 3914-3918.
- Torun M** (2010) Evaluation of rabies-suspected bites in Giresun, eastern Black-Sea region, Turkey. *Mikrobiyol. Bul.*, 44 (4): 685-687.
- Travassos Da Rosa A P A, Mather T N, Takeda T, Whitehouse C A, Shope R E, Popov V L, Guzman H, Coffey L, Araujo T P and Tesh R B** (2002) Two new rhabdoviruses (Rhabdoviridae) isolated from birds during surveillance for arboviral encephalitis, Northeastern United States. *Emerg Infect Dis*, 8 (6): 614-618.
- Tuffereau C, Benejean J, Alfonso A-M R, Flamand A and Fishman M C** (1998) Neuronal cell surface molecules mediate specific binding to rabies virus glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus on the surfaces of lepidopteran cells. *J. Virol.*, 72 (2):: 1085-1091.
- Ujino T, Kawahara T, Tsumura Y, Nagamitsu T, Yoshimaru H and Ratnam W** (1998) Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisii* and other Dipterocarpaceae species. *Heredity*, 81 (4): 422-428.
- URL-1** (2013) http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Sunular/Tek_Saglik_Tek_Dunya.pdf.
- URL-2** (2013) <http://www.giresuntarim.gov.tr/tr/dokuman/Zoonoz%20hast.pdf>.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

URL-3 (2013) http://viralzone.expasy.org/all_by_species/22.html.

URL-4 (2013) <https://naturalunseenhazards.files.wordpress.com/2012/06/bite2-copy.gif>.

URL-5 (2014) http://www.who.int/rabies/Global_Rabies_ITH_2008.png?ua=1.

URL-6 (2014) <http://www.dicle.edu.tr/Contents/2fae5344-6639-4f25-ae9c-172947e14726.pdf>.

URL-7 (2014) <http://www.who-rabies-bulletin.org/Queries/Maps.aspx>.

URL-8 (2013) <http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-15918/kuduz-korunma-ve-kontrol-yonergesi.html>.

URL-9 (2013) <http://www.cdc.gov/rodents/>.

Us D (2008) Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. 400 s.

Van Regenmortel H V, Fauquet C M, Division I U o M S V and Bishop D H L (2000) Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses : Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, 1162 p.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J and Kuiper M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23 (21): 4407-4414.

Wagner R R (1987) The Rhabdoviruses. Plenum Press, 544 p.

Welsh J and McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 18 (24): 7213-7218.

WHO (1994) WHO Mediterranean Zoonoses Control Centre Information Circular. 33: 7-9.

Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A and Tingey S V (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18 (22): 6531-6535.

Wilson D E and Reeder D A M (2005) Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. 3rd ed., Johns Hopkins University Press.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Winkler W G, Schneider N J and Jennings W L** (1972) Experimental rabies infection in wild rodents. *J Wildl Dis*, 8 (1): 99-103.
- Wolton R and Flowerdew J** (1985) Spatial distribution and movements of wood mice, yellow-necked mice and bank voles. *Symp Zool Soci Lond*, 55: 249-275.
- Wunner W** (1991) The chemical composition and molecular structure of rabies viruses. The natural history of rabies. CRC Press, Boca Raton, pp. 31-35.
- Yang J, Hooper D C, Wunner W H, Koprowski H, Dietzschold B and Fu Z F** (1998) The specificity of rabies virus RNA encapsidation by nucleoprotein. *Virology*, 242 (1): 107-117.
- Yeh F, Yang R-C and Boyle T** (1999) PopGene Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. *University of Alberta and Centre for International Forestry Research*, 11-23.
- Yiğit N, Çolak E, Sözen M and Karataş A** (2006) Rodents of Türkiye: Türkiye Kemiricileri. Meteksan Yayınevi, Ankara, 154 p.
- Zhang D X and Hewitt G M** (2003) Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol Ecol*, 12 (3): 563-584.
- Zhang Y-Z, Xiong C-L, Zou Y, Wang D-M, Jiang R-J, Xiao Q-Y, Hao Z-Y, Zhang L-Z, Yu Y-X and Fu Z F** (2006) Molecular characterization of rabies virus isolates in China during 2004. *Virus Res.*, 121 (2): 179-188.
- Zhang Z and Usher M B** (1991) Dispersal of wood mice and bank voles in an agricultural landscape. *Acta Theriol*, 36 (3/4): 239-245.

EK AÇIKLAMALAR A
ANALİZLERDE KULLANILAN VERİLER

Ek A.1 *Myodes* populasyonlarına ait örneklerin MSCg-4, MSCg-9, MSCg-15, MSCg-19 ve MSCg-20 lokusları bakımından allel büyüklükleri.

Örnek No	Köy	İlçe	MSCg-4		MSCg-9		MSCg-15		MSCg-19		MSCg-20	
6533	Çömlekçi	Çaycuma	121	147	126	138	127	139				
6535	Çömlekçi	Çaycuma	124	124	126	126	134	141				
6536	Çömlekçi	Çaycuma	117	123	134	134	133	135				
6537	Çömlekçi	Çaycuma	122	122			134	140				
6543	Çömlekçi	Çaycuma	174	174					135	137		
6582	Temenler	Çaycuma							135	137	136	136
6583	Temenler	Çaycuma										
6584-1	Temenler	Çaycuma	134	136	126	128	127	127	125	129	125	125
6584-2	Temenler	Çaycuma	121	136	132	132	129	129	137	137	158	158
6585	Temenler	Çaycuma	119	136	132	132	131	135				
6586	Temenler	Çaycuma	130	130	137	137	134	141				
6677	Yeşilköy	Çaycuma	129	129							158	158
6678	Yeşilköy	Çaycuma	122	135			128	128			160	160
6804	Filyos	Çaycuma	166	166	164	166			145	149	156	156
6810	Filyos	Çaycuma	136	144	129	138	131	139	104	104		

Ek A.2 *Apodemus* populasyonlarına ait örneklerin MSAf-16, MSAf-22, MSAf-7 ve MSAf-8 lokusları bakımından allel büyüklükleri.

Örnek No	Köy	İlçe	MSAf-16		MSAf-22		MSAf-7		MSAf-8	
6496	Filyos	Çaycuma			151	151	168	168	168	168
6497	Filyos	Çaycuma								
6502	Filyos	Çaycuma	115	115	161	161			144	144
6511	Filyos	Çaycuma	115	116	171	171				
6806	Filyos	Çaycuma	115	123	163	177	120	137	119	119
6807	Filyos	Çaycuma	110	110			139	139	138	140
6814	Filyos	Çaycuma	159	159	159	159	134	138	136	136
6815	Filyos	Çaycuma	113	119	183	183	139	143	142	142
6816	Filyos	Çaycuma					137	137	134	136
6515	Türkali	Çaycuma					135	135	135	135
6516	Türkali	Çaycuma	112	116	175	181			168	168
6518	Türkali	Çaycuma	111	123	177	179	127	139	138	144
6519	Türkali	Çaycuma			140	140	138	147	138	147
6520	Türkali	Çaycuma					154	168	154	168
6525	Türkali	Çaycuma					133	144	144	144
6669	Yeşilköy	Çaycuma								
6670	Yeşilköy	Çaycuma	110	125	119	119				
6673	Yeşilköy	Çaycuma								
6675	Yeşilköy	Çaycuma							132	132
6676	Yeşilköy	Çaycuma								
6679	Y.ihsaniye	Çaycuma	140	147	140	147			128	137
6680	Y.ihsaniye	Çaycuma							140	147
6681	Y.ihsaniye	Çaycuma								
6682	Y.ihsaniye	Çaycuma			135	139	144	144	144	144
6685	Y.ihsaniye	Çaycuma			145	155	142	152	142	152
6689	Y.ihsaniye	Çaycuma	104	108	151	161			142	152
6731	Olukyanı	Merkez	110	124			135	148	134	146
6859	Olukyanı	Merkez					122	122	122	122
6862	Olukyanı	Merkez	117	117			92	100	176	178
6864	Olukyanı	Merkez	117	124	179	179	132	136	135	135

EK AÇIKLAMALAR B
ÇALIŞMA FOTOĞRAFLARI



Ek B.1 Çalışma alanına ait habitat görüntüsü.



Ek B.2 Kapanlama alışmaları (Fotoğraftakiler:Tuğçe CEYLAN, Muhsin ÇOĞAL, Yasemin SANCAR).



Ek B.3 Arazi ekibi (Fotoğraftakiler: Tuğçe CEYLAN, Muhsin ÇOĞAL, Ortaç ÇETİNTAŞ, Yasemin SANCAR, Deniz ŞENOL).



Ek B.4 Laboratuvar ekibi (Fotoğraftakiler: Prof. Dr. İ. Mehmet Ali ÖKTEM, Özge ÖZTUNA, Tuğçe CEYLAN, Ceylan POLAT, Sercan IRMAK, Yasemin SANCAR, Uğur KAYIŞ, Ortaç ÇETİNTAŞ).

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Düzce’de doğan Tuğçe CEYLAN ilköğrenimi Namık Kemal İlköğretim Okulu’nda tamamladı. Ortaöğrenimi Düzce Arsal Anadolu Lisesi’nde tamamladıktan sonra 2005 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi Biyoloji Bölümü’ne girdi. 2010 yılında iyi derece ile mezun olduktan sonra Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zooloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans yapmaya hak kazandı. Halen aynı anabilim dalında yüksek lisans öğrenimini sürdürmektedir.

ADRES BİLGİLERİ

Adres : Bülent Ecevit Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü
67100 İncivez/ ZONGULDAK

Tel : 0 543 914 44 55
e-posta: tugceeceylan@gmail.com