

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANATLI HAYVANLARDA NEWCASTLE HASTALIĞI  
VİRUSLARININ REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE  
CHAIN REACTION (RT-PCR) İLE TEŞHİSİ VE MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU**

**M. Fatih BARUT**

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Nejat AYDIN**

**2005-ANKARA**

# İÇİNDEKİLER

<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>iv</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>v</b>
<b>ŞEKİLLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÇİZELGELER VE TABLOLAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. NEWCASTLE HASTALIĞI VE VİRUSU HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	1
1.1.1. <i>Newcastle Virusunun Nomenclature' deki Yeri</i> .....	3
1.1.2. <i>Moleküler Yapısı</i> .....	5
1.1.3. <i>Füzyon, F, Geni ve Patojenitedeki Önemi</i> .....	9
1.2. NEWCASTLE DISEASE VİRUSU (NDV) ÜZERİNDE YAPILAN MOLEKÜLER ÇALIŞMALARIN KISA TARİHÇESİ.....	23
1.3. BU ÇALIŞMADA KULLANILAN TEKNİKLER ÜZERİNE GENEL BAKIŞ.....	23
1.3.1. <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i> .....	23
1.3.1.1. PCR Tekniğinin Temelleri.....	24
1.3.1.2. Günümüze Kadar Geliştirilen PCR Tekniklerinden Örnekler.....	26
1.3.2. <i>DNA Dizin Analizi</i> .....	30
1.3.2.1. Sanger Zincir Durdurma DNA Dizin Analizi (Chain Termination Sequencing).....	31
1.3.2.2. Dye Terminator Sequencing.....	32
1.3.2.2.1. Sekans PCR .....	32
1.3.2.2.2. Sentezlenen Dizinlerin Elektroforez ile Birbirinden Ayırıştırılarak Bir CCD Kamera ile Tespit Edilmesi.....	34
1.3.3. <i>Sekans sonuçlarının çakıştırılması (align) ve mutasyonların tespiti</i> .....	37
1.3.4. <i>Filogenetik Analiz</i> .....	39
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>45</b>
2.1. GEREÇ.....	45
2.2. YÖNTEM.....	47
2.2.1. <i>Allantoik Sıvılardan Virus'a Ait RNA'nın Ekstraksiyonu</i> .....	49
2.2.2. <i>Revers Transcription (RT)</i> .....	49
2.2.2.1. Testte Kullanılacak Karışımların Hazırlanması.....	49
2.2.2.2. İlk Aşama; RNA'ya Ait Sekunder Yapıların Çözdürülmesi.....	50
2.2.2.3. İkinci Aşama; RNA'dan cDNA Oluşturulması.....	50
2.2.3. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> .....	50
2.2.3.1. PCR Karışımının Hazırlanması.....	50
2.2.4. <i>PCR Ürünlerinin Jelde Koşturularak Görünür Hale Getirilmesi</i> .....	51
2.2.4.1. Jelin Hazırlanması.....	51
2.2.4.2. Örneklerin Jel'e yüklenmesi.....	52
2.2.4.3. Elektroforez İşlemi ve Sonuçların Görüntülenmesi.....	52
2.2.5. <i>PCR Ürünlerinin Saflaştırılması</i> .....	52
2.2.6. <i>Sekans PCR</i> .....	53
2.2.6.1. Sekans PCR karışımının hazırlanması .....	53
2.2.6.2. Sekans PCR Thermalcycler Programı.....	54
2.2.7. <i>Sekans PCR Ürünlerinin Saflaştırılması</i> .....	54
2.2.8. <i>Sekans İşlemi</i> .....	54
2.2.9. <i>Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi</i> .....	55
2.2.10. <i>Sonuçların Ülkemiz Dışında İzole Edilen Diğer Viruslarla Taksonomik Olarak Karşılaştırılması</i> .....	55
2.2.11. <i>Genetik Yapıda Tespit Edilen Aminoasit Düzeyindeki Mutasyonların Füzyon Proteinine Ait Üç Boyutlu Yapıdaki Konumlarının Görüntülenmesi</i> .....	55
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>56</b>
3.1. RT-PCR SONUÇLARI.....	56

3.2. SEKANS ANALİZİ SONUÇLARI.....	57
3.3. FİLOGENETİK ANALİZ SONUÇLARI.....	61
<b>4. TARTIŞMA.....</b>	<b>86</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>89</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>91</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>92</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>100</b>

## ÖNSÖZ

Newcastle Hastalığı Virusu (Newcastle Disease Virus, NDV), yoğun aşılama programları ile dünyanın birçok yerinde kontrol altına alınmadan önce, kanatlı sektörüne oldukça büyük ekonomik zararlar vermiş, halen de zaman zaman ortaya çıkan salgınlarla tüm dünya için ciddi yetini koruyan salgın bir hastalıktır.

Hastalığın yüksek mortalite gücüne sahip olması ve hızla yayılması hastalığın teşhisinde hızlı ve güvenilir yöntemleri gerekli kılmaktadır. Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ve ardından yapılan DNA dizin analizi yöntemi gerek hızı gerekse güvenilirliği açısından bugün dünya'nın ulaştığı son nokta olmakla birlikte ülkemizde teknik imkansızlıklar sebebi ile uzun yıllar boyunca yalnız Newcastle değil birçok hayvan hastalığı etkeninde uygulanamamıştır.

Newcastle gibi ülkeler arası yayılım gösterebilen panzootik hastalıklarda, hastalıkla mücadelede uluslar arası projelerin yapılması gerekmektedir. Bu projelerin planlanmasında filogenetik çalışmalarla etken alt tipleri arasında ortaya çıkarılan epidemiyolojik ilişkilerin büyük bir önemi bulunmaktadır. Türkiye'den izole edilen Newcastle virusları üzerinde yapılan filogenetik çalışmalar böyle bir projede Türkiye'yi temsil edebilecek bir düzeyde değildir.

Bu sebeplerle ülkemizde bulunan bir çok hayvan hastalığında olduğu gibi, Newcastle hastalığı viruslarının da genetik açıdan incelenmesi ve bu konuda kapsamlı araştırmaların yapılması gerekmektedir. Bu çalışma, yapılacak kapsamlı araştırmalara basamak teşkil edebilecek bir prototip olarak tasarlanmıştır.

Çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen, değerli hocam Prof. Dr. Nejat AYDIN'a, A.Ü Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Müjgan İZGÜR'e ve A.Ü Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim'dan Prof. Dr. Mehmet AKAN'a, çalışmada kullanılan virus suşlarının temin edilmesindeki yardımları sebebi ile Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden Dr. Fethiye ÇÖVEN'e, yaptığı değerli çalışmalarla projeye ışık tutan ve her aşamasında yardımını esirgemeyen Waybridge Veterinary Laboratories Agency'den, Dr. Elizabeth ALDOUS, Pirbright Institute of Animal Health'den Dr. Ashly BANYARD ve Prof. Dr. Tom BARRET'a, çalışma boyunca manevi destekleri ile projeyi bitirmemde büyük katkıları olan sevgili eşim Nafiye BARUT'a ve aileme teşekkür ederim.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

bp	Base-pair
cDNA	Complementer DNA
CEF	Chicken Embryo Fibroblast
dH <sub>2</sub> O	Distile-Deiyonize su
DNA	Deoxyribonucleic Asid
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
EMVKAE	Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü
HA	Haemaglutinasyon
IAH	Pirbright Institute of Animal Health
ICPI	Intracerebral Pathogenicity Index
IVPI	Intravenous Pathogenicity Index
LMA	Low Melt Temperature Agar
MDT	Mean Death Time
NDV	Newcastle Disease Virus
OIE	Office International des Epizooties
PMV	Paramyxovirus
RNA	Ribonucleic asid
RT-PCR	Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction
TBE	Tris-Borate - EDTA Buffer
UPGMA	Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages
UV	Ultra Viole

## ŞEKİLLER

ŞEKİL 1.1. RUBULAVİRUS CİNSİ İÇİNDE BULUNAN DİĞER TÜRLER (ROSE VE WHİTT, 2001) .....	4
ŞEKİL 1.2. NEWCASTLE VİRUSUNA AİT GENOMU OLUŞTURAN PROTEİNLERE AİT ŞEMA (BU VE ARK., 2005) ..	9
ŞEKİL 1.3. ALDOUS TARAFINDAN 2003 YILINDA YAPILAN FİLOGENETİK GURUPLANDIRMA: SAĞDA BULUNAN SÜTUN, ROMEN RAKAMLARI İLE İSİMLENDİRİLEN MAB GRUPLARINI GÖSTERMEKTEDİR. ....	12
ŞEKİL 1.4. PCR AŞAMALARI (VIERSTRAETE, 2004).....	24
ŞEKİL 1.5. PCR DÖNGÜLERİ SONUCU TEORİK OLARAK OLUŞAN KOPYA SAYISI (VIERSTRAETE, 2004) ..	24
ŞEKİL 1.6. REAL-TİME PCR'DA FLORASAN PROBLARIN İŞLEVİ (LEE VE ARK., 1993) .....	27
ŞEKİL 1.7. DYE TERMİNATOR SEQUENCİNG (VIERSTRAETE, 2004).....	30
ŞEKİL 1.8. DYE TERMİNATOR SEQUENCİNG (VIERSTRAETE, 2004).....	32
ŞEKİL 1.9. SEKANS İŞLEMİ SIRASINDA OLUŞAN FARKLI UZUNLUKLARDAKİ DNA İPLİKLERİ (KİMBALL, 2003) .....	33
ŞEKİL 1.10. SEKANS İŞLEMİ SIRASINDA OLUŞAN FARKLI UZUNLUKLARDAKİ DNA İPLİKLERİ (KİMBALL, 2003) .....	34
ŞEKİL 1.11. SEKANS CİHAZI TARAFINDAN GERÇEKLEŞTİRİLEN ELEKTROFOREZ İŞLEMİNİN ŞEMATİK GÖSTERİMİ (VIERSTRAETE, 1999).....	35
ŞEKİL 1.12. OTOMATİK SEKANS CİHAZI ÇALIŞMA ŞEMASI (VIERSTRAETE, 2004).....	35
ŞEKİL 1.13. AYNI SOYDAN GELEN BİREYLER ARASINDA GÖZLENEBİLECEK GENETİK DEĞİŞİMLER (VIERSTRAETE, 2004).....	36
ŞEKİL 1.14. FİLOGENETİK TERİMLER (VIERSTRAETE, 2004).....	38
ŞEKİL 1.15. FARKLI FİLOGENETİK AĞAÇLARDAN ÖRNEKLER (VIERSTRAETE, 2004) .....	41
ŞEKİL 1.16. İNVERSION (VIERSTRAETE, 2004) .....	42
ŞEKİL 1.17. ORTAK ATADAN GELEN İKİ BİREYE AİT NÜKLEOTİT DİZİNLERİNDE GÖRÜLEBİLECEK FARKLILAŞMALAR (VIERSTRAETE, 2004).....	42
ŞEKİL 3.1. RT-PCR SONUÇLARI.....	54
ŞEKİL 3.2. JELDEN SAFLAŞTIRMA ÖNCESİ ÖRNEKLERDEN BAZILARI.....	55
ŞEKİL 3.3. JEL PÜRİFİKASYON SONRASI ÜRÜNLERLERDEN BAZILARI .....	55
ŞEKİL 3.4. SEKANS CİHAZINDAN ELDE EDİLEN CROMOTOGRAMLARDAN BİR KESİT.....	55
ŞEKİL 3.5. BU ÇALIŞMADA BELİRLENEN 400 BP UZUNLUĞUNDA 14 ADET DNA DİZİNİ .....	58
ŞEKİL 3.6. BU ÇALIŞMADA DNA DİZİNİ BELİRLENEN SUŞLARIN AIT OLDUĞU GENETİK GRUBU BELİRLEMEK ÜZERE ÇİZİLEN GENETİK AĞAÇ .....	66
ŞEKİL 3.7. NEWCASTLE VİRUSU F PROTEİNİNE AİT CRYSTALLOGRAPHİC YAPI (CHEN VE ARK., 2001) ..	79
ŞEKİL 3.8. ÇALIŞMADA BELİRLENEN DNA DİZİNİNİN F PROTEİNİ İÇİNDEKİ YERİ .....	80

## ÇİZELGELER VE TABLOLAR

TABLO 1.1. PARAMYXOVİRUS CİNSİ İÇİNDE BULUNAN DİĞER TÜRLER (ALEXANDER, 1993) .....	4
TABLO 1.2. NEWCASTLE VİRUSLARININ İSİMLENDİRME KRİTERLERİ (ALEXANDER, 1993) .....	5
TABLO 1.3. AVİAN PARAMYXOVİRUS'LARDAN PROTOTİP OLARAK KABUL EDİLEN İZOLATLAR (ALEXANDER, 1993).....	5
TABLO 1.4. ALDOUS'IN 2003 YILINDA YAPTIĞI ÇALIŞMADA DNA DİZİNİNİ BELİRLEYEREK GENETİK AĞAÇ ÇİZİMİ İÇİN KULLANDIĞI 174 NDV SUŞUNA AİT BİLGİLER .....	13
TABLO 1.5. FİLOGENETİK ÇALIŞMALARDA KULLANILAN BAŞLICA TERİMLER (VIERSTRAETE, 2004) ....	38
TABLO 2.1. BU ÇALIŞMADA DNA DİZİNLERİ BELİRLENEN VİRUS SUŞLARI.....	43
TABLO 2.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN PRİMERLER VE PRİMERİ İLK KEZ KULLANAN ARAŞTIRICILAR ....	45
TABLO 2.3. ÇALIŞMADA DNA DİZİNİ TESPİT EDİLEN ÖRNEKLERE AİT HA DEĞERLERİ .....	46
TABLO 2.4. ÇALIŞMA BOYUNCA TAKİP EDİLEN BASAMAKLAR .....	46
TABLO 2.5. RT- PCR KARIŞIMLARI.....	48
TABLO 2.6. PCR KARIŞIMI.....	49
TABLO 2.7. TERMAL CYCLER'IN PROGRAMLANMASI (TERMO HYBAID).....	49
TABLO 2.8. SEKANS PCR KARIŞIMI.....	51
TABLO 2.9. SEKANS PCR THERMALCYCLER PROGRAMI.....	52
TABLO 3.1. ÇALIŞMADA DNA DİZİNİ BELİRLENEN NDV SUŞLARININ GEN BANKASI ERİŞİM NUMARALARI .....	56
TABLO 3.2. TÜRKİYE'DEN İZOLE EDİLEN VİRUSLARA AİT F GENİ - CLEAVAGE SİTE BÖLGESİ AMİNO ASİT DİZİNLERİ .....	57
TABLO 3.3. ALDOUS TARAFINDAN YAPILAN GRUPLANDIRMA VE BU ÇALIŞMADA ELDE EDİLEN SONUÇLAR ARASINDA FARKLI GRUPLARA DAHİL EDİLEN ÖRNEKLER .....	65
TABLO 3.4. BU ÇALIŞMADA DNA DİZİNLERİ BELİRLENEN ÖRNEKLERİN AİT OLDUKLARI FİLOGENETİK GRUPLAR, MAB GRUPLARI VE ÖZELLİKLERİ.....	78
ÇİZELGE 3.1. TÜRKİYE'DEN İZOLE EDİLEN NDV SUŞLARININ BİRBİRLERİNE YAKINLIĞINI GÖSTEREN DENDOGRAM- KÖKSÜZ-RADİAL .....	59
ÇİZELGE 3.2. TÜRKİYE'DEN İZOLE EDİLEN NDV SUŞLARININ BİRBİRLERİNE YAKINLIĞINI GÖSTEREN DENDOGRAM- KÖKSÜZ-RECTANGULAR .....	60
ÇİZELGE 3.3. TÜRKİYE VE KOMŞULARINDAN İZOLE EDİLEN NDV SUŞLARINA AİT CDNA DİZİN SONUÇLARININ GENETİK KARŞILAŞTIRILMASI: BU ÇALIŞMADA DNA DİZİNİ BELİRLENEN ÖRNEKLER ÇERÇEVE İÇİNDE BELİRTİLDİ. ....	61
ÇİZELGE 3.4. DÜNYA GEN BANKASI'NDA KAYITLI OLUP TÜRKİYE'YE YAKIN GENETİK YAPIYA SAHİP OLAN VİRUSLARA AİT DNA DİZİN ANALİZİ SONUÇLARININ GENETİK KARŞILAŞTIRILMASI .....	63
ÇİZELGE 3.5. DÜNYA GEN BANKASI'NDA KAYITLI OLUP, KONYA'DAN İZOLE EDİLEN 2 NOLU NDV SUŞUNA YAKIN GENETİK YAPIYA SAHİP VİRUSLARA AİT DNA DİZİN ANALİZİ SONUÇLARININ GENETİK KARŞILAŞTIRILMASI.....	64
ÇİZELGE 3.6. BU ÇALIŞMADA DNA DİZİNİ BELİRLENEN 14 NDV SUŞUNUN DÜNYANIN ÇEŞİTLİ ÜLKELERİNDEN İZOLE EDİLEN, 6 FARKLI GENETİK GURUBA MENSUP, 328 NDV SUŞU İLE KARŞILAŞTIRILMASI .....	67





## 1. GİRİŞ

Newcastle hastalığı (ND), Office International des Epizooties (OIE) tarafından List-A hastalıklar arasında incelenen, bir çok ülkede de hastalığın kontrolü amacıyla kanuni önlemlerin alındığı (Commission of the European Communities, 1992), kanatlı sektörü için ciddi tehlike oluşturan viral bir hastalıktır. Hastalığın yüksek ölüm oranı ile seyretmesi ve hızlı yayılımı, hastalığın kontrolünde hızlı ve güvenilir teşhis yöntemlerini gerekli kılmaktadır. Teşhis edilen etkenin tiplendirilmesi ve filogenetik çalışmalarla hastalığın orijininin bulunması, ikinci önemli aşamayı oluşturmaktadır. Bu amaçla öncelikle monoklonal antikor panelleri kullanılmış, monoklonal antikorlar (MAb) kullanılarak yapılan ayırımın birbirine yakın antijenik yapıya sahip ancak genetik olarak birbirinden farklı virusların ayırımında yetersiz kalması araştırmacıları genetik çalışmalara yöneltmiştir.

Etkenin RT-PCR ile teşhisini, restriksiyon enzim analizleri ile tiplendirme çalışmaları, probe hibridizasyon ve son olarak DNA sekans analizi ile filogenetik sınıflandırma izlemiştir.

Bu çalışmada; ülkemizde konvansiyonel çalışmalarla teşhis edilmekle birlikte genetik düzeyde tiplendirilmesi konusunda yeterli çalışma bulunmayan ND virusunun moleküler düzeyde tiplendirilmesi ve Türkiye'den izole edilen bu suşların dünyanın diğer bölgelerinden izole edilen suşlarla genetik yakınlık açısından karşılaştırılarak filogenetik sınıflandırılmasının yapılması amaçlanmıştır.

### 1.1. Newcastle Hastalığı ve Virusuna Hakkında Genel Bilgiler

Newcastle Hastalığı Virusuna (NDV) Okyanusya Ülkeleri hariç, tüm dünyada yaygın olarak bulunan ve 250'nin üzerinde kuş türünde (Alexander, 1997; Aldous ve Alexander 2001'den), asemptomatikten %100 ölümcül forma kadar değişebilen şiddette, virus suşunun affinitesine bağlı olarak, sindirim, sinir, ve/veya solunum sistemi organlarına yerleşerek buna bağlı klinik bulgularla hastalık tablosu oluşturan bir RNA virusudur.

Organ affinitesi ve oluşturduğu hastalık şiddetine göre;

- *Visserotropic velogenic* (sindirim sisteminde hemorojik lezyonlar, yüksek virulens),
- *Neurotropic velogenic* (solunum ve sinir sistemi bulgularını takiben yüksek ölüm oranı),
- *Mesogenic* (solunum ve sinir sistemi bulguları, düşük ölüm oranı),
- *Lentogenic* (solunum sisteminde zayıf veya belirsiz bulgular),
- *Asymptomatic enteric* (belirsiz barsak enfeksiyonu),

olmak üzere beş grup altında incelenen ND virus suşlarının tiplendirilmesinde, konvansiyonel yöntemlerden; chicken embriyo fibroblast (CEF), hücre kültürlerinde yapılan Plak Test, embriyolu tavuk yumurtasında (ETY) ölüm zamanı (Mean death time, MDT), günlük civcivlerde beyin içi enjeksiyon sonrası ölüm zamanı (Intracerebral pahtogenicity index, ICPI) ve damar içi enjeksiyon sonrası ölüm zamanı (Intravenous pahtogenicity index, IVPI) kullanılmakta, bunun yanında monoklonal antikor (MAb) panelleri ve son yıllarda geliştirilen moleküler analizlerden yararlanılmaktadır (Aldous ve Alexander, 2001; Aydın, 2001; OIE, 2002). Neurotropic velojenik suşlarla, visserotropic velojenik suşların ayırımında intracloacal inokulasyonlar da kullanılabilir (Seal ve ark., 1995).

Hastalığın seyrettiği forma göre; *sindirim sisteminde*; yemek borusu, ön mide ve barsak mukozasında hemoroji, ülserasyon ve nekrozlara bağlı olarak sarı-yeşil ishal, dehidrasyon, zayıflama ve yumurta veriminde hızla düşüş, *solunum sisteminde*; tracheal mucozada hemoroji ve konjesyon ile pharynx'te biriken köpüklü mukus sebebiyle solunum güçlüğü, öksürük ve tıksırık, *sinir sisteminde*; beyin zarında hemoroji ve non-prulent encephalomyelitis sonucu, kanatların ve/veya bacakların iki taraflı paralizi, kanatlarda, boyun ve bacaklarda clonic spasm, tortikollis, ataksi, dairesel hareketler, baş ve boynun aşağı yukarı sallanması şeklinde belirtiler görülmektedir. Escherichia coli ve Mycoplasma gallisepticum gibi ikincil etkenlerin olaya karışması bulguların ciddiyetin arttırmaktadır (OIE, 2002; Kouwenhoven, 1993).

Etkenin yayılmasında bazı psittacine kuşlar, virusu vücutlarında 1 yıl gibi uzun bir süre taşıyarak önemli rol oynamaktadır. İnsanlar ve enfekte karkasları ağızlarında taşıyan köpek ve kediler mekanik vektör olabildikleri gibi aşırı dozda virus alan fare

ve rat gibi rodentlerin virusu vücutlarında çoğalttıkları da bilinmektedir. (Kouwenhoven, 1993).

Etkenin teşhisinde canlı hayvanlardan alınarak gönderilen, tracheal ve cloacal svab'lar veya dışkı örnekleri ile ölü hayvanlardan alınarak oluşturulan organ ve dışkı havuzlarından hazırlanarak, 9-11 günlük embriyolu tavuk yumurtalarının allantoik boşluğuna ekilen inokulumlardan yararlanılmaktadır. İnokulasyonu takiben alınan allantoik sıvılar hemaglutinasyon (HA) yönünden incelenmekte, pozitiflik durumunda, NDV spesifik antiserumların yardımı ile yapılan Hemaglutinasyon inhibisyon (HI) testi ile etken identifiye edilebilmektedir. Serolojik amaçlı teşhis çalışmalarında, Hemaglutinasyon inhibisyon ve ELISA testleri kullanılmaktadır (Seal ve ark., 1995, Aydın, 2002).

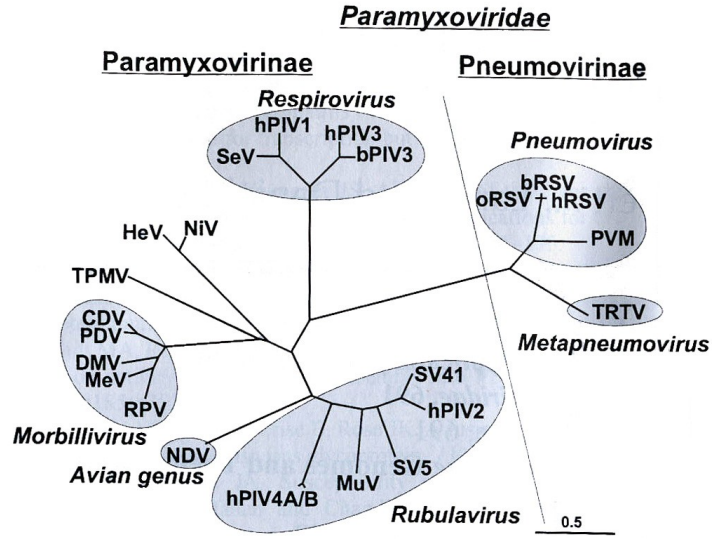
Ayırıcı teşhiste; tavuk kolerası, avian influenza, laryngotracheitis, tavuk çiçeği, psittacosis (Chlamydiosis), Mycoplasmosis, infectious bronchitis ve Pacheco's parrot disease ile bakım-besleme hataları da dikkat edilmesi gereken hastalıklar arasındadır (OIE, 2004).

Hastalığın tedavisi yoktur. Korunmada attenué canlı aşılardan ve subunit DNA aşılardan yararlanılabilmekte, genel hijyen tedbirleri tavsiye edilmektedir (Aydın, 2002; OIE, 2002)

### **1.1.1. Newcastle Virusunun Nomenclature' deki Yeri**

Newcastle Hastalığı Virus'u, Newcastle Disease Virus (NDV), ilk yapılan sınıflandırmada, Mononegavirales takımı, Paramyxoviridae ailesi, Paramyxovirinae alt ailesi içinde yeralan Paramyxovirus cinsi içinde incelenmiştir (Alexander, 1993).

Daha sonra Rubulavirus cinsi içinde incelenen virus (Regenmortel ve ark., 2000), son yapılan sınıflandırmada Avulavirus cinsi içine dahil edilmiştir (Lamb ve ark., 2000; Mayo, 2002). Şekil 1.1'de ND virusunun daha önce dahil edildiği Rubulavirus cinsi içinde bulunan diğer türler görülmektedir.



**Şekil 1.1. Rubulavirus cinsi içinde bulunan diğer türler (Rose ve Whitt, 2001);**

MuV: Mumps virus (kabakulak virusu), SV5: Simian parainfluenza virus 5, SV4: Simian parainfluenza virus 4, PIV4A/B: Human parainfluenza virus, hPIV2: Human parainfluenza virus 2.

Paramyxovirus'lar bu adı, hemagglutinasyon ve nöraminidaz aktiviteleri sebebiyle, Yunanca "para"(çevresinde) ve "myxo"(mukus) sözcüklerinin birleşmesiyle almışlardır.

Paramyxovirinae alt ailesi içinde Paramyxovirus ve Morbilli virus olmak üzere iki cins yer alır. Paramyxovirus cinsinin tip spesifik üyesi Newcastle hastalığı etkeni; Avian Paramyxovirus type-1 (PMV-1)'dir. Diğer Avian Paramyxovirus türleri Tablo 1.1' de verilmiştir (Alexander, 1993).

**Tablo 1.1. Paramyxovirus cinsi içinde bulunan diğer türler (Alexander, 1993)**

Avian Paramyxovirus 2 (Yucaipa)	PMV-2
Avian Paramyxovirus 3	PMV-3
Avian Paramyxovirus 4	PMV-4
Avian Paramyxovirus 5 (Kunitachi)	PMV-5
Avian Paramyxovirus 6	PMV-6
Avian Paramyxovirus 7	PMV-7
Avian Paramyxovirus 8	PMV-8
Avian Paramyxovirus 9	PMV-9

1926' da Doyle tarafından Newcastle Virusunun ilk izolasyonunu takiben, 1978 yılına kadar izole edilen ve serolojik olarak farklı olduğu tespit edilen 9 Avian Paramyxovirus serotipi, 1979' da Tumavo ve arkadaşlarının teklifi ile nomenclature'e Tablo 1.2'de belirtilen kriterler baz alınarak, Tablo-1.3'de

belirtildiği şekilde, PMV-1 'den PMV-9' a kadar adlandırılarak girmiştir (Alexander, 1993). Bu grup içinde yalnız PMV-1 değil PMV-2 ve PMV-3 de kanatlı patojenleri bakımından önem arz etmektedir (Alexander, 1990).

**Tablo 1.2. Newcastle viruslarının isimlendirme kriterleri (Alexander, 1993)**

1- Serotip
2- Virusun izole edildiği tür veya kuş türü
3- İzolasyonun coğrafi alanı- ülke veya eyalet
4- Referans isim veya numara
5- İzolasyon yılı

**Tablo 1.3. Avian Paramyxovirus'lardan prototip olarak kabul edilen izolatlar (Alexander, 1993)**

PMV-1 Newcastle Disease Virus
PMV-2 Chicken/ California/ Yucaipa/ 56
PMV-3 Turkey/ Wisconsin/ 68
PMV-4 Duck/ Hong Kong/ D3/ 75
PMV-5 Budgerigar/ Japan/ Kunitachi/ 75
PMV-6 Duck/ Hong Kong/ 199/ 77
PMV-7 Dove/ Tennessee/ 4/ 75
PMV-8 Goose/ Delaware/1053/ 76
PMV-9 Domestic duck/ New York/ 22/ 78

### 1.1.2. Moleküler Yapısı

Newcastle virusu; zarflı bir virustur. Zarf üzerinde iki tip çıkıntı (spike) bulunmaktadır. Bunlardan glikolize protein (glycosylated protein) yapısında olan, hemaglutinasyon ve nöraminidaz aktivitelerinden sorumlu olup, HN glycoproteinini olarak adlandırılır (Nagai ve ark.1976b).

**HN proteini;** hücre yüzeyinde bulunan ve siyalik asit içeren glikoprotein veya gangliositlere bağlanarak virusun hücreye bağlanmasında ilk basamağı oluşturur. Bu aktivite virusun eritrositleri aglutine etme özelliğinin de kaynağıdır. Etkenin eritrositleri aglutine etme özelliği, virusun teşhisi amacı ile kullanılır.

HN proteini bunun yanında nöraminidaz aktivitesine sahiptir. İnfeksiyonun ilerleyen dönemlerinde virus üzerinde ve hücre yüzeyinde bulunan siyalik asit kalıntılarının enzimatik olarak kesilmesi olan bu işlem, hücreden salınan virus partiküllerinin

kendi kendilerine birleşerek toplanmalarını önlediği gibi, aynı partikülün başka bir hücreye yeniden bağlanmasını da engeller. Siyalik asit kalıntılarının hücre yüzeyinden giderilmesinin virus partiküllerinin hücreden ayrılmasını kolaylaştırdığı da düşünülmektedir. HN proteininin bu iki fonksiyonu pH ve iyon konsantrasyonu ile yakından ilişkilidir ve ekstraselüler ortamın pH ve iyon konsantrasyonuna uyumludur. Bu durumun bu proteinlerin ekstraselüler ortamda görev yapmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nöraminidaz aktivitesi düşük pH ve iyon konsantrasyonunda optimal olarak gerçekleşmektedir (Chanock ve ark., 2001).

HN proteini hemen tüm rubulaviruslarda füzyonda da görev almaktadır. Proteinin füzyon esnasındaki görevinin, füzyon proteinin bağlanması için hücre-virus arasındaki mesafe veya pozisyonu ayarlamak olduğu düşünülmekte, ancak kesin olarak bilinmemektedir (Mirza ve ark., 1994).

HN proteini, amino ucuna yakın, yaklaşık 25 aminoasitlik hidrofobik bir parça yardımı ile hücre mebranına saplanır (Collins ve ark., 1991; Mottet ve ark., 1986).

HN proteinine ait yapı, kapsamlı olarak Rubula virus cinsi içinde bulunan Sendai virusu için incelenmiş ve proteinin; stoplazmik kuyruk, membranı geçen çapa, tripsin aktivasyonuna (cleavage) duyarlı sap ve küresel bir baştan oluştuğu görülmüştür. Küresel baş kısmı proteinin hücre dışında kalan en büyük parçasıdır, bütün biyolojik aktiviteleri üstlenir ve en önemli antijenik determinantları taşır. Elektron mikroskop altında Sendai virusuna ait baş kısmının kutu şeklinde olduğu görülmüştür (Thompson ve ark., 1988).

HN proteini NDV suşları arasında % 22 oranında korunmuş amino asit dizini içerir. Korunmuş kısmın büyük çoğunluğu küresel baş kısmında yer alır (Colman ve ark., 1993).

Membran üzerinde bulunan glikoprotein yapısındaki diğer çıkıntı, spike, **Füzyon (F) proteini** olarak adlandırılır. F proteini virusa ait zarf yapısının hücre zarına bağlanmasını ve virusun hücreye penetre olmasını sağlayan, proteindir (Nagai ve ark., 1976b).

Enfeksiyonun ilerleyen zamanlarında hücre yüzeyinde akümüle olarak sergilenen F proteini, hücreler arasında syncytium formasyonu oluşturarak hastalık etkeninin bir

hücreden diğerine lokal olarak yayılımını sağlar. SV5 virusuna ait F proteini, rekombinant bir vektör tarafından sergilendiğinde yalnız başına syncytium oluşturma özelliğine sahipken (Curt ve ark., 1992), paramyxovirus cinsi içindeki diğer türlerde belirsiz olan syncytium yapısı ancak HN proteininin de hücre yüzeyin de sergilenmesi ile belirgin hale geçer (Anne ve ark., 1994).

Paramyxovirusların bir çoğu siyalik asit reseptörlerine bağlanarak hücre içine penetre olur. Yalnız sendai virusu bağlanmak için hepatosit-spesifik asialoglycoprotein reseptörlerini de bir ara yol olarak kullanabilir (Bitzer ve ark., 1997).

F proteini; paramyxovirus cinsleri arasında değişik düzeyde korunmuş bölgelere sahiptir, daha önce Newcastle virusunun da dahil edildiği Rubulavirus grubu içinde bu oran % 25- % 51 arasında değişir (Morrison, 1988; Chambers ve ark., 1992).

F proteini tipik tip-1 glycoprotein'dir. N-ucu yaklaşık 18 amino asit uzunluğunda hidrofobik bir sinyal peptidi içerir. Bu kısım sentez sırasında sert endoplazmik retikulum membranının geçilmesine aracılık eder ve sinyal peptidaz enzimi tarafından kesilir. Carboxy ucuna yakın olarak bulunan ikinci hidrofobik bölge ise, proteinin demir atma (anchor) şeklinde membrana saplanmasını sağlar. Carboxy ucu 23 amino asitten oluşur ve F proteinin sitoplazma içindeki kuyruğunu oluşturur (Chanock ve ark., 2001).

F proteini virion morfogenezisi sırasında yalnız başına M proteini ve nükleokapsit arasındaki bağı kurmak için yeterli görünmektedir (Stricker ve Roux , 1991).

Tipik bir membran proteini olarak F proteini de inaktif prekürsör, F<sub>0</sub>, şeklinde sert endoplazmik retikulumda sentezlenir ki burada glikolizasyon, sinyal peptidin kesilmesi, disülfid bağlarının şekillenmesi, katlanma, yeniden düzenlenme gibi takip eden modifikasyonlar da gerçekleşmektedir. Bu aşamadan sonra viriona ait tek bir çıkıntı, spike, olarak sentezlenen oligomer, exocytic yol yardımı ile membrana taşınır (Morrison ve ark., 1985; Sechoy ve ark., 1987).

F<sub>0</sub>, konakçı hücreye ait tripsin benzeri endoproteazlar yardımı ile birbirlerine halen disülfid bağları ile bağlı olan F1 ve F2 altünitelerine kesilerek füzyojenik forma dönüştürülür. F proteininin F1 ve F2 alt ünitelerine bölünmesi virus süşunun

infektivitesi için şarttır, doku tropizmi ve patogenezi üzerinde de önemli rol oynar (Chanock ve ark., 2001).

Kesilme, molekülün yapısında değişimlere sebep olur ve bu değişim, monoklonal antikorlarla etkileşim ve deterjan bağlama özelliklerine tesir eder (Hsu ve ark., 1981).

Kesim sonucu oluşan F1 amino ucu, füzyon peptidi olarak adlandırılan integral bir hidrofobik bölge olup, paramyxoviruslar içinde en yüksek düzeyde korunmuş parçadır. Proteinin hidrofobik yapıda ve alfa helikal şekilde oluşu, kesim işlemi ile amino ucunun açığa çıkması ve hidrofobikliğin artması, F1 proteinine ait amino ucunu taklit eden sentetik peptitlerin füzyonu bloke etmesi ve parça spesifik mutasyonların alfa helikal yapıyı arttırıcı tesirlerinin proteinin füzyon kabiliyetini arttırması olarak özetlenen dört sebep, F1 proteinin füzyon işlemi sırasında membran penetrasyonunda direkt olarak görev yaptığıının en önemli delilleri sayılmıştır (Hsu ve ark., 1981; Ogasawara ve ark., 1992).

Karbonhidratsız protein olan **Matrix proteini (M)**; nükleokapsit ile hücre zarı arasında bağlantı kurarak virusun hücre dışına salınmasında rol oynar. Öyle ki; hücre içinde sentezlenen matrix proteini yalnız başına henüz genetik materyal içermeyen boş virionların hücre dışına salınımını sağlayabilir (Nagai ve ark.1976a; Coronel ve ark. 1999).

**Nükleokapsit proteini (NP)**; ancak P proteini ile çözünebilir bir kompleks oluşturduğunda nükleokapsiti oluşturabilir. Tek başına böyle bir özelliği yoktur (Buchholz ve ark., 1993). Molekülün % 75'ini oluşturan N ucu (N-terminal), cinse ait türler arasında oldukça korunmuş bir parça olup P proteini ile oluşturulan komplekste görev yapar. % 25'lik parçayı oluşturan, değişken yapıya sahip C ucu (C-terminal), kompleks oluşumu için gerekli olmamasına karşın, kalıp (template) görevi görür (Buchholz ve ark., 1994).

**Phosphoprotein (P)**; transcriptase/replicase'in integral parçasını oluşturmakla birlikte görevi tamamı ile anlaşılamamıştır (Bowman ve ark., 1999).



**Large protein (L);** virusa ait en büyük polimeraz alt ünitesini oluşturur. Çok fonksiyonlu bir protein olup, metilasyon, RNA sentezi, kaplama (capping) işlevleri için katalizör görevi görür (Chanock ve ark., 2001).

İnfeksiyon sonrasında alınan bir serumda virusa ait tüm proteinlere karşı oluşmuş antikorlar bulunmasına karşın, bunlardan yalnız F ve HN proteinlerine karşı oluşanlar nötralizan aktiviteye sahiptirler ve plak formasyon, hemadsorbsiyon ve cyto pathic effect gibi virusların hücre kültürlerinde oluşturdukları etkiyi bloklama prensibine dayalı testler ile titreleri ölçülebilir (Chanock ve ark., 2001).

HN ve/veya F proteinlerine karşı oluşan antikorlar koruyucudur (Alexander, 1993).

### 1.1.3. Füzyon, F, Geni ve Patojenitedeki Önemi

Newcastle virusu, negatif sarmallı, tek iplikçikli, 15 kb uzunluğunda RNA' ya sahiptir. Moleküler yapıyı oluşturan 6 protein, genetik materyalde 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' şeklinde dizilmiştir (Bu ve ark., 2005).



Şekil 1.2. Newcastle virusuna ait genomu oluşturan proteinlere ait şema (Bu ve ark., 2005)

Newcastle virusuna ait F geni ve bu genin kodladığı F proteini virusun patojenitesini belirlemede büyük rol oynamaktadır. F proteinine ait cleavage site bölgesinde bulunan 117. amino asitin Fenilalanin veya Leusin oluşuna göre virusun patojen-velojenik veya apatojen-lentojenik olduğu belirlenmektedir.

Tablo 1.4 'de yüksek virulensli ve düşük virulensli virus suşlarında 111-119. amino asitler arasında kalan bölgede "fenilalanin" ve "leusin" farklılığı görülmektedir. Yüksek virulens'li suşlar "fenilalanin" içerirken düşük virulens'li olanlar aynı bölgede "leusin" içermektedir.

Bu durum Office International des Epizooties (OIE) tarafından açık bir teşhis kriteri olarak kabul edilmiş olup OIE’de geçen ifade olduğu gibi aşağıya alınmıştır.

“F genine ait 111-119. amino asitler arasında kalan bölgede 113. aminoasitin arginine (R) olması, 115 ve 116. aminoasit pozisyonlarında iki adet temel aminoasitin bulunması ve 117. amino asitin fenilalanin (F) olması durumunda etken patojen-velojenik olarak değerlendirilir (OIE, 2002)”.

**Tablo 1.4. F genine ait cleavage site bölgesinin amino asit dizini (Aldous ve Alexander, 2001)**

<b>Virus Suşu</b>	<b>Virulensi</b>	<b>Cleavage Site Amino Asit Dizini (111-119)</b>	<b>Referans</b>
Herts 33	Yüksek	-G-R-R-Q-R-R*F-I-G-	Toyoda ve ark. (1993)
Essex 70	Yüksek	-G-R-R-Q-K-R*F-V-G-	Collins ve ark. (1989)
135/93	Yüksek	-V-R-R-K-K-R*F-I-G-	Oberdörfer ve Werner (1998)
617/83	Yüksek	-G-G-R-Q-K-R*F-I-G-	Collins ve ark. (1994)
34/90	Yüksek	-G-K-R-Q-K-R*F-V-G-	Collins ve ark. (1993)
Beaudette C	Yüksek	-G-R-R-Q-K-R*F-I-G-	Collins ve ark. (1993)
La Sota	Düşük	-G-G-R-Q-G-R*L-I-G-	Collins ve ark. (1993)
D 26	Düşük	-G-G-K-Q-G-R*L-I-G-	Toyoda ve ark. (1989)
MC 110	Düşük	-G-E-R-Q-E-R*L-I-G-	Collins ve ark. (1993)
154/98	Düşük	-G-R-R-Q-G-R*L-I-G-	Alexander (2001)

Yukarıda anlatılan sebeplerle F proteinine ait cleavage site bölgesinin amino asit dizinin tayini uzun yıllar bir çok araştırmacının amacı olmuştur. Bu amaçla, bu çalışmada olduğu gibi nükleotid sekans yöntemini kullanan araştırmacılar bulunduğu gibi, F proteinine ait F1 ve F2 alt yapılarının, C ve N terminuslarını sentetik olarak sentezleyip bunlara karşı üretilen monoklonal antikorlar yardımı ile patojenite üzerinde çalışan araştırmacılar da bulunmaktadır (Scanlon ve ark., 1999).

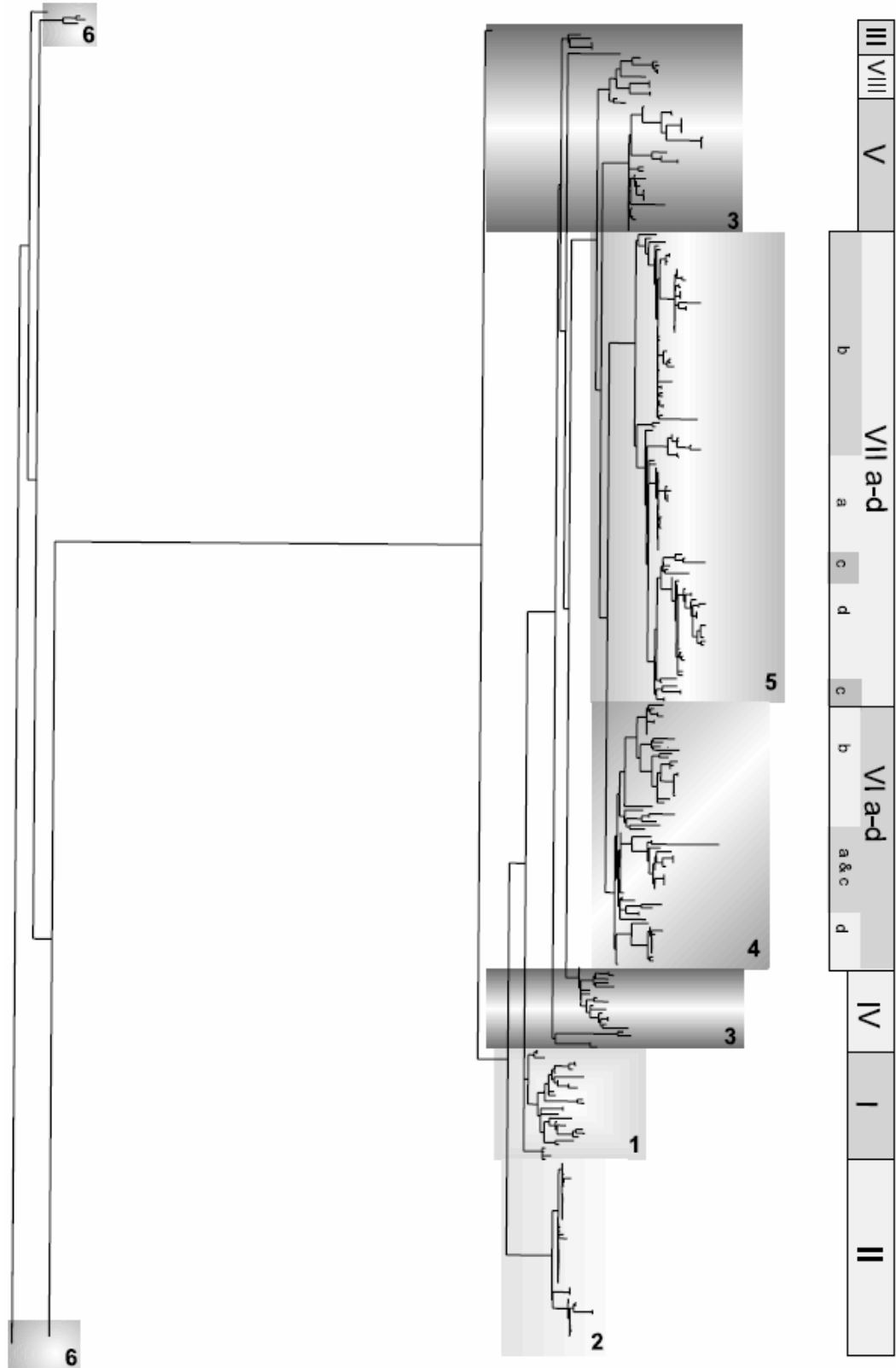
Virulent suşlarda bulunan F proteini, konakçının birçok doku hücrelerinde bulunan proteazlarla F1 ve F2 alt yapılarına bölünürken, non-virulent olanlar yalnız typsins-benzeri enzimlere sahip hücrelerde bölünebilir ki bu durum virulent suşların konakçının içinde hızla yayılmasını açıklamaktadır. Sekans çalışmaları sonucu bu bölgenin amino asit dizininin tespiti, proteazlarla yapılan bu ayrımın bölgenin amino asit dizinindeki farklılıktan kaynaklandığını açıkça ortaya koymuştur (Glickman ve ark., 1988; Toyoda ve ark., 1987; Kant ve ark., 1997’den).

F proteini kesim bölgesinde (cleavage site) bulunan bağların kesilerek proteinin F1 ve F2 olarak iki parçaya ayrılmasının virusun patojenitesinde oynadığı önemli rol,

Nagai ve Klenk'in 1977'de yapmış olduğu bir deneyle ortaya konmuştur. Adı geçen iki bilim adamı ayrılmamış (uncleaved) F proteinine ( $F_0$ ) sahip NDV virionlarını tripsin ile muamele ederek infeksiyöz olmayan bu partikülleri, infeksiyöz duruma geçirmişlerdir (Millar ve ark., 1988).

Ulster gibi virulensi çok düşük olan suşlarda HN proteini de F proteini gibi, aktive olmak için glikopeptid yapısının proteolitik olarak ayrılmasına ihtiyaç duyar (Garten ve ark., 1980; Millar ve ark., 1988'den). Yüksek virulentli suşlarda ise böyle bir ayrımaya ihtiyaç yoktur (Millar ve ark., 1988).

F proteinine ait cleavage site bölgesini içine alan yaklaşık 400 bp'lik bir bölgenin baz dizini filogenetik açıdan yapılan çalışmalarda da büyük önem arz etmektedir. Bu bölge kullanılarak yapılan filogenetik sınıflandırmaların doğruluğu Aldous ve ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışma ile ortaya konmuştur. Bu çalışmada dünya üzerinde değişik kıta ve ülkelerden izole edilerek daha önce MAb panelleri yardımı ile sınıflandırılan 338 NDV suşu, F genine ait 375 bp uzunlukta bir parçanın baz dizinine göre filogenetik olarak incelenmiş ve her iki sınıflandırma arasında kesin bir uyum olduğu görülmüştür. Şekil 1.3'de Aldous tarafından çizilen genetik ağaç ve yapılan genetik gruplandırma görülmektedir. Şeklin sağ tarafında bulunan sütun daha önce MAb panelleri yardımı ile oluşturulan ve romen rakamları ile adlandırılan 8 gurubu göstermektedir. Aldous tarafından temelini daha önce MAb panelleri ile yapılan sınıflandırmanın oluşturduğu bu genetik gruplandırma, bu çalışmada yapılan filogenetik incelemelerin de temelini oluşturmaktadır. Bu çalışmada DNA dizini belirlenen 14 NDV suşu, Aldous tarafından Şekil 1.3'de sınıflandırılması yapılmış olan 328 NDV suşu ile karşılaştırılmış ve Türkiye'den izole edilen bu suşların hangi genetik guruba dahil edildiği tespit edilmiştir. Aldous'un çalışmasında incelediği 328 NDV suşuna ait kapsamlı bilgi Tablo 1.5 ve Tablo 1.6'da verilmiştir. Aldous çalışmada kullandığı virus suşlarını adlandırırken kapsamlı bilgileri içinde toplayan kısa bir etiket sistemi kullanmıştır. Buna göre birinci harf, virusun ait olduğu MAb grubunu, iki ve üçüncü harfler, ülkeyi, dört ve beşinci harfler, izolasyon konakçısını, daha sonra gelen iki sayı, izolasyon yılını ve sonda bulunan üç haneli rakam da virusun çalışma içindeki sırasını göstermektedir. Tablo 1.6'da verilen NDV suşları Aldous tarafından Dünya Gen Bankasından edinilerek çalışmaya dahil edilmiş olup Aldous tarafından etiketlenmemiştir.



**Şekil 1.3.** Aldous tarafından 2003 yılında yapılan filogenetik gruplandırma: Sağda bulunan sütun, romen rakamları ile isimlendirilen MAb gruplarını göstermektedir.

**Tablo 1.5. Aldous'ın 2003 yılında yaptığı çalışmada DNA dizinini belirleyerek genetik ağaç çizimi için kullandığı 174 NDV suşuna ait bilgiler**

Etiket	Referens No	Ülke	Konakçı	mAb grubu	Genetik Grup	Erişim No'su
DPLBR96001	AV 1185/96 G91	Polonya	Evcil tavuk	D-benzeri	2	AY 175693
EZMCK95002	AV 72/95 (B/K)	Zambiya	Evcil tavuk	E	2	AY 175708
EZA*/98003	AV 1141/98 10603	Güney Afrika	-	E	2	AY 175661
EES*/94004	AV 435/94 (98)	İspanya	-	E	2	AY 175701
EZAOS95005	AV 1433/95 D1702-95	Güney Afrika	Deve kuşu	E-benzeri	2	AY 135740
ECHBR99006	AV 1030/99 T-1350	İsviçre	Evcil tavuk(lthal)	E/B1	2	AY 175697
EBROS98007	AV 322/98 40/97	Brezilya	Deve kuşu	E/LS	2	AY175695
EZMCK95008	AV 72/95 B-T-(K) AC	Zambiya	Evcil tavuk	E	2	AY 175709
BDEDK95009	AV 205/95 17094	Almanya	Ördek	B	2	AY 175671
EPLBD96010	1185/96 E91	Polonya	Evcil tavuk	E	2	AY175706
EUKCK98011	AV 1105/98 PC 11098	İngiltere	Evcil tavuk	E/B1	2	AY175707
ECHBR97012	AV 717/97 H948/97	İsviçre	Evcil tavuk	E/B1	2	AY 175696
EDEPA94013	AV 205/95 190/94	Almanya	Papağan	E/B1	2	AY 175700
FITCK94014	AV 204/94 T77	İtalya	Evcil tavuk	F	2	AY 175714
FITSP94015	AV 225/94 NRV 184/2/INT	İtalya	Serçe	F	2	AY 175716
ENLCK96016	AV 333/96 H404	Hollanda	Evcil tavuk	E/LS	2	AY 175705
EITBR95017	AV 1257/95 124/95	İtalya	Evcil tavuk	E/B1	2	AY 175703
EDECA94018	AV 205/95 191/94	Almanya	Kanarya	E/B1	2	AY 175699
DCADK99020	AV 365/99 990403	Kanada	Ördek	D-benzeri	2	AY175686
DINDK94021	AV 374/94 622	Hindistan	Ördek	D	2	AY 175691
GNZDK98025	AV 963/98 ndv/Ördek/NZ5/97	Yeni Zelenda	Ördek	G-benzeri	1	AY 175726
/AUCK98026	AV 1236/98 1238	Avusturalya	Evcil tavuk	G-benzeri	1	AY 175658
/AUCK98027	AV 1236/98 1249	Avusturalya	Evcil tavuk	G-benzeri	1	AY 175659
/AUCK98028	AV 1236/98 1154	Avusturalya	Evcil tavuk	G-benzeri	1	AY 175660
GDEDK83030	AV 72/83 1128/6/85	Almanya	Evcil Ördek	G	1	AY 175718
GMYDK97031	AV 892/97 F104597	Malezya	Ördek	G-benzeri	1	AY175719
GIEDK95032	AV 1104/94 34/95	İrlanda	Ördek	G	1	AY 175722
2NOCK93033	AV 328/94 93/08/856	Norveç	Evcil tavuk	C2	1	AY 175645
BAEOS98034	AV 1009/98 169.1668-98	Birleşik Arap Emirlikleri	Deve kuşu	B	4c	AY 175666
BSACK89036	AV 595/89 V61	Suudi Arabistan	Evcil tavuk	B	4c	AY 175680
BBECK97037	AV 911/97 97-115 VB	Belçika	Evcil tavuk	B	4c	AY 135741
JAefa96038	AV 1196/96 18	Birleşik Arap Emirlikleri	Şahin	J-benzeri	4a	AY 175738
BBGPI95039	AV 1269/98 Novo Selo/95	Bulgaristan	Güvercin	B	4d	AY 135742
1NIPH97041	AV 1220/97 VF-97-4291 Trac	Kuzey İrlanda	Sülün	C1	5b	AY 175634
DINCK96042	AV 198/96 67	Hindistan	Evcil tavuk	D	5b	AY 175690
1IRPO96043	AV 86/96 FB-2	İran	Evcil tavuk	C	5b	AY 175627
1ZAOS95044	AV 990/99 95-1145	Güney Afrika	Deve kuşu	C1	5b	AY 175640
JPTCK94045	AV 549/94 2127/94	Portekiz	Evcil tavuk	J-benzeri	5b	AY 175740
ASEPA90046	AV 1111/92 X 988	İsviçre	Papağan	A	5b	AY 175650
1CZCK96048	AV 677/96 4202/96	Çek Cumhuriyeti	Evcil tavuk	C1	5c	AY 135743

Tablo 1.5. Devam

Etiket	Referens No	Ülke	Konakçı	mAb grubu	Genetik Grup	Erişim No'su
ACAPC90050	AV 1111/92 1478/90	Kanada	Pelikan	A	3c	AY 175631
ACAGL90051	AV 1606/91 1462/90	Kanada	Martı	A	3c	AY 175628
ACACO90052	AV 1606/91 1463/90	Kanada	Karabatak	A	3c	AY 175629
ACACO90053	AV 1111/92 1479/90	Kanada	Karabatak	A	3c	AY 175630
BUSTY92054	AV 1138/92 43084	USA	Hindi	B	3c	AY 175639
AUSCO97055	AV 922/97 922	USA	Karabatak	A	3c	AY 175780
ATZCK95056	AV 1300/95 MG-10-04-C	Tanzanya	Evcil tavuk	A	3c	AY 175653
ATZCK95057	AV 1300/95 MG-10-05-C	Tanzanya	Evcil tavuk	A	3c	AY 175654
GATZDK95058	AV 1300/95 TB/02/13-G	Tanzanya	Ördek	G	4a	AY 175655
1ITTY94060	AV 675/94 242VV	İtalya	Hindi	C1	3d	AY 135744
-SGCK99061	AV 890/99 F108	Singapur	Evcil tavuk	-c	3a	AY 175775
-SGCK99062	AV 890/99 F21	Singapur	Evcil tavuk	-	3a	AY 135745
PDEPI99063	AV 819/99 1383	Almanya	Güvercin	P	4b	AY 175754
PUKPI99064	AV 921/99 vla-win	İngiltere	Güvercin	P	4b	AY 175770
PUKPI99065	AV 814/99	İngiltere	Güvercin	P	4b	AY 175779
1NICK97068	AV 283/97 VF97-708A	Kuzey İrlanda	Evcil tavuk	C1	5b	AY 175633
1NICK97069	AV 283/97 VF97-728	Kuzey İrlanda	Evcil tavuk	C1	5b	AY 135746
BMVBU87078	AV 1094/90 144	Malezya	Budgerigar	B	5b	AY 175677
BITPI87079	AV 1226/89 190/87	İtalya	Güvercin	B	3c	AY 135747
ATZDK95080	AV 1300/95 TB-02-24-D	Tanzanya	Ördek	A	3c	AY 175656
2NOBD94081	AV 1305/94 94-08-04429	Norveç	Evcil tavuk	C2	1	AY 175644
JPTCK96082	AV 1375/96 4355/96	Portekiz	Evcil tavuk	J	5b	AY 175741
HDKCK97083	AV 1501/97 97-77893	Danimarka	Evcil tavuk	H	2	AY 175731
BAECK92084	AV 1573/92 628/92	Birleşik Arap Emirlikleri	Evcil tavuk	B	4c	AY 175662
BAEPE92085	AV 1573/92 804/90	Birleşik Arap Emirlikleri	Göçmen Şahin	B	4c	AY 175667
BUSC092086	AV 1138/92 40140	USA	Karabatak	B	3c	AY 175637
DINQU*/087	AV 33/99 Q1A	Hindistan	Bıldırcın	D	2	AY 175692
BAECK95088	AV 51/96 40-1084-95	Birleşik Arap Emirlikleri	Evcil tavuk	B	4c	AY 175663
GIEPH99089	AV 740/99 39/99	İrlanda	Sülün	G	1	AY 175723
HTWDK95090	AV 80/97 D-8-13	Tayvan	Ördek	H	2	AY 175735
PZAPI99091	AV 888/99 MZ-5-99	Güney Afrika	Güvercin	P	1	AY 175774
/DEF095092	AV 395/96 143/95	Almanya	Süs tavuğu	-	5a	AY 175687
GTZCK95094	AV 1300/95 MG-04-08C	Tanzanya	Evcil tavuk	G	3c	AY 175728
/CACO92095	AV 1507/92 2330	Kanada	Karabatak	-	3c	AY 175681
1NIPH97097	AV 1220/97 4246	Kuzey İrlanda	Sülün	C1	5b	AY 175635
1USCO92098	AV 210/93 51234-1	USA	Karabatak	C1	3c	AY 175638
JAESA90099	AV 1573/92 120/90	Birleşik Arap Emirlikleri	Saker	J	4a	AY 135748
/AU*/90100	AV 1817/90 8509-20-1215	Avustralya	-	-	1	AY 175657

Tablo 1.5. Devam

Etiket	Referens No	Ülke	Konakçı	mAb grubu	Genetik Grup	Erişim No'su
1AEOS99101	AV 1017/99 246	Birleşik Arap Emirlikleri	Deve kuşu	C1	5d	AY 175632
PDEPI94102	AV 205/95 300/94	Almanya	Güvercin	P	4b	AY 135749
PDKPI95103	AV 654/95 81731	Danimarka	Güvercin	P	4b	AY 175755
JPTBR95104	AV 851/95 3159/95	Portekiz	Evcil tavuk	J	5b	AY 175739
LSECE95106	AV 450/95	İsviçre	Kontrol Yumurta	L	1	AY 175742
PTRPI95107	AV 927/95 coven 7	Türkiye	Güvercin	P	4a	AY 175763
EZWOS95108	AV 862/95 5249	Zimbabve	Deve kuşu	E	2	AY 175710
BAEPI99109	AV 1017/99 237	Birleşik Arap Emirlikleri	Güvercin	B	4c	AY 175668
ECHBR99110	AV 1030/99 T1350	İsviçre	Evcil tavuk	E	2	AY 175698
-/TRCK95111	AV 927/95 coven 2	Türkiye	Evcil tavuk	-	4b	AY 175776
GNZDK76112	AV 1031/99 131/76	Yeni Zelanda	Ördek	G	1	AY 175727
GNZCK95113	AV 1031/99 8043/95	Yeni Zelanda	Evcil tavuk	G	1	AY 175725
BAECK95114	AV 51/96 4611-59-2-95	Birleşik Arap Emirlikleri	Evcil tavuk	B	4c	AY 175664
GIDCK943115	AV 732/94 TCS 1022	Endonezya	Evcil tavuk	G	2	AY 175721
-UKPI89116	AV 1528/88	İngiltere	Güvercin	-	4b	AY 175778
EFRPI99117	AV 1058/99 99143	Fransa	Güvercin	E	2	AY 175702
FMYCK83119	AV 1094/90 442	Malezya	Evcil tavuk	F	2	AY 175717
GNP*/95120	AV 400/95	Nepal	-	G	2	AY 175724
BSACK95121	AV 412/95 D	Suudi Arabistan	Evcil tavuk	B	4c	AY 175694
-DEFO96123	AV 395/96 142/95	Almanya	Evcil tavuk	-	5a	AY 175748
PUKPI89124	AV 1528/89	İngiltere	Güvercin	P	4b	AY 175768
PUKPI84125	AV 2145/84	İngiltere	Güvercin	P	4b	AY 175766
PUKPI90126	AV 2162/90	İngiltere	Güvercin	P	4b	AY 175769
-UKDK99127	AV 813/99	İngiltere	Ördek	-	1	AY 175777
PUKP199128	AV 814/99	İngiltere	Güvercin	P	4b	AY 175771
-ITPI99129	AV 941/99 3430	İtalya	Güvercin	-	1	AY 175737
PUKPI99130	AV 960/99	İngiltere	Güvercin	P	4b	AY 175772
PUKPI99131	AV 992/99 vla-win	İngiltere	Güvercin	P	4b	AY 175773
DINCK94135	AV 374/94 302	Hindistan	Evcil tavuk	D	2	AY 175688
DINCK94136	AV 374/94 306	Hindistan	Evcil tavuk	D	2	AY 175689
FITBR94137	AV 340/94 NRV 213	İtalya	Evcil tavuk	F	2	AY 175713
FITPH94138	AV 567/94 19/94	İtalya	Sülün	F	2	AY 175715
NCHCK94139	AV 295/94 9231	İsviçre	Evcil tavuk	NE	5a	AY 175746
BCACO75140	AV 387/93 75-457	Kanada	Karabatak	B	3c	AY 175670
1ZAOS99141	AV 990/99 96-0842	Güney Afrika	Deve kuşu	C1	5b	AY 175641
BAEFA99142	AV 1017/99 241	Birleşik Arap Emirlikleri	Şahin	B	4c	AY 175665
NESCK94143	AV 435/94 103	İspanya	Evcil tavuk	NE	5a	AY 175749
BPEBR95144	AV 120/95 spleen	Peru	Evcil tavuk	B	4c	AY 175679
2UKPH88145	AV 1491/88 2-9-88 NDV	İngiltere	Sülün	C2	1	AY 175646
-PTTY91146	AV 929/92 852691	Portekiz	Hindi	-	5b	AY 175761
NDECK94147	AV 1041/94 R1-93	Almanya	Evcil tavuk	NE	5a	AY 175747
LIETY96148	AV 506/96 VF-96-2065/2	İrlanda	Hindi	L	1	AY 135750

Tablo 1.5. Devam

Etiket	Referens No	Ülke	Konakçı	mAb grubu	Genetik Grup	Erişim No'su
FBG*/93149	AV 804/93 stremzi	Bulgaristan	-	F	5b	AY 175711
-PTCK93150	AV 546/93 113/93	Portekiz	Evcil tavuk	-	2	AY 175762
LUKDU90152	PD 42/90	İngiltere	Ördek	L	1	AY 175743
FESCK86153	AV 784/86	İspanya	Evcil tavuk	F	2	AY 175712
LUSLO83156	AV 1297/83	USA	Gerdanlı dalgıç	L	1	AY175744
HDEDK87157	AV 72/93 252	Almanya	Ördek	H	1	AY 175729
NBECK92158	AV 381/92 92/81	Belçika	Evcil tavuk	NE	5a	AY 135751
ABRCK83160	AV 1769/90 5050	Brezilya	Evcil tavuk	A	3c	AY 175649
2ESCK88161	PD 351/88 2195	İspanya	Evcil tavuk	C2	1	AY 175642
AALCK90163	AV 247/91 berati	Cezayir	Evcil tavuk	A	3c	AY 175647
ADEHU87164	AV 1270/86 bettina	Almanya	İnsan	A	3c	AY 175651
BHKPI89165	AV 889/89 A30981	Hong Kong	Güvercin	B	3b	AY 175672
BINLA40166	Mukteswar	Hindistan	Laboratuvar derivasyonu	B	3a	AY 175676
-HU*/84167	AV 1052/84	Macaristan	-	-	3c	AY 175674
BBGCK68168	AV 1881/91 haskovo	Bulgaristan	Evcil tavuk	B	3b	AY 175669
BINCK94170	AV 374/94 796	Hindistan	Evcil tavuk	B	5b	AY 175675
ABRCK77171	AV 1769/90 3107	Brezilya	Evcil tavuk	A	3c	AY 175648
BHKPI89172	AV 889/90 A28759	Hong Kong	Güvercin	B	4d	AY 175673
APECK92173	AV 1474/92 2	Peru	Evcil tavuk	A	5b	AY 135752
AESCK90174	AV 2398/90 rota I/90	İspanya	Evcil tavuk	A	5b	AY 175652
BMYCK82175	AV 1094/90 138	Malezya	Evcil tavuk	B	5b	AY 175678
BSDCK72176	AV 2203/91 19	Sudan	Evcil tavuk	B	3b	AY 135753
PITTD00177	AV 434/00 2736	İtalya	Kaplumbağ a kumrusu	P	4b	AY 175759
1ITCK00179	AV 434/00 3013	İtalya	Evcil tavuk	C1	5b	AY 175683
EITCK00182	AV 98/00 800	İtalya	Evcil tavuk	E	2	AY 175704
1SACK00184	AV 237/00 M	Suudi Arabistan	Evcil tavuk	C1	5d	AY 135754
-/IECK90187	AV 2086/90 PV 34/90	İrlanda	Evcil tavuk	-	6	AY 135757
HFRDK77188	MC110	Fransa	ShelÖrdek	H	6	AY 135758
HDEDK89189	AV 72/93 384/4/89	Almanya	Sentinel Ördek	H	6	AY 175730
HDKOS97190	AV 1501/97 97-77893	Danimarka	Deve kuşu	H	6	AY 175733
HIECK87191	AV 2038/87 ESPEY	Kuzey İrlanda	Evcil tavuk	H	6	AY 135759
HDKCK97192	AV 518/98 97-77893 POOL 2	Danimarka	Evcil tavuk	H	6	AY 175732
HTWDK95193	AV 80/97 D-8-13	Tayvan	Ördek	H	6	AY 175736
HNZDK98194	AV 963/98 ndv/Ördek/NZ/1/97	Yeni Zelenda	Ördek	H	6	AY 175734
GET*/99197	Panvac (2/P2 UQ vet path Aus)	Etiyopya	-	G	1	AY 175720
PSAPI98201	AV 316/98 ARABIA 8	Suudi Arabistan	Güvercin	P	4b	AY 175760
PDECT95204	AV 901/95 93-549	Almanya	Cockatoo (papağan)	P	4b	AY 175752
PAEPI96210	AV 1381/96 UEA-85	Birleşik Arap Emirlikleri	Güvercin	P	4b	AY 175751
PDEPI94216	AV 205/95 R4-94	Almanya	Güvercin	P	4b	AY 175753
PIEPI00242	AV 623/00-0.9701	İrlanda	Güvercin	P	4b	AY 175756



Tablo 1.5. Devam

Etiket	Referens No	Ülke	Konakçı	mAb grubu	Genetik Grup	Erişim No'su
-NOCK00245	AV 620/00 nor	Norveç	Evcil tavuk	-	1	AY 175750
DZAOS94265	AV 992/94 0915/94	Güney Afrika	Deve kuşu	D	2	AY 135755
2FRDK76266	MB20*/STOCK	Fransa	Ördek	C2	1	AY 175643
ACAGL90270	AV 1606/91 N903455V1462/90	Kanada	Martı	A	3c	AY 135756
CIDCK96271	AV 732/94 W3	Endonezya	Evcil tavuk	C1	5a	AY 175682
1Q-HO99272	AV 1124/99 HB2489	Pakistan	Houbara	C1	5b	AY 175636
LUSLO97273	AV 1297/F3 Gerdanlı dalgıç HA	USA	Gerdanlı dalgıç	L	1	AY 175745
PUKPI83279	AV 884/83 */jenks	İngiltere	Güvercin	P	4b	AY 175764
PUKPI88284	AV 1745/88 vla-win	İngiltere	Güvercin	P	4b	AY 175767
PITPH95294	AV 3/96 364-95	İtalya	Sülün	P	4b	AY 175758
PUKPI83299	AV 913/83 vla-car	İngiltere	Güvercin	P	4b	AY 175765
PIEP196302	AV 710/96 PV48/96	İrlanda	Güvercin	P	4b	AY 175757
-CNOS*/303	AV 1060/00-8	Çin	Deve kuşu	-	5d	AY 175685
-CNBR*/304	AV 1060/00-16	Çin	Evcil tavuk	-	5d	AY 175684

**Tablo 1.6. Aldous'ın 2003 yılında yaptığı çalışmada Dünya Gen Bankası'ndan sağlayarak genetik ağaç çizimi için kullandığı 164 NDV suşuna ait bilgiler**

Etiket	Konakçı	Yıl	Ülke	MAb grubu	Genetik Grup	Erişim no
99-MB*-13	-	-	-	-	2	AF277323
99-MB-16	-	-	-	-	2	AF349433
99 MB 45-47	-	-	-	-	3c	AF263615
A 24-96	Evcil tavuk	1996	Avusturya	VI	4d	AF001133
AE2321-96	Keklik	1996	Birleşik Arap Emirlikleri	VIIb	5b	AF109884
AF*-2240	Evcil tavuk	-	Malezya	VIII	3d	AF048763
AG-68	Evcil tavuk	1968	Irak	VI	4a	AF001108
ASTR-74	Evcil tavuk	1974	Rusya	VIa	4a	Y19012
Avusturalya-32	Evcil tavuk	1932	Avusturalya	III	3a	M21881
B1-47	Evcil tavuk	1947	USA	II	2	M24695
B 14-93	Evcil tavuk	1993	Belçika	VII	5a	AF001121
B 18-94	Evcil tavuk	1994	Belçika	VII	5a	AF001122
B 19-95	Evcil tavuk	1995	Belçika	VII	5a	AF001123
B 9-93	Evcil tavuk	1993	Belçika	VII	5a	AF001120
Beaudette-45	Evcil tavuk	1945	USA	II	2	M24697
BG 30-95	-	1995	Bulgaristan	VIIb	5b	AF136781
BG 31-96	Evcil tavuk	1996	Bulgaristan	VIIb	5b	AF136782
BJ-3-97	-	-	-	-	4d	AF400616
CA 1085-71	Evcil tavuk	1971	USA	V	3c	AF001106
CH 1-95	Evcil tavuk	1995	İsviçre	-	4d	AF001132
CH 2000	-	-	-	-	5d	AF358788
CH 62-96	Evcil tavuk	1996	İsviçre	VIIc	5c	AF109880
CH 98-1	-	-	-	-	4b	AF358785
CH 98-3	-	-	-	-	5d	AF364835
CH 99	-	-	-	-	5d	AF358787
CH A7-97	-	-	-	-	5c	AY028995
CN DB3	Evcil tavuk	-	-	III	3a	AF079322
CN DB5	-	-	-	-	2	AF079323
CZ 3898-96	Evcil tavuk	1996	Çek Cumhuriyeti	VIIc	5c	AF109883
D 16-93	Sülün	1993	Almanya	VII	5a	AF001113
D 19-94	Evcil tavuk	1994	Almanya	VII	5a	AF001114
D 23-95	Evcil tavuk	1995	Almanya	VII	5a	AF001115
D 24-95	Evcil tavuk	1995	Almanya	VII	5a	AF001116
D 26-76	Ördek	1976	Japonya	I	1	M24692
D 82-94	Evcil tavuk	1994	Almanya	VII	5a	AF001117
D 83-95	Evcil tavuk	1995	Almanya	VII	5a	AF001118
D 85-96	Evcil tavuk	1996	Almanya	VII	5a	AF001119
DE 143-95	Evcil tavuk	1995	Almanya	VIIa	5a	AF109881
DK 1-95	Evcil tavuk	1995	Danimarka	VI	4d	AF001129
DK 6-95	Deve kuşu	1995	Danimarka	VI	4d	AF001130
DK 76720-95	Evcil tavuk	1995	Danimarka		4d	AF109878
E 1-93	Evcil tavuk	1993	İspanya	VII	5a	AF001126
F-48-E9	Evcil tavuk	-	-	III	3a	AF163440
F11001-96	Goosander (Büyük tarak dış)	1996	Fillandiya	-	5b	AF091623
Field Sülün	Sülün	1962	İngiltere	-	3a	Z12109
GB 1168-84	Güvercin	1984	İngiltere	VIb	4b	AF109885
GS 2-98	Evcil tavuk	-	Batı Çin	-	5d	AF378249

Tablo 1.6. Devam

Etiket	Konakçı	Yıl	Ülke	MAb grubu	Genetik Grup	Erişim no
GX 1-97	Evcil tavuk	-	Batı Çin	-	5d	AF378254
GX 2-98	Evcil tavuk	-	Batı Çin	-	5d	AF378255
GX 3-98	Evcil tavuk	-	Batı Çin	-	5d	AF378256
H 10-72	Evcil tavuk	1972	Macaristan	V	3c	AF001107
H 310-82	Evcil tavuk	1982	Macaristan	VI	4d	AF001112
Herts-33	Evcil tavuk	1933	İngiltere	IV	3b	M24702
HLJ 4-95	-	-	-	-	4d	AF378259
HUB 1-91	-	-	-	-	5c	AF378257
HUN 1-95	-	-	-	-	4d	AF378258
I 121-92	Evcil tavuk	1992	İtalya	VII	5a	AF001127
I 123-92	Evcil tavuk	1992	İtalya	VII	5a	AF001128
İsrail-70	Evcil tavuk	1970	İsrail	VI	4a	AF001111
IT 1-2000	Piliç	2000	İtalya-Padova	VIIb	5b	AF293350
IT 110-73	Piliç	1973	İtalya-Verona	V	3c	AF297970
IT 112-84	Hindi	1984	İtalya-Bergamo	VIIb	5b	AF218127
IT 113-85	Piliç	1985	İtalya-Bergamo	VIIb	5b	AF218128
IT 126-87	Bıldırcın	1987	İtalya-Verona	IV	3b	AF218129
IT 127-87	Piliç	1987	İtalya-Padova	V	3c	AF218130
IT 129-88	Piliç	1988	İtalya-Treviso	V	3c	AF218131
IT 147-94	Hindi	1994	İtalya-Roma	VIII	3d	AF218132
IT 148-94	Piliç	1994	İtalya-Palermo	VI	4c	AF221840
IT 3-66	Bıldırcın	1966	İtalya-Pavia	IV	3b	AF218133
IT 47/74	Sülün	1974	İtalya-Forli	V	3c	AF218134
IT 48/68	Bıldırcın	1968	İtalya-Forli	IV	3b	AF297969
IT 50/73	Hindi	1973	İtalya-Forli	V	3c	AF218135
IT 51b/72	Hindi	1972	İtalya-Forli	V	3c	AF218136
IT 52/69	Bıldırcın	1969	İtalya-Forli	IV	3b	AF218137
IT 5/68	Bıldırcın	1968	İtalya-Pavia	IV	3b	AF297967
IT 63/73	Hindi	1973	İtalya-Forli	V	3c	AF218138
IT 64/77	Sülün	1977	İtalya-Forli	V	3c	AF218139
IT 66/76	Bıldırcın	1976	İtalya-Forli	IV	3b	AF297968
IT 7/60	Keklik	1960	İtalya-Perugia	IV	3b	AF218140
IT 81/71	Evcil tavuk	1971	İtalya-Forli	IV	3b	AF218141
IT 85/81	Evcil tavuk	1981	İtalya-Forli	IV	3b	AF218142
JL 1/97	-	-	-	-	2	AF400614
JL 2/97	-	-	-	-	4d	AF400615
KUWAIT/68	Evcil tavuk	1968	Kuveyt	VI	4a	AF001109
La Sota/46	Evcil tavuk	1946	USA	II	2	M24696
Lübnan/	Evcil tavuk	1970	Lübnan	VI	4a	AF001110
Miyadera/51	Evcil tavuk	1951	Japonya	III	3a	M24701
MZ 13/94	-	1994	Mozambik	VIIb	5b	AF136775
MZ 35/95	-	1995	Mozambik	VIIb	5b	AF136776
MZ 44/95	-	1995	Mozambik	VIIb	5b	AF136777
MZ 46/95	-	1995	Mozambik	VIIb	5b	AF136778
MZ 48/95	Evcil tavuk	1995	Mozambik	VIIb	5b	AF136779
MZ 50/95	-	1995	Mozambik	VIIb	5b	AF136780
NL 1/93	Evcil tavuk	1993	Hollanda	VII	5a	AF001124
NL 2/93	Evcil tavuk	1993	Hollanda	VII	5a	AF001125

Tablo 1.6. Devam

Etiket	Konakçı	Yıl	Ülke	MAb grubu	Genetik Grup	Erişim no
NY 70181/70	Papağan	1970	USA	V	3c	AF001105
POK/70	Tavuk	1970	Rusya	IV	3b	Y19014
QGB445/97	İspinoz Parakeet (Monk papağanı)	1997	Q-GB	-	5e	AF109886
QGB506/97	papağanı)	1997	Q-GB	VI	4c	AF109887
QH 1/79	Evcil tavuk	-	Batı Çin	VIII	3d	AF378250
QH-2/84	Evcil tavuk	-	Batı Çin	VIII	3d	AF378251
QH-4/85	Evcil tavuk	-	Batı Çin	VIII	3d	AF378252
QSD 1/97	-	-	-	-	3a	AF401999
QueenslandV4/	Evcil tavuk Cockatoo (papağan)	1966	Avusturalya	I	1	M24693
RI 1/88	Evcil tavuk	1988	Endonezya	-	5b	AF001134
RI 3/88	Evcil tavuk	1988	Endonezya	VII	5a	AF001135
S 1/95	Evcil tavuk	1995	İsviçre	VI	4d	AF001131
SA 34b/89	-	1989	Suudi Arabistan	VI	4c	AF083962
SDBZ/S98	-	-	-	-	2	AF397009
SEA102/95	Evcil tavuk	1995	İsviçre	-	4d	AF109879
SG-4H/65	Evcil tavuk	1965	Singapur	VIII	3d	AF136786
SHD 1/99	-	-	-	-	5d	AF378260
SHX 2/99	Evcil tavuk-	-	Batı Çin	VIIa	5d	AF378245
SHX 3/99	Evcil tavuk	-	Batı Çin	VIIa	5c	AF378246
SHX 6/99	Evcil tavuk-	-	Batı Çin	VIIa	5d	AF378247
SHX-7/99	Evcil tavuk	-	Batı Çin	VIIa	5d	AF378248
SIMF/64	Evcil tavuk	1964	Rusya	IV	3a	Y19017
SK Recombinant	-	-	-	-	3a	E01438
Texas/48 (GB)	Evcil tavuk	1948	USA	II	2	M24698
TEXAS	Evcil tavuk	-	USA	IV	3b	M33855
Tayvan/95	Evcil tavuk	1995	Tayvan	VIIa	5e	U62620
TR 2/96	-	1996	Türkiye	VIIb	5b	AF136783
TR 7/97	Evcil tavuk	1997	Türkiye	VIIb	5b	AF136784
TR 8/97	-	1997	Türkiye	VIIb	5b	AF136785
TW 154/99	Evcil tavuk	1999	Tayvan	VI	4d	AF234030
TW 154b/99	Evcil tavuk	1999	Tayvan	VII	5d	AF326521
TW 156/99	Evcil tavuk	1999	Tayvan	VII	5d	AF234031
TW 156a/99	Evcil tavuk	1999	Tayvan	VII	5d	AF326522
TW 157/99	Evcil tavuk	1999	Tayvan	VII	5d	AF234032
TW 159/99	Evcil tavuk	1999	Tayvan	VII	5c	AF234034
TW 165/99	Evcil tavuk	1999	Tayvan	VII	5d	AF326523
TW 174/99	Evcil tavuk	1999	Tayvan	VII	5d	AF326524
TW 1/95	-	1995	Tayvan	VII	5e	AF083960
TW 1/98	-	1998	Tayvan	VII	5d	AF083963
TW 2000	-	-	-	-	5d	AF358786
TW 2/95	Evcil tavuk	1995	Tayvan	VII	5e	AF083972
TW 2/98	Evcil tavuk	1998	Tayvan	VII	5d	AF083973
TW 3/95	Evcil tavuk	1995	Tayvan	III	3a	AF083970
TW 4/95	Evcil tavuk	1995	Tayvan	VII	5e	AF083969
TW 4/98	Evcil tavuk	1998	Tayvan	VIIId	5d	AF083964
TW 69	Evcil tavuk	1969	Tayvan	III	3a	AF083959
TW 7/95	-	1995	Tayvan	VII	5c	AF083968
TW 9/95	Evcil tavuk	1995	Tayvan	VIIc	5c	AF083968

Tablo 1.6. Devam

Etiket	Konakçı	Yıl	Ülke	MAb grubu	Genetik Grup	Erişim no
TW C/84	Evcil tavuk	1984	Tayvan	VIIc	5c	AF083965
TW P/84	-	1984	Tayvan	VII	5c	AF083967
TW P/94	Evcil tavuk	1994	Tayvan	VIIa	5e	AF083961
TW P/96	Güvercin	1996	Tayvan	VIIc	5c	AF083971
Ulster/67	Evcil tavuk	1967	Kuzey İrlanda	I	1	M24694
Ulster Mutant	-	-	-	-	1	Z12110
Warwick/66	Evcil tavuk	1966	İngiltere	VIe	4a	U52457
XJ 2/97	Evcil tavuk	-	Batı Çin	VIIa	5d	AF378253
ZA 10/74	-	1974	Güney Afrika	-	3d	AF136763
ZA 16/90	Evcil tavuk	1990	Güney Afrika	VIII	3d	AF136764
ZA 17/90	-	1990	Güney Afrika	VIII	3d	AF136765
ZA 18/90	-	1990	Güney Afrika	VIII	3d	AF136766
ZA 20/93	-	1993	Güney Afrika	VIIb	5b	AF136767
ZA 25/93	-	1993	Güney Afrika	VIIb	5b	AF136768
ZA 26/93	-	1993	Güney Afrika	VIIb	5b	AF136769
ZA 33/94	-	1994	Güney Afrika	VIIb	5b	AF136772
ZA 34/94	-	1994	Güney Afrika	VIII	3d	AF136773
ZA 35/95	Evcil tavuk	1995	Güney Afrika	VIIb	5b	AF136774
ZA 360/95	Deve kuşu	1995	Güney Afrika	VIIb	5b	AF109876
ZA 5/68	Evcil tavuk	1968	Güney Afrika	VIII	3d	AF136762
ZAc 1868/95	Deve kuşu	1995	Güney Afrika	-	5b	AF109882

## **1.2. Newcastle Disease Virus (NDV) Üzerinde Yapılan Moleküler Çalışmaların**

### **Kısa Tarihçesi**

Newcastle disease virus üzerinde yapılan genetik çalışmalar; 1991 yılında Jestin ve Jestin tarafından Newcastle Virusu'na ait spesifik bir gen bölgesinin evrensel primerler kullanılarak PCR ile amplifikasyonu ile başlamış, bunu Kant ve ark. (1997) tarafından patotip spesifik primerler yardımı ile etkenin tiplendirilmesi takip etmiş ve PCR çalışmaları Nested hale getirilerek spesifitesi arttırılmıştır (Jestin ve ark., 1994; Kant ve ark., 1997; Kou ve ark., 1999; Kho ve ark., 2000).

PCR ile etkenin teşhisinin ardından Restriksiyon Enzim Analizleri yardımı ile etkenin alt tiplerinin ayrımı gerçekleştirilmiştir (Pordany ve ark., 1996; Wehmann ve ark., 1997; Kou ve ark., 1999; Nanthakumar ve ark., 2000).

Probe Hibridizasyon çalışmaları ile moleküler çalışmaların duyarlılığı ve özgünlüğü arttırılmıştır (Black ve ark., 1992; Black ve King, 1993; Radhavan ve ark., 1998; Oberdörfer ve Wemer, 1998),

Cleavage site üzerinde yapılan DNA dizin analizi çalışmaları ve buna bağlı epidemiyolojik çalışmalar yardımı ile moleküler teşhis çalışmalarında en ileri noktaya varılmıştır (Toyoda ve ark., 1989; Collins ve ark., 1993, 1994; Stauber ve ark., 1995; Seal ve ark., 1995, 1998; Marin ve ark., 1996; Heckert ve ark., 1996; King ve Seal, 1997; Aldous, 2001'den).

## **1.3. Bu Çalışmada Kullanılan Teknikler Üzerine Genel Bakış**

### **1.3.1. Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)**

Cetus Corporation adlı bir şirkette çalışan Kerry Mullis ve bir grup bilim adamı tarafından 1984 yılında geliştirilen PCR tekniği, enzimatik reaksiyonlara bağlı bir DNA çoğaltım (amplification) yöntemidir. Metod kısaca herhangi bir canlıya ait bir

DNA molekülünün belli bir bölgesinde bulunan baz dizinine spesifik oligonükleotid primerler tarafından belirlenen/sınırlandırılan bir DNA parçasının polimeraz enzimi eşliğinde, “DNA sarmalının ayrılması (denatürasyon), primerlerin bağlanması (primer annealing) ve yeni oluşan iplikçiğin uzaması (extention)” aşamalarının tekrarı ile çoğaltılmasıdır (Şekil 1.4). Bu yöntemle teorik olarak yalnız bir DNA molekülünden milyarlarca kopya üretilebilir (Mounir, 1993).

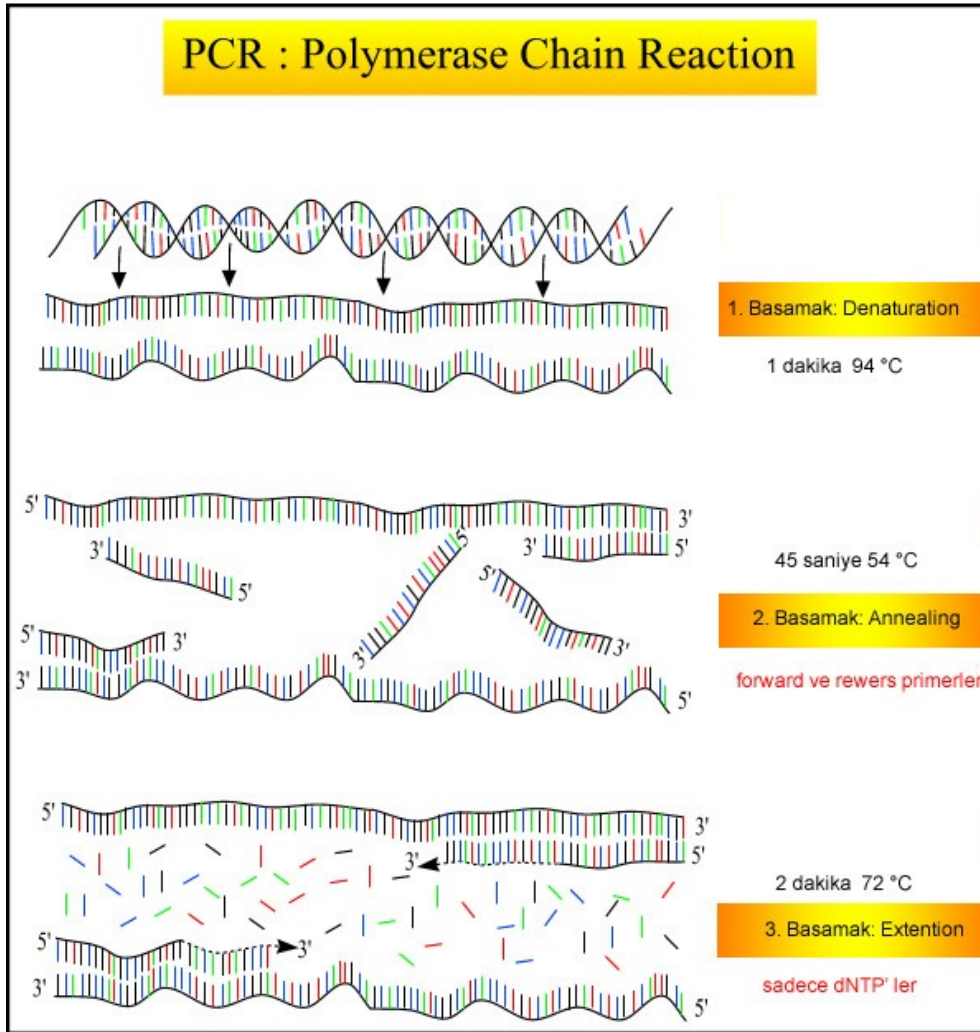
Bununla birlikte pratikte PCR işleminin başarı ile uygulanabilmesi için bir çok zaman *invivo* veya *invitro* bir sistemde ön çoğaltma gerekmektedir.

PCR işlemi yalnız DNA üzerinde uygulanabilmektedir, bu sebeple RNA içeren virüslere ait genetik materyalin PCR ile tespiti istendiğinde öncelikle RNA'nın DNA'ya çevrilmesi gerekmektedir, bu amaçla RNA, PCR aşamasından önce Revers transcriptase enzimi yardımı ile, tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) çevrilerek bilinen PCR prosedürüne bundan sonra devam edilmekte ve modifiye edilen bu PCR tekniği *Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction, RT-PCR*, olarak adlandırılmaktadır (Mounir, 1993).

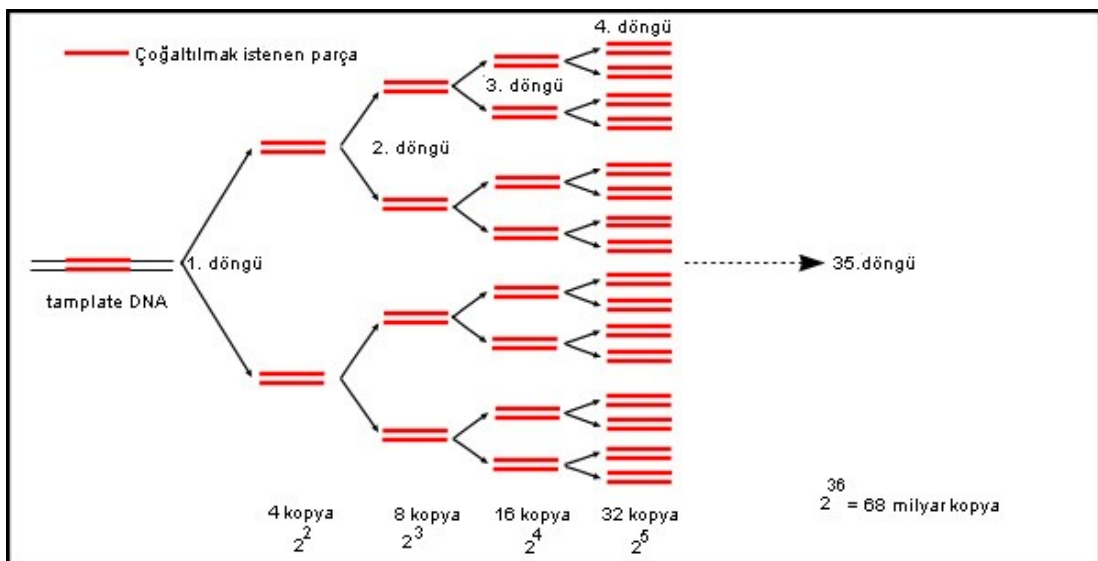
### 1.3.1.1. PCR Tekniğinin Temelleri

PCR tekniği; temel olarak yüksek ısı yardımı ile DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılması (denaturation), uygun sıcaklık ve pH koşullarının sağlanması ile belli bir DNA dizinine, ~20 bp uzunluğunda primerlerin bağlanması (annealing) ve ortamda bulunan polimeraz enzimi ve bazların yardımı ile uzama (extention) olmak üzere üç basamaktan oluşmakta ve bu üç aşamanın 25-30 tekrarı ile bir tek DNA parçasından teorik olarak 68 milyar kopya elde edilebilmektedir (Şekil 1.4 ve 1.5).

1984 yılında ilk kez ortaya çıkışından günümüze kadar, gerek PCR çalışmalarını daha hızlı, pratik ve güvenilir hale getirmek, gerekse çalışmalar sırasında karşılaşılan problemleri ortadan kaldırmak için modifiye edilerek ortaya çıkarılan birçok PCR tekniği bulunmaktadır.



Şekil 1.4. PCR Aşamaları (Vierstraete, 2004)



Şekil 1.5. PCR döngüleri sonucu teorik olarak oluşan kopya sayısı (Vierstraete, 2004)



### 1.3.1.2. Günümüze Kadar Geliştirilen PCR Tekniklerinden Örnekler

**Multiplex PCR:** Aynı test tüpü içine birden fazla primer konulması suretiyle bir defada birden fazla DNA parçasının sentezlenmesi olarak tanımlanan multiplex PCR, başta gen haritalarının çıkartılması olmak üzere rutin teşhis çalışmalarında kullanılarak çalışmalar için harcanan efor ve zamanı önemli ölçüde azaltmaktadır. Çalışma; gen haritalarının çıkartılması işleminde olduğu gibi tek bir DNA'ya ait birden fazla parçanın sentezlenmesi şeklinde olabileceği gibi, aynı materyal içinde bulunan farklı etkenlere ait DNA parçalarının sentezlenmesi şeklinde de olabilmektedir (Elnifro ve ark., 2000).

Aynı test tüpü içinde 30 adet primerin başarı ile kullanılabilmesi Tettelin ve ark. (1999) tarafından yapılan bir gen haritası çıkarma çalışması ile gösterilmiştir. Bununla birlikte çalışma esnasında primer dimerlerinin oluşmasının engellenmesine dikkat çekilmiş ve primerlerin dikkatli seçilmesi gereği vurgulanmıştır.

**Hot-start PCR:** PCR çalışmalarında non-spesifik bağlanmalar sebebi ile istenmeyen bantların oluşumu çokça görülen ve sonuçların değerlendirilmesini zorlaştıran bir durumdur. Bunun engellenmesi için geliştirilen hot-start PCR'da; reaksiyonun başlaması için gereken reagent'lardan bazıları reaksiyon tüpünün yüksek sıcaklıklara çıkartılmasından sonra eklenmekte, böylelikle polimeraz enziminin test başlamadan önce çalışmaya başlaması engellenerek istenmeyen kısa bantlar da giderilmektedir. Ancak bu işlem manuel olarak yapıldığında ek bir çalışma getirmekte ve kros kontaminasyon riskini de arttırmaktadır. Bu negatiflikleri ortadan kaldırmak için geliştirilen yöntemler aşağıda belirtilmiştir.

- Reaksiyonda kullanılan reagent'ların, bal mumu gibi oda sıcaklığında erimeyen materyaller kullanılarak üretilen boncukların içine hapsedilmesi ile, reaksiyonun yalnız belli bir sıcaklığa erişildiğinde başlatılması, böylelikle oda sıcaklığında oluşan non-spesifik bantlar engellenmesi,
- DNA polimeraz antikorların kullanımı,
- Kimyasal olarak modifiye edilmiş AmpliTaq Gold DNA polimeraz (PE biosystems) kullanımı,

- DNA polimerazı geriye dönüşlü şekilde engelleyen oligonükleotid'lerin kullanımı,
- Sıcağa dayanıksız (thermolabile) DNA helicase'ların kullanımı,
- 5'ucunda florasan etiket, 3'ucunda quencher chromophore yapı bulunan saç tokası benzeri oligonükleotid yapılarının kullanımı ile PCR ürünlerinin gerçek zamanlı tespiti (Kaboev ve ark., 2000; Kaijalainen ve ark., 1993).

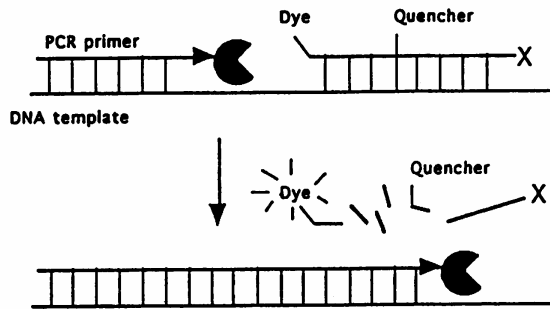
**PCR-RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), her türe ve her bireye ait DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimleri ile farklı bölgelerden kesilmesi prensibine dayalı bir testtir. Yöntemin uygulanması için fazla miktarda DNA'ya ihtiyaç duyulduğundan RFLP öncesi PCR'a ihtiyaç duyulmaktadır. PCR ile çoğaltılarak, restriksiyon enzimleri (*EcoRI*, *HindIII*, *MvaI*, *HinfI*, *HaeIII*, *AluI*, *RsaI*) ile kesilen DNA parçaları, agarose gel de koşturularak görüntülenmektedir. RFLP, gıda amacı ile tüketilen etlerin saflığı ve hangi türe ait oluşunun tespitinden, filogenetik çalışmalarda tür içi bireylerin yakınlığının incelenmesine kadar geniş bir kullanım alanı bulmuştur (Dybus ve ark. 2005; Wang ve ark., 2004).

**Real-Time PCR:** Higuchi ve arkadaşları tarafından 1992 yılında geliştirilen real-time PCR (Higuchi ve ark., 1992, 1993), termal cyler cihazından elde edilen bilgilerin bilgisayara aktarılması ile PCR ürünlerinin gerçek zamanlı tespitini sağlayarak teşhis çalışmalarına hız kazandırmış, kullandığı sistem sayesinde sonuçların güvenliğini ve tekrarlanabilirliğini arttırmıştır (Mackay ve ark., 2002).

Bir florasan boya olan ethidium bromide (EtBr)'in nükleik asitlere bağlandığında florasan parlamasının arttığı 1966'dan beri bilinmektedir ve bunun yardımı ile jel elektroforez'de toplanarak bant oluşturan DNA parçacıkları ultraviyole (UV) altında görüntülenmekte ve fotoğrafları çekilmektedir. Ancak PCR ürünlerinin florasan probolar yardımı ile gerçek zamanlı görüntülenmesi 1990'larda başlamıştır (Mark ve Joyce, 2005).

Testte; florasan işaretli ve işaretli olmayan üzere iki adet primer kullanılmakta, işaretli primer, istenen DNA parçasının ucuna, işaretli olansa ortasına bağlanmaktadır. Uca bağlanan işaretli primerden başlayan polimerizasyon işlemi esnasında ortaya bağlanan florasan işaretli primer (quencher) ayrılarak ortama

atılmakta ve florasan parlamaya vermektedir (Şekil 1.6). Oluşan PCR ürünü sayısı arttıkça, ayrılarak ortama atılan florasan işaretli primer sayısı da artmakta ve bu artışın florasan parlamaya duyarlı bir video kamera ile tespit edilerek bilgisayara parabol şeklinde bir eğri olarak yansıtılması ile sonuçlar görüntülenmektedir (Valasek ve Repa, 2005; Lee ve ark., 1993).



Şekil 1.6. Real-time PCR’da florasan problemin işlevi (Lee ve ark., 1993)

**Nested PCR:** PCR işleminin spesifitesini arttırmak amacı ile daha önce PCR işlemi yapılarak çoğaltılan DNA parçalarına ait daha kısa bir bölgenin iki yeni primer kullanılarak tekrar çoğaltılmasıdır. İlk PCR işleminde kullanılan primerlerden biri ikinci PCR’da da kullanılırsa, bu durumda işlem, hemi-nested PCR olarak adlandırılmaktadır.

**TAIL-PCR:** Tail PCR, adını testte kullanılan primelerin, hedef DNA’ya bağlanan parça yanında, bağlanmayan yaklaşık 20 bp uzunluğunda bir kuyruk-dizin içermesinden almaktadır. (Chaves ve ark., 1994). Kuyruk-dizin daha sonra komplementer dizine sahip problemlerle birleştirilerek PCR ürünlerinin bir yüzey üzerinde sabitlenmesi veya işaretli problemlerin özelliğine bağlı olarak oluşan ürünlerin renkli olarak görüntülenmesi sağlanabilmektedir.

**AFLP:** Amplified fragment-length polymorphism (AFLP) ve/veya florasan versiyonu olan (fAFLP), PCR tabanlı bir parmak izi, fingerprinting, teknolojisidir. Her bireye ait DNA’nın EcoR 1 and Mse 1 enzimleri tarafından farklı bölgelerden kesilmesi ve kesilen parçaların PCR ile çoğaltılarak görüntülenmesi prensibine dayalı bir test olan AFLP, bireyler arasındaki genetik farklılıkların testi için kullanılabilir. Düşük maliyetli ve kolay bir teknik olup babalık testinden, filogenetik çalışmalara kadar birçok alanda kullanım alanı bulmuştur (Mueller ve ark., 1999; Berres, 2002).

**Asymmetric PCR:** Bu yöntemde; kullanılan primerlerden birinin konsantrasyonu diğerine göre daha az hazırlanarak normal PCR'dan farklı olarak çift iplikçik yerine tek iplikçikli DNA üretilmektedir. Bu durum özellikle sekans çalışmaları öncesi yapılan PCR'da ve DNA hibridizasyonu için kullanılacak problemlerin hazırlanmasında yararlı olmaktadır (Kinjo, 1998).

**Long-PCR:** Gen haritası oluşturmak için yapılan çalışmalar esnasında defalarca PCR yapılması gerekmektedir. Long PCR; PCR ürününü uzatıp, yapılan test sayısını azaltarak gereksiz bir iş yükünden kurtulmak ve çalışmayı basit ve hızlı hale getirmek amacıyla geliştirilmiştir. Bu amaçla PCR karışımında modifikasyonlar yapılmış olup, PCR karışımına; gliserol ve dimethyl sulfoxide eklenmiş, pH'sı arttırılmış, primelerin bağlanması için gereken sıcaklık, polimeraz ve tuz miktarları düşürülmüş, 3' ucundan 5' ucuna ekzonükleaz olarak görev yapan ısıya dayanıklı ikincil bir DNA polimeraz eklenmiştir (Cheng ve ark., 1994).

**Colony PCR:** Bakteri ve maya kolonilerinin identifikasyonunda kullanılmak üzere modifiye edilmiş bir PCR türüdür (Amberg, 2001).

**Touchdown PCR:** PCR çalışmalarında görülen önemli sorunlardan biri de istenmeyen kısa bantların oluşumudur. Primerlerin kendine özgü DNA dizini dışında başka bir DNA parçasına bağlanmasından kaynaklanan bu durum, kimi zaman oluşan kısa ürünlerin, istenilen uzun ürünleri baskılayacak kadar fazla oluşumuna sebep vererek PCR ürününün istenilen kalitede olmasını engellemektedir. Primerlerin yanlış bağlanarak kısa bantlara sebep olması probleminin çözümünde, PCR karışımına konulan Mg miktarının ayarlanması ve primerlerin bağlanma sıcaklığının arttırılması gibi yöntemlerle başarı elde edilmiş olmakla birlikte bu yöntemler zaman almaktadır. Alternatif bir çözüm olarak geliştirilen touchdown PCR'da primerlerin bağlandığı annealing aşaması için kullanılan sıcaklık, her saniye kademeli olarak düşürülmekte böylelikle, döngüler sonucunda doğru bağlanma ile elde edilen ürünlerin, yanlış bağlanma ile elde edilen örneklere baskın sayıda oluşması sağlanmaktadır (Doni ve ark., 1991).

**PCR-ELISA:** Test; digoxigenin işaretli problemlerle hibridize edilen PCR ürünlerinin, biotin işaretli oligonükleotid primerler yardımı ile streptavidin kaplı ELISA

plate'ine sabitlenmesi, daha sonra plate ilave edilen, peroxidase işaretli anti-digoxigenin antikor-konjugat'ın digoxigenin işaretli probalara bağlanması ve oluşan kompleksin, plate'e ilave edilen 2,29-azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonate) yardımı ile görünür hale getirilerek ELISA reader'da okunması prensibine dayanmaktadır (Ferlicot ve ark., 1999). Her iki testin özgünlük ve duyarlılığını birleştiren PCR-ELISA tekniğinin %100 özgünlük ve %100 duyarlılık ile çalışabildiği gözlemlenmiştir (Jones ve ark., 1998).

**In situ PCR:** Kullandığı sistem sebebiyle histopatolojide geniş bir kullanım alanı bulan in situ PCR'da; bilinen PCR'dan farklı olarak, genetik materyalin hücre dışına çıkartılması, ekstraksiyon, yapılmamakta, bunun yerine PCR bileşenlerinin hücre içine sokulması ve test prosedürünün hücre içinde tamamlanması sağlanmaktadır. In situ PCR, mikroskop lamı benzeri cam slaytlar üzerine fikze edilmiş doku ve hücre preparatları üzerinde uygulanmaktadır (Retzel ve ark., 1994). Çalışmada organlardan sağlanan doku örneklerinden faydalandığı gibi (Stamps ve ark., 2003) bakteri kültürleri de (Hoshino ve ark., 2001; Tani ve ark., 1998) kullanılabilir.

Termal cyclign işlemi slaytlar için özel olarak imal edilmiş termal cyclerlarda gerçekleşmekte ve amplifikasyonlar sonucu oluşan PCR ürünü, digoxigenin işaretli problarla hibridize edilerek, alkaline phosphatase işaretli anti-digoxigenin antikor-konjugat yardımı ile görünür hale getirilmektedir (Hoshino ve ark., 2001; Tani ve ark., 1998). Ürünlerin görünür hale getirilmesinde altın işaretli antikolar da başarı ile kullanılabilir (Stamps ve ark., 2003), PCR ürünleri; florasan izotiyosiyonat işaretli problarla yapılan in situ hibridizasyon sonucu florasan mikroskoplar yardımı ile de görüntülenebilmektedir (Moreno ve ark., 2003).

Bunun yanında; differential display-PCR (DD-PCR), inverse PCR, alu-PCR, RACE, RAPD, single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP), quantitative comperative-PCR (QC-PCR), Rep-PCR, vectorette PCR ve degenerate PCR gibi PCR türleri de bulunmaktadır.

### **1.3.2. DNA Dizin Analizi**

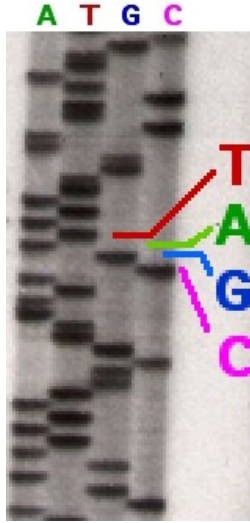
Sekans terimi biyokimya ve genetik'de, dallanmamış biopolimer yapısında bir molekülün ilkel (primary) yapısının atomik seviyede belirlenmesi olarak

tanımlanmaktadır. Genetikte kullanımı ise bir DNA parçasının nükleotit dizinin tespiti şeklindedir.

Günümüzde DNA dizin analizi (sekans) işlemi bir çok laboratuvarında, 1977 yılında Frederic Sanger tarafından geliştirilen, zincir durdurma (chain termination) yönteminden köken alan ve otomatik sekans cihazları yardımıyla gerçekleştirilen “dye termination sequencing” ile yapılmaktadır. Maxam ve Gilbert (1977) tarafından geliştirilen Maxam-Gilbert chemical sequencing yöntemi, teknik zorlukları ve fazla miktarda kimyasalı gerektirmesi sebebiyle terk edilmiştir (Anonim, 2005b).

### 1.3.2.1. Sanger Zincir Durdurma DNA Dizini Analizi (Chain Termination Sequencing)

Sanger tarafından ilk kez 1977 yılında bakteriofaj phi-X174'e ait bir DNA dizininin



**Şekil 1.7. Sanger chain termination yöntemi ile dizini belirlenen bir DNA parçasına ait X-ray film (Anonim, 2005a).**

tespitiyle ortaya konulan ve Sanger'e 1980 yılında Nobel ödülü kazandıran bu yöntemde; dizini belirlenmek istenen DNA örneğinden 4 tüp hazırlanmakta, tüplerin her birine polimerizasyon işlemi durdurma özelliğine sahip dideoxynucleotide (ddNTP)'lerden yalnız bir tanesi (ddATP / ddTTP / ddCTP / ddGTP) ve radyoaktif işaretli primer ilave edilmekte, böylelikle PCR sonucunda oluşması beklenen birbirine eşit DNA segmentleri yerine ddNTP'ler sebebiyle durdurulan farklı uzunluklarda radyoaktif işaretli segmentler

elde edilmektedir. Test sonucunda dört tüpte elde edilen PCR ürünleri, agar jelde birbirine paralel olarak koşturulmakta, birbirinden farklı uzunluklarda olan DNA iplikçikleri ayrıştırılarak uzundan kısaya doğru sıralanmakta ve X-ray filimleri yardımı ile görüntülenerek değerlendirilmektedir (Anonim, 2005a).

Günümüzde Sanger tarafından geliştirilen zincir durdurmaya dayalı sekans analizi işlemi modifiye edilerek radyoaktif işaretleme yerine floresan işaretli di-

dioksinükleotid'ler kullanılmakta ve bu işlem “dye terminator sequencing” olarak adlandırılmaktadır.

Bunun yanında;

- Hibridizasyon yolu ile sekans,
- Pyrosequencing,
- Nanopore sequencing,

gibi gelişmekte olan sekans yöntemleri de bulunmaktadır (Anonim, 2005b).

### 1.3.2.2. Dye Terminator Sequencing

Pratik ve güvenilir olması sebebiyle günümüzde oldukça geniş bir kullanım alanı bulan dye terminator sequencing yöntemi, otomatik sekans cihazları yardımı ile gerçekleştirilmektedir. Yönteminin temel olarak iki basamağı bulunmaktadır.

- 1- Sekans PCR ile florasan işaretli, birbirinden farklı uzunlukta baz dizinlerinin sentezlenmesi,
- 2- Sentezlenen dizinlerin elektroforez ile birbirinden ayrıştırılarak bir CCD kamera ile tespit edilmesi,

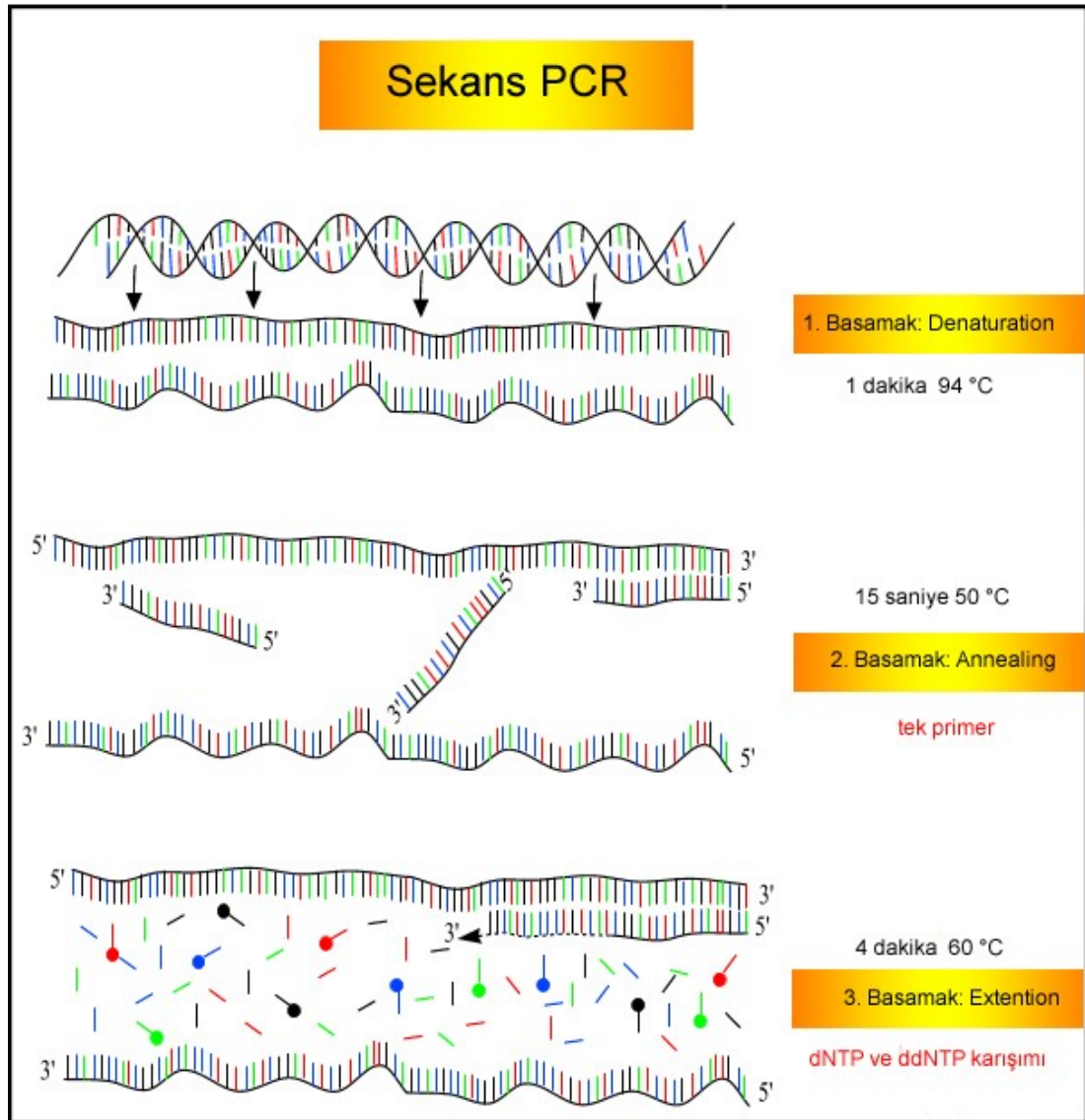
Sekans işleminin gerçekleştirilebilmesi için fazla miktarda kalıp-DNA (template-DNA) 'ya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple sekans PCR işlemi öncesinde yapılan PCR yardımı ile sekansı istenen DNA parçası çoğaltılmakta ve daha sonra sekans PCR işlemine geçilmektedir (Vierstraete, 2004).

#### 1.3.2.2.1 Sekans PCR

Sekans PCR işleminin üç temel aşaması bulunmaktadır.

- 1- *94 °C'de ayrılma (denaturation)*: Bu aşamada çift sarmallı DNA ayrılmakta ve tüm enzimatik reaksiyonlar durmaktadır.
- 2- *50°C'de bağlanma (annealing)*: Sekans işleminde PCR'dan farklı olarak yalnız bir primer kullanıldığından yalnız bir DNA ipliği sentezlenmektedir. Sekans karışımı içinde bulunan primerler brown hareketi ile karışım içinde dolaşırken DNA iplikçikleri ile arasında iyonik bağlar oluşmakta, primer dizininin kendisine

uygun DNA parçası ile karşı karşıya gelmesi durumunda bu bağlar daha uzun ömürlü şekillenmekte, bu durumda polimeraz enzimi primerin sonuna bağlanmakta ve tamamlayıcı (complementer) DNA'yı sentezlemektedir. Yeni DNA iplikçiginde birkaç bazın inşası ile primer ve DNA iplikçigi arasında oluşan bağ güçlenmekte ve kolayca kırılmayacak bir hal almaktadır.



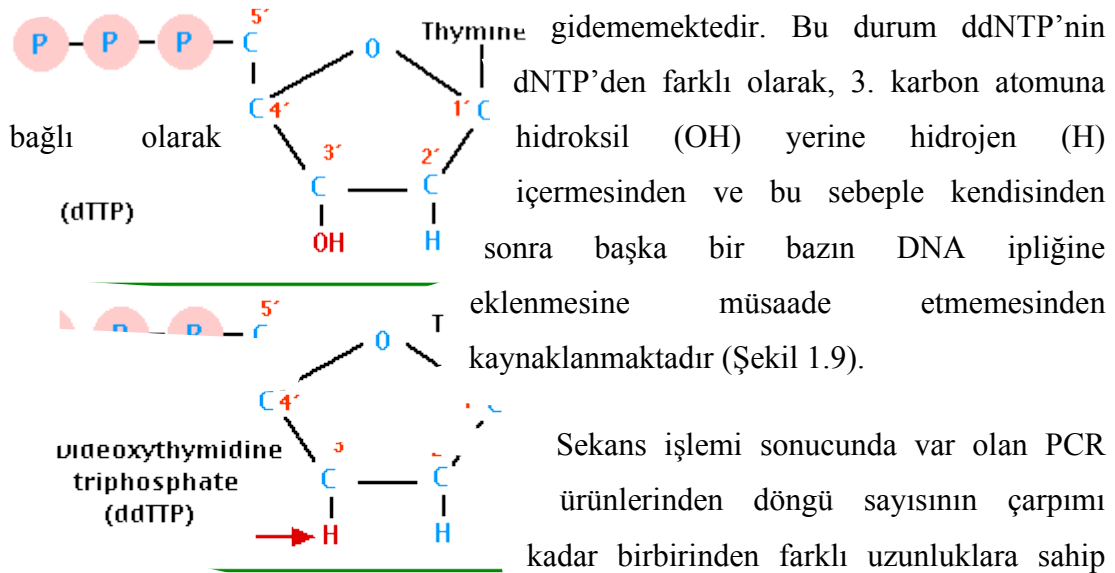
Şekil 1.8. Dye Terminator Sequencing (Vierstraete, 2004)

3- 60 °C'de uzama (extension): Polimeraz enzimi eşliğinde ortamda bulunan bazların complementer DNA iplikçiklerine eklenerek iplikçigin uzaması 72 °C'de en iyi şekilde gerçekleşmektedir. Bununla birlikte, PCR'da 72°C olarak uygulanan bu aşama, sekans işlemi sırasında, karışımda bulunan modifiye



moleküller olan florasan işaretli ddNTP'lerin daha iyi bağlanması için 60 °C'ye düşürülmüştür (Şekil 1.8).

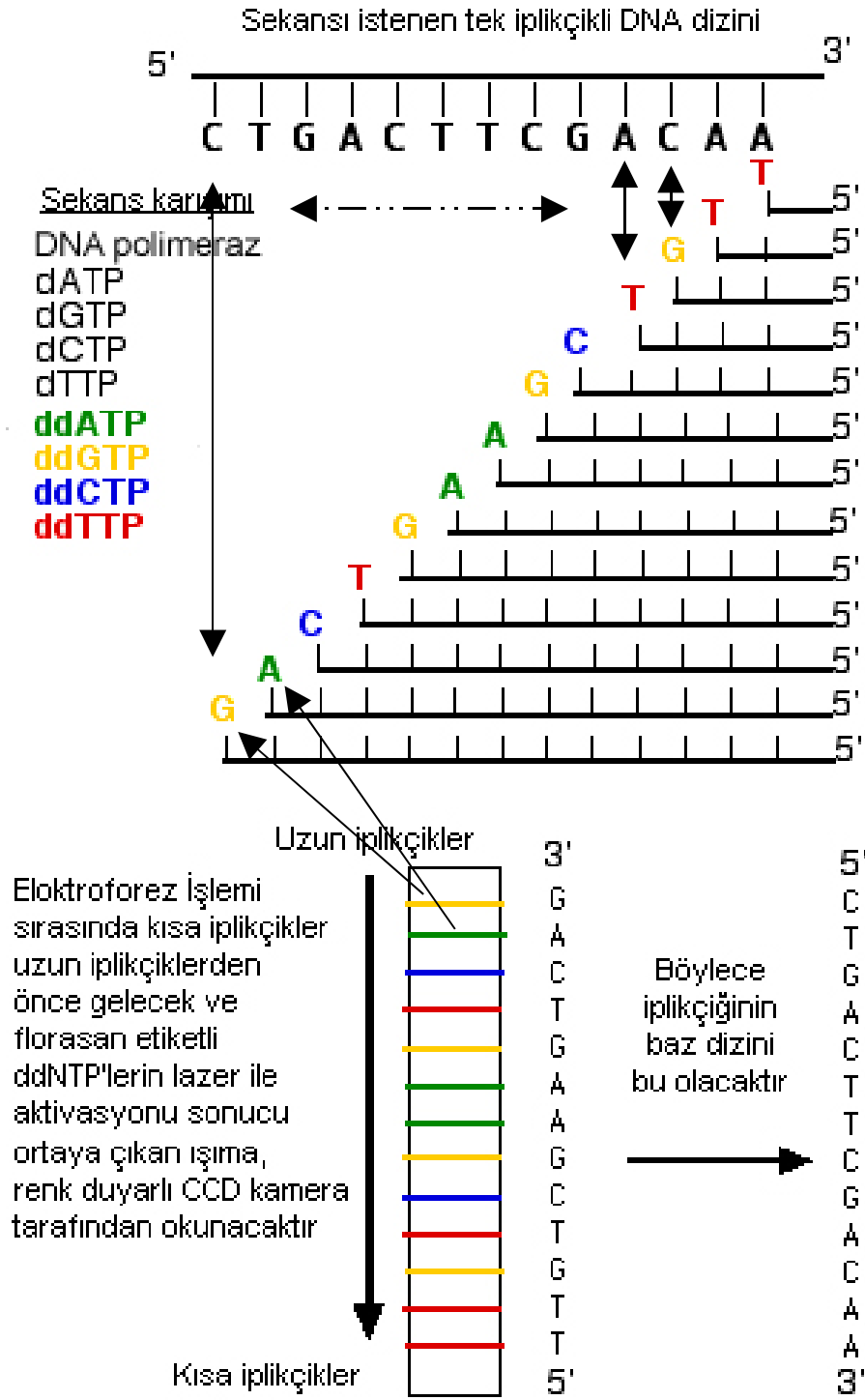
Uzama aşamasında polimeraz enziminin inşa yapısına dNTP yerine ddNTP gelmesi durumunda polimerizasyon işlemi durmakta ve iplik sentezi o noktadan ileriye



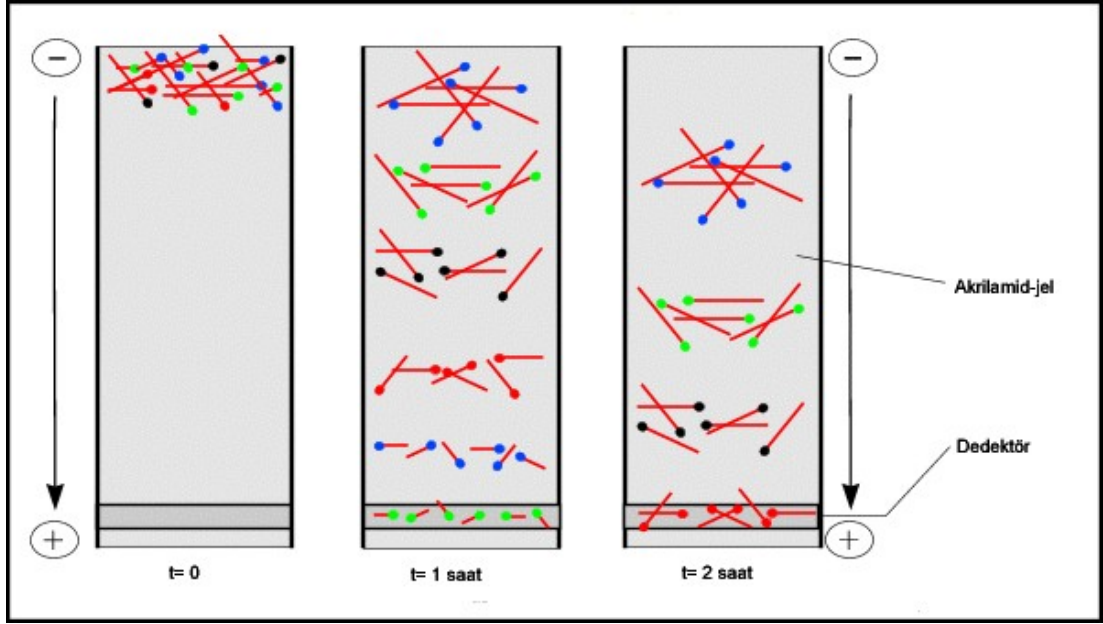
Şekil 1.9. Dideoxynucleotide (ddNTP) yapısına bir örnek; dioksitimidin (ddTTP) (Kimball, 2003)

### 1.3.2.2.2. Sentezlenen Dizinlerin Elektroforez ile Birbirinden Ayırılarak Bir CCD Kamera ile Tespit Edilmesi

Sekans PCR sonucu elde edilen farklı uzunluklardaki DNA fragmentleri daha sonra otomatik sekans cihazı yardımı ile elektroforez işlemine tabi tutularak ayrıştırılmaktadır. Bu işlem sırasında kısa olan fragmentler jel ortamında daha hızlı ilerleyerek önce gelmekte böylelikle kısıdan uzuna doğru bir sıralama oluşturulmaktadır (Şekil 1.11).

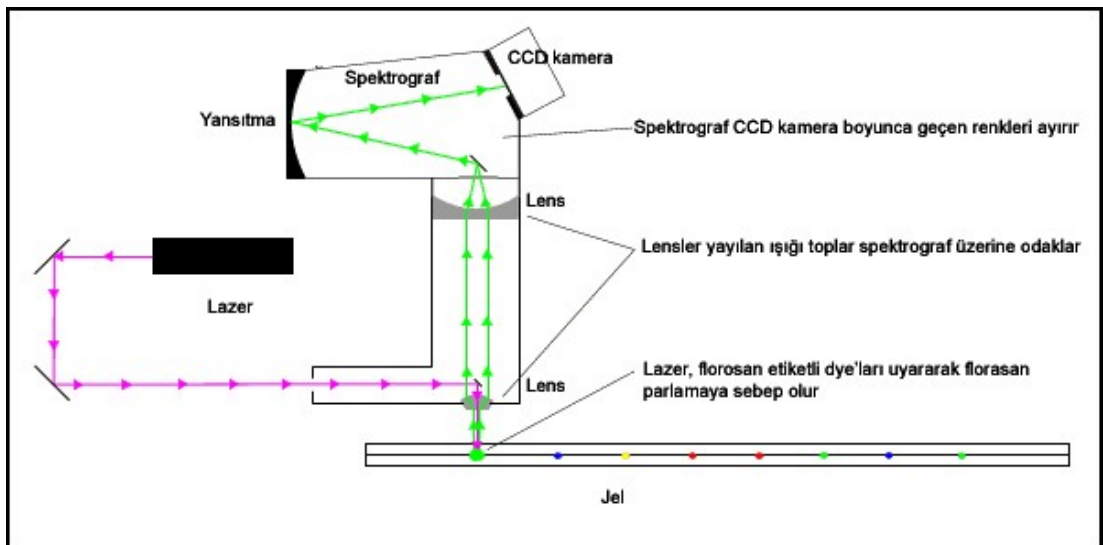


Şekil 1.10. Sekans işlemi sırasında oluşan farklı uzunluklardaki DNA iplikleri (Kimball, 2003)



Şekil 1.11. Sekans cihazı tarafından gerçekleştirilen elektroforez işleminin şematik gösterimi (Vierstraete, 1999)

Florasan işaretli DNA fragmentleri, otomatik sekans cihazı içinde gerçekleştirilen elektroforez işlemi sırasında negatiften pozitif doğru hareket ederken dedektör bölgeye geldiklerinde, cihaz içinde bulunan bir lazer kaynağından yayılan lazerin lensler yardımı ile fragmentlere bağlı florasan işaretli ddNTP'lere yönlendirilmesi ile florasan ışımaya başlamaktadır, oluşan ışımaya, yine lensler yardımı ile, oluşan renge duyarlı CCD kamera aktarılırak dedektör bölgeden geçen florasan işaretli ddNTP'nin hangi baz olduğu tespit edilmektedir (Şekil 1.12).



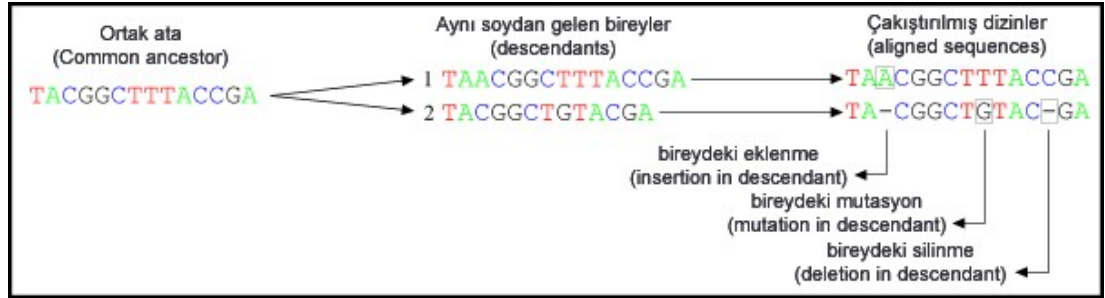
Şekil 1.12. Otomatik sekans cihazı çalışma şeması (Vierstraete, 2004)

Sekans çalışmalarında elde edilen sonuçların daha güvenli olması için aynı DNA parçasına ait ileri (forward) ve geri (Revers) yönlü iki primer kullanılarak DNA dizini 5' ucundan 3' ucuna ve 3' ucundan 5' ucuna doğru iki kez sentezlenmekte daha sonra elde edilen sonuçlar karşılaştırılmakta (align) ve karşılaştırılmakta böylelikle kesin sonucun eldesine çalışılmaktadır (Vierstraete, 2004).

### 1.3.3. Sekans sonuçlarınının karşılaştırılması (align) ve mutasyonların tespiti

Farklı bireylerin aynı gen bölgesine sahip iki veya daha fazla DNA parçası karşılaştırmak istendiğinde bu parçaların baz dizinlerinin üst üste getirilmesi gerekmektedir ki bu işlem karşılaştırma (align) olarak adlandırılır.

DNA dizinleri karşılaştırıldığında eklenme (insertion), silinme (deletion) ve mutasyon gibi değişimler izlenebilmektedir (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. Aynı soydan gelen bireyler arasında gözlenebilecek genetik değişimler (Vierstraete, 2004)

DNA dizinlerinin karşılaştırılmasında farklı yöntemler kullanılabilir.

Örnek olarak TCAGACGATTG ve TCGGAGCTG dizinlerinin karşılaştırılacağı düşünülürse aşağıdaki seçenekler kullanılabilir.

#### 1. Hatalı karşılaştırmaların en aza indirilmesi :

TCAG-ACG-ATTG  
 || | | | |  
 TC-GGA-GC-T-G

0 hatalı karşılaştırma 7 doğru karşılaştırma 6 boşluk

#### 2. Boşluk sayısının düşürülmesi:

TCAGACGATTG  
 || ||  
 TCGGAGCTG--

5 hatalı karşılaştırma 4 doğru karşılaştırma 2 boşluk

### 3. Hatalı karşılaştırma ve boşluk sayısının düşürülmesi:

TCAG-ACGATTG

| | | | | |

TC-GGA-GCTG-

2 Hatalı karşılaştırma 6 doğru karşılaştırma 4 boşluk

Bununla birlikte bu seçeneklerden hangisinin en etkili olduğunun algoritmik olarak araştırılması sonucunda bireyler arası uzaklığın en düşük ve sonuçların en güvenilir olduğu yöntem 3 no'lu yöntem olarak tespit edilmiştir.

Bireyler arası uzaklığın algoritmik olarak hesaplanmasında aşağıdaki formülden yararlanılmıştır (Vierstraete, 2004).

$$D = y + \sum (w_k z_k)$$

D = Uzaklık

y : Hatalı karşılaştırma sayısı

w : k dizininin içerdiği boşluk sayısı için hata payı çarpanı,

z : k dizininin içerdiği boşluk sayısı

Buna göre;

1. yöntem:  $D = 0 + \{(2 \times 6) + (6 \times 0)\} = 12$

2. yöntem:  $D = 5 + \{(2 \times 0) + (6 \times 1)\} = 11$

3. yöntem:  $D = 2 + \{(2 \times 4) + (6 \times 0)\} = 10$  puan almıştır.

Günümüzde karşılaştırma işlemi; bu işlem için özel olarak yazılan programlar yardımı ile gerçekleştirilmektedir.

#### 1.3.4. Filogenetik Analiz

Filogenetik; canlılara ait genetik materyali inceleyerek, ortak bir atadan gelen bireyler arasındaki akrabalık uzaklığını tespit ederek biyolojinin birçok alanına hizmet vermektedir. Patogen etkenlerin bulaşma ve yayılma orjinlerinin tespiti ile de epidemiyolojide kullanım alanı bulmuştur.

Filogenetik, epidemiyolojik çalışmalarda başarı ile kullanılmakla birlikte tüm dünya tarafından kabul gören evrensel bir filogeni yönteminin bulunmaması, filogenetik çalışmalarda kullanılan programların birbirine yakın karakterdeki bireylerin ayrımı konusunda farklı sonuçlar verebilmesi, aynı canlıya ait bir gen üzerinde yapılan

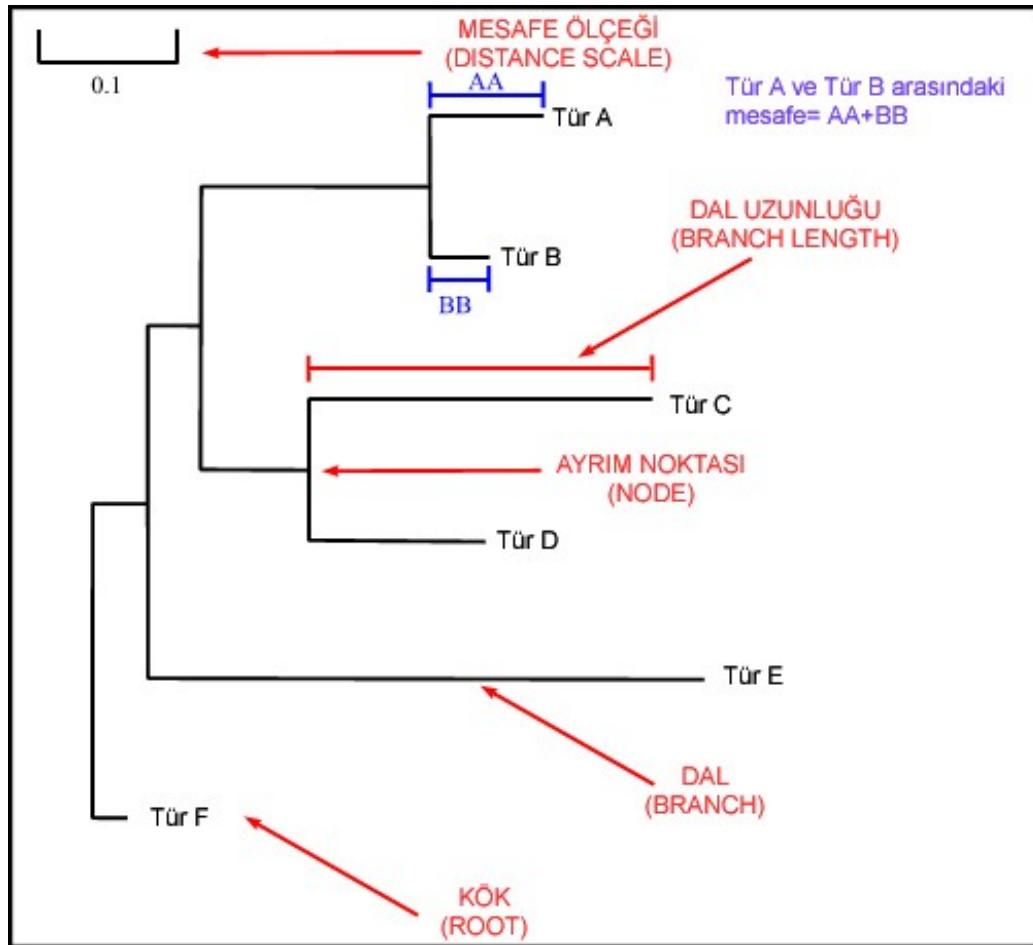
filogenetik çalışmaların farklı bir gen üzerinde aynı sonuçları vermemesi gibi henüz kesin çözümleri bulunamamış problemleri bulunmaktadır.

Filogenetik çalışmalar, çizilme yöntemine göre dendogram veya cladogram olarak adlandırılan soy ağaçları yardımı ile gerçekleştirilmektedir.

**Tablo 1.7. Filogenetik çalışmalarda kullanılan başlıca terimler (Vierstraete, 2004)**

<b>Ayrım noktası (node) :</b>	İki veya daha fazla bireyin ortak atasını temsil eden taksonomik bir birimi temsil etmektedir.
<b>Dal (branch) :</b>	Sınıf içindeki bireyler arası ilişkiyi temsil etmektedir.
<b>Dal uzunluğu (branch length) :</b>	Dal içindeki farklılık oranını gösterir.
<b>Kök (root) :</b>	Sınıf içindeki bireylerin ortak atasıdır.
<b>Mesafe ölçeği (distance scale) :</b>	DNA dizinleri arasındaki farklılığın ölçeğidir.

Filogenetik ağaçların çiziminde kullanılan başlıca terimler Tablo 1.7’de verilmiş ve Şekil 1.14’de şematik olarak gösterilmiştir.



**Şekil 1.14. Filogenetik terimler (Vierstraete, 2004)**

Filogenetik çalışmalarda kullanılan ağaçlar; ölçekli veya ölçeksiz, köklü veya köksüz şekillerde çizilebilmektedir (Şekil 1.15).

Ölçeksiz ağaçlarda, dal uzunlukları bireyler arası farklılıklara göre değişmemekte, tür içi ayırım noktaları (node) zaman skalası üzerinde gösterilerek tür içi bireylerin evrimsel gelişimlerinin zamana bağlı değişimi tanımlanmaya çalışılmaktadır. Bu durum epidemiyolojide, güncel bir salgından izole edilen bir mikroorganizmanın evrimsel olarak atasının bulunması yolu ile daha önceki yıllarda ortaya çıkan salgınlardan hangisi ile ilişkili olduğunun anlaşılmasında fayda sağlamaktadır.

Ölçekli ağaçlarda dal uzunlukları bireyler arası farklılıkla orantılı olarak değişebilmekte türler arası mesafe, türü gösteren dalların uzunlukları toplamı ile bulunmaktadır (Şekil 1.14).

Köklü ağaçlarda incelenmesi istenen bireyler arasında tüm bireylerin atası olduğu bilinen bir ortak ata kök olarak kullanılmakta ve bireylerin bu atadan ne kadar farklılaşarak geliştiği tespit edilmektedir.

Köksüz ağaçlarda tür içindeki bireylerin evrimsel gelişimi incelenmemekte yalnız bireyler arası farklılıkların tespiti amaçlanmaktadır.

Filogenetik ağaçların çiziminde temel olarak fenetik (phenetic) metod ve kladistik (cladistic) metod olmak üzere iki yöntem kullanılmaktadır.

**1- Fenetik (phenetic) metod:** DNA dizinleri arasındaki benzerliği tespit ederek bireyler arasındaki uzaklığı bulmayı amaçlayan bir yöntemdir. Distance yönteminden köken alır. Distance yöntemi; dizinler arasındaki bireysel farklılıkların tamamını tek bir sayıya dönüştürmektedir. Bu yöntem ile çizilen ağaçlar *dendogram* veya *fenogram* adını almakta ve bireyler arasındaki evrimsel ilişki hakkında bilgi içermemektedir. DNA dizinleri arasındaki tüm farklılıkların toplanması ile uzaklık iskeletleri (distance matrix) hesaplanır ve birbirlerine en çok benzeyen dizinler ilişkili kabul edilir. Bu yöntemde;

- Tüm baz değişimleri eşit olarak puanlanır.

- Eklenme ve silinmelere yer değiştirmelerden daha fazla puan verilir. Bir nokta üzerindeki eklenme ve silinmeler farklı noktalarda birbirinden bağımsız oluşarlardan daha az puan alır.
- Bireyler arası uzaklığın tespitinde kullanılan uzaklık iskeletleri (distance matrix) sınıflandırma algoritması (clustering algorithms) ile hesaplanır. Böylelikle DNA dizinleri yakından uzağa doğru sıralanır.

Distance matrix yöntemi temel olarak iki şekilde uygulanmaktadır.

1- Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages (UPGMA)

2- *Neighbor Joining*: Tür içindeki evrim oranını tahmin ederek UPGMA yönteminde karşılaşılabilecek hataların düzeltilmesi amacıyla geliştirilmiştir (Vierstraete, 2004).

**2- Kladistik (cladistic) metot:** Genetik materyalde oluşan farklılaşmaların evrimsel yolla hesaplanması yolu ile genetik ağaç çizimi yapılan bu yöntemde, çizilen ağaçlar *cladogram* adını almaktadır. Başlıca parsimony veya likelihood yöntemlerini kullanmaktadır.

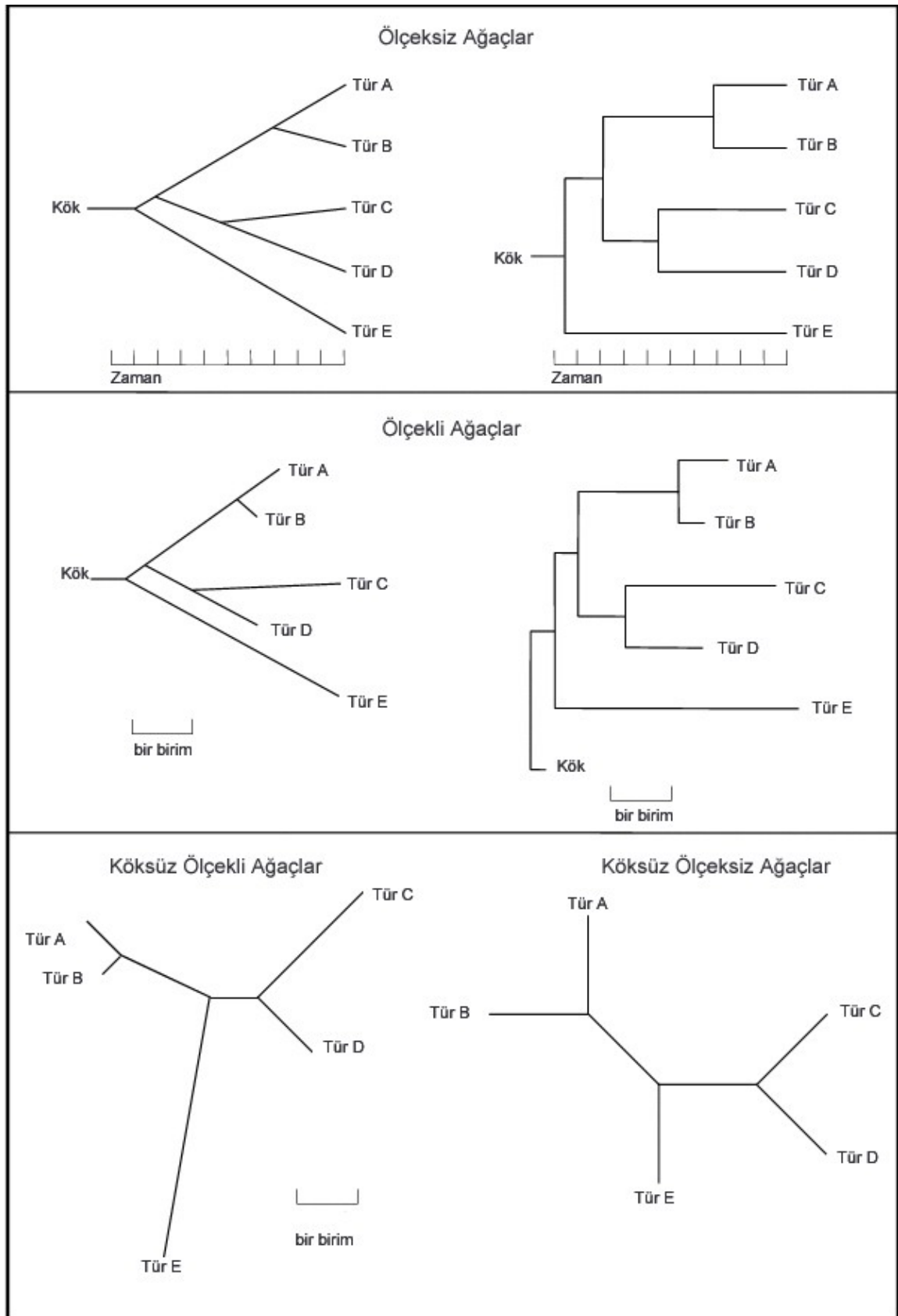
Parsimony yönteminde ağaçların çiziminde, çakışma (aling) pozisyonları evrimsel veri olarak kullanılır. Puanlama sonucunda evrimsel değişim miktarı en düşük hesaplanan birey ortak ataya en yakın kabul edilir. Distance matrix yöntemine göre daha fazla zaman alıcı bir yöntemdir.

Maximum likelihood parsimony'den farklı olarak yalnız en düşük evrimsel farklılığı incelemey, ağaç çiziminde kapsamlı bir evrim modeli kullanır. Hesaplanması uzun sürmekle birlikte en muhtemel ve en güvenilir sonuçlar hesaplanmamaktadır.

DNA dizinlerinde elde edilen sonuçların evrimsel incelenmesinde teorik olarak bazı problemler mevcuttur. Genetik materyaldeki transition, transversion, inversion gibi bazı değişimlerin tespit edilmesi mümkün değildir.

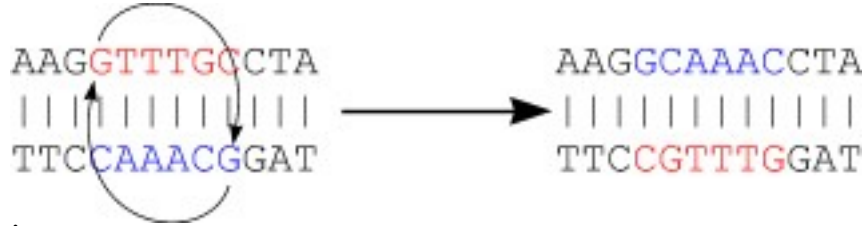
- Transition: Geri dönüşümlü bir mutasyon ile önce A'dan G'ye veya C'den T'ye dönen bir baz yeniden G'den A'ya veya T'den C'ye dönebilir.





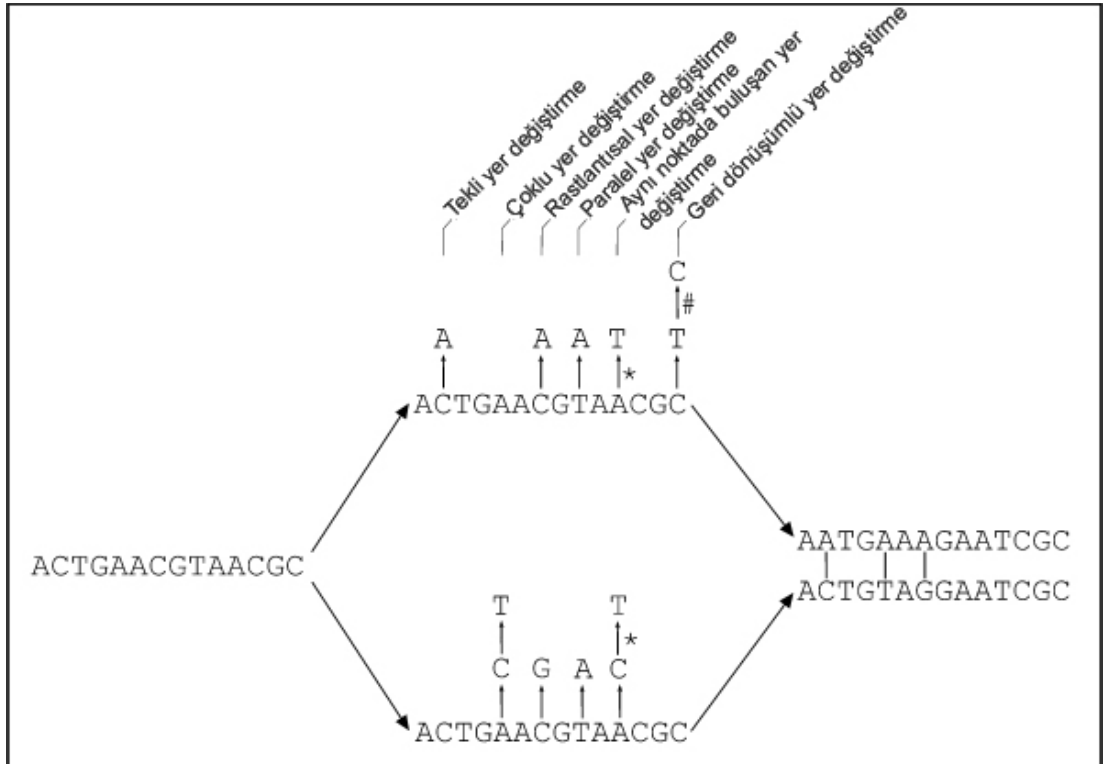
Şekil 1.15. Farklı filogenetik ağaçlardan örnekler (Vierstraete, 2004)

- Transversion: Geri dönüşümlü bir mutasyon ile önce G'den C'ye ; veya T'den A'ya dönen bir baz yeniden C'den G'ye veya A'dan T'ye dönebilir.
- Inversion: Çift sarmallı DNA segmentinin 180 °C dönerek complementeri olan segmente bağlanabilir (Şekil 1.16).



Şekil 1.16. Inversion (Vierstraete, 2004)

Ortak bir atadan gelen bireylerde oluşabilecek; tekli , çoklu, paralel , geri dönüşümlü, rastlantısal ve aynı noktada buluşan yer değiştirme gibi maximum likelihood tekniğinin temelini oluşturan farklılaşmalar Şekil 1.17'de verilmiştir (Vierstraete, 2004).



Şekil 1.17. Ortak atadan gelen iki bireye ait nükleotit dizinlerinde görülebilecek farklılaşmalar (Vierstraete, 2004)

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereç

- *Virus Suşları:* Çalışmada kullanılan virus suşları; Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Manisa Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü ve Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüleri'nden, allantoik sıvı içinde, toplam 14 adet olmak üzere temin edildi. Örnekler için Tablo 2.1'de verildi. Çalışmanın başlangıcında çalışma sırasında çıkabilecek salgınlardan edinilen örneklerden ve deneysel SPF civciv inokulasyonlarından edinilecek marazi maddelerden herhangi bir ön çoğaltma olmaksızın direkt virus ekstraksiyonunu takiben PCR ve DNA dizin analizi yapılması planlandı, ancak çalışma boyunca çıkan salgınlardan hastalıklı materyal eldesinin mümkün olmayışı ve deneysel inokulasyonların yapılması planlanan Manisa Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nün kapatılması sebebiyle çalışmanın "marazi maddeden direkt etken identifikasyonu" amacı gerçekleştirilemedi.

**Tablo 2.1. Bu çalışmada DNA dizinleri belirlenen virus suşları**

Örnek Etiketi	İzole Edildiği İl	Enstitü
Ankara-1	Ankara	Etlik Merkez Vet. Kont. ve Arşt. Enstitüsü
Ankara-2		
Ankara-M		
Ankara-C		
Çorum	Çorum	
Bolu	Bolu	
İzmir	İzmir	
Bursa-28	Bursa	Manisa Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü
Bursa-34		
Manisa-4	Manisa	
Manisa-5		
Manisa-6		
Konya-1	Konya	Konya Vet. Kont. ve Arşt. Enstitüsü
Konya-2		

- *Haemaglutinasyon ve ETY ekim materyalleri:* Haemaglutinasyon için gereken %1'lik eritrosit solüsyonu, FTS ve U tabanlı plate'ler Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, EMVKA, Tavukçuluk Araştırma

Laboratuvarı'ndan, virusun çoğaltılmasında kullanılan embriyolu tavuk yumurtaları (ETY) Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı.

- *Ekstraksiyon ve pürifikasyon kitleri:* Ekstraksiyon amacı ile Trizol (GibcoBRL) kullanıldı, saflaştırmada DyeEx 2.0 spin kit (Qiagen) sekans pürifikasyon ve Qiaquick (Qiagen) jel pürifikasyon kitlerinden faydalanıldı.
- *PCR ekipmanları:* PCR işlemi EMVKA Enstitüsü Viroloji Laboratuvarı'nda bulunan Px2 (Termo Hybaid) termal cyler cihazı yardımı ile gerçekleştirildi.
- *PCR kimyasalları:* Ticari olarak sağlandı; Revers transcriptase (Fermentas), RNA'se inhibitörü (ApplyChem), 5 x RT buffer (Fermentas), TAq DNA polimerase (Fermentas), 10 x PCR buffer (Fermentas), MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), DNA'se ve RNA'se free su (Fermentas), DNA ladder (Fermentas), dNTPs (Fermentas), Loading buffer (Invitrogen).
- *PCR ürünlerinin görüntülenmesi için kullanılan ekipmanlar:* Bu amaçla kullanılan, UV transilluminator (Ultra-violet Products/UVP), polaroid fotoğraf makinesi (GelCam-Polaroid) ve/veya jel dökümantasyon cihazı (Pharmacia Biotech Image Master-VDS + Fujifilm Termal Imagine System FTI-500) EMVKA Enstitüsü Kuduz Teşhis Laboratuvarı'ndan sağlandı.
- *Primerler:* Çalışmada Tablo 2.2'de baz dizini ve kaynağı verilen primerler kullanıldı. Primer dizaynları Aldous ve ark. (2003) göre düzenlendi ve ticari olarak sentezletirildi.

**Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan primerler ve primeri ilk kez kullanan araştırmacılar**

Primer	Primer Dizini	Dizini bulan araştırmacı/lar
PCR forward primer	(MSF1) 5'-GACCGCTGACCACGAGGTTA	(Aldous ve ark., 2003)
Sekans forward primer	(#7) 5'-TTAGAAAAAACACGGGTAGAA	(Collins ve ark., 1996)
Sekans ve PCR reverse primer	(#2) 5'-AGTCGGAGGATGTTGGCAGC	(Collins ve ark., 1993)

- *Sekans ekipman ve kimyasalları:* Sekans işlemi, EMVKA Enstitüsü Viroloji Laboratuvarında bulunan Perkin Elmer Applied Biosystems ABI 310 genetik analiz cihazında gerçekleştirildi. Bu amaçla “BigDye (Perkin Elmer) kullanıma hazır sekans kiti ve POP-6 (Perkin Elmer) polimer’den faydalanıldı.
- *DNA baz dizini karşılaştırma, genetik ağaç çizimi ve protein yapısındaki değişikliklerin tayini için kullanılan programlar:* Bu amaçla kullanılan; BioEdit 7.0.4.1 (Hall, 1999), MEGA3 (Tamura ve Kumar, 2002), Treeview 1.6.6 (Roderic, 2001), Clustal X (Thompson ve ark., 1997), Cn3D 4.1 (NCBI, 2002), Phylip 3.6 (Felsenstein, 2004), Neighbor TreeMaker (Las Alamos National Laboratory, 2004) adlı programlar internet aracılığı ile ücretsiz olarak sağlandı.

## 2.2. Yöntem

Çeşitli enstitülerden edinilen virus örnekleri, virus titresinin artırılması amacı ile 9-11 günlük embriyolu tavuk yumurtalarının (ETY) allantoik boşluğuna ekildi ve yumurta ölümleri hergün kaydedilerek 5 gün sonra tüm infekte allantoik sıvılar toplandı. Allantoik sıvılardaki virus varlığı haemaglutinasyon, HA, testi ile araştırıldı, pozitif olan örnekler ayrılarak HA değerleri kaydedildi (Tablo 2.3), daha sonra bu örneklerle sırasıyla Tablo 2.4’de bildirilen yöntemler uygulanarak, tüm örneklerin DNA dizinleri tespit edildi. HA testi OIE Manuel 2004’de bildirildiği şekilde yapıldı.

**Tablo 2.3. Çalışmada DNA dizini tespit edilen örneklere ait HA değerleri**

	<b>NDV Suşu</b>	<b>HA</b>
<b>1.</b>	Bursa-28	1/64
<b>2.</b>	Bursa-34	1/64
<b>3.</b>	Ankara-1	1/64
<b>4.</b>	Konya-1	1/16
<b>5.</b>	Konya-2	1/128
<b>6.</b>	Ankara-M	1/128
<b>7.</b>	Ankara-C	1/8
<b>8.</b>	Çorum	1/64
<b>9.</b>	Bolu	1/128
<b>10.</b>	Ankara-2	1/256
<b>11.</b>	İzmir	1/32
<b>12.</b>	Manisa-4	1/1024
<b>13.</b>	Manisa-5	1/256
<b>14.</b>	Manisa-6	1/256

**Tablo 2.4. Çalışma boyunca takip edilen basamaklar**

<b>1.</b> Ekstraksiyon
<b>2.</b> Revers Transkripsiyon (RT)
<b>3.</b> Polymerase Chain Reaction (PCR)
<b>4.</b> Elektroforez ve PCR ürünlerinin görüntülenmesi
<b>5.</b> PCR ürünlerinin saflaştırılması
<b>6.</b> Sekans PCR
<b>7.</b> Sekans PCR ürünlerinin saflaştırılması
<b>8.</b> Sekans
<b>9.</b> Sonuçların değerlendirilmesi
<b>10.</b> Sonuçların Dünya'nın çeşitli bölgelerinden izole edilen diğer virus suşlarına ait sonuçlarla karşılaştırılması ve genetik ağaçların çizilmesi
<b>11.</b> Genetik yapıda tespit edilen baz düzeyindeki mutasyonların virusun antijenik yapısında oluşturabileceği farklılıkların üç boyutlu görüntülenmesi

### 2.2.1. Allantoik Sıvılardan Virus'a Ait RNA'nın Ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonunda tryzol kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi üreticinin (GibcoBRL) bildirdiği ve aşağıda kısaca özetlendiği şekilde yapıldı.

- **200 µl allantoik sıvı 1ml Trizole** ilave edildi.
- **Vortexlendi ve oda sıcaklığında 5 dk** bırakıldı.
- **200 µl chloroform** eklendi ve **15 saniye** boyunca vortexlendi.
- **Oda sıcaklığında 2-3 dk** beklenildi.
- **13000-14000 rpm'de 15 dk 4 °C'de** santrifüje edildi.
- Bu esnada **1.5 ml**'lik eppendorf tüplerine **1µl** glikojen konuldu.
- Santrifüj sonrası tüpün üstünde oluşan **500 µl** lik **şeffaf faz** alınarak daha önce glikojen konularak hazırlanan tüplere aktarıldı.
- Üzerine **500 µl isopropanol** eklendi, kısaca karıştırıldı ve **oda sıcaklığında 10 dk** bırakıldı.
- **13000-14000 rpm'de 10 dk 4 °C'de** santrifüje edildi.
- Süpernatant aspire edildi.
- **1ml %70**'lik etanol pelete ilave edildi.
- **13000-14000 rpm'de 5-7 dk 4 °C'de** santrifüje edildi.
- Süpernatant aspire edildi, **5 dk oda sıcaklığında** kuruması için bırakıldı.
- **20-25 µl** RNA inhibitörü içermeyen (RNase free) su ilave edilerek pelet çözdürüldü ve kısaca karıştırıldı. Uzun süreli saklama amacı ile **-70 °C**, kısa süreli saklama amacı ile **-20 °C**'ye kaldırıldı.

### 2.2.2. Revers Transcription (RT)

Aldous (2003)'ün bildirdiği ve aşağıda kısaca açıklandığı şekilde yapıldı (yöntem modifiye edilerek kullanılan RNA ve primer miktarları iki katına çıkartıldı).

#### 2.2.2.1. Testte Kullanılacak Karışımların Hazırlanması

İki adet karışım hazırlandı. Tablo 2.5'de bildirilen miktarlar örnek başına verilmiştir.

Tablo 2.5. RT- PCR karışımları

Karışım 1:		
Reagent	Miktar	Toplam
dH <sub>2</sub> O	3.0 µl	5.0 µl
PCR forward primer (MF1)	2.0µl	
Karışım 2:		
Reagent	Miktar	Toplam
5 x RT buffer	4.0µl	10 µl
dH <sub>2</sub> O	4.0µl	
40mM dNTP's	1.0µl	
MMLV-RT	0.5µl	
RNASin (RNase inhibitörü)	0.5µl	

#### 2.2.2.2. İlk Aşama; RNA'ya Ait Sekunder Yapıların Çözdürülmesi

- Her bir örnek tüpünün üzerine örnek no, tarih, kullanılan primer yazıldı. Ya da kısaca her bir tüp üzerine numara yazılarak ilgili numara hakkındaki detaylar tablo haline getirildi.
- Daha önce ekstrakte edilen **RNA'lardan 5.0 µl** ilgili tüpe kondu.
- Tüm tüplere **5.0 µl karışım 1**'den ilave edildi ve kısaca karıştırıldı.
- Tüpler **95 °C'de 2 dk** bekletildi.
- Bitiminde **buzda** soğutuldu.

#### 2.2.2.3. İkinci Aşama; RNA'dan cDNA Oluşturulması

- 10 µl karışım 2** den ilave edildi ve **37 °C'de 1 saat** bekletildi.
- Çıkartılan örnekler **buza kondu** veya kullanılıncaya kadar **-20 °C'de** saklandı.

#### 2.2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Aldous (2003)'ın bildirdiği ve aşağıda kısaca açıklandığı şekilde yapıldı (yöntem modifiye edilerek kullanılan cDNA miktarı iki katına çıkartıldı).

##### 2.2.3.1. PCR Karışımının Hazırlanması

RT işlemi sonucu elde edilen her 10 µl cDNA örneğinin üzerine Tablo 2.6' da içeriği belirtilen PCR karışımı ilave edildi. Örnekler termal cyclus cihazına yerleştirilerek Tablo 2.7'de özellikleri bildirilen program uygulandı.



**Tablo 2.6. PCR Karışımı**

Reagent	Miktar	Toplam
10 x PCR Buffer	5 µl	40 µl
MgCl <sub>2</sub> 25mM	3 µl	
Forward primer 10 pmol	1 µl	
Revers primer 10 pmol	1 µl	
dNTPs 40mM	1 µl	
Taq DNA polymerase 1.25 U	1,25 µl	
DNase free su	27,75 µl	

**Tablo 2.7. Termal Cycler'in Programlanması (Termo Hybaid)**

<b>STAGE 1</b>	Cycle x 1
<b>Step 1</b>	95 °C 1dk
<b>STAGE 2</b>	Cycle x 30
<b>Step 1</b>	94 °C 1dk
<b>Step 2</b>	50 °C 1 dk
<b>Step 3</b>	72 °C 3 dk
<b>STAGE 3</b>	Cycle x 1
<b>Step 1</b>	72 °C 10 dk
<b>Hold</b>	4 °C

## 2.2.4. PCR Ürünlerinin Jelde Koşturularak Görünür Hale Getirilmesi

### 2.2.4.1. Jelin Hazırlanması

- 10 x Tris-borate-EDTA buffer (TBE) aşağıda tarif edildiği şekilde hazırlandı.
- 109 gr Tris base, 55 gr borik asit ve 9.3 gr EDTA geniş bir container'da karıştırıldı. Üzerine 1 lt distile su ilave edildi ve pH'nın 8.3 olduğu kontrol edildi. Gerekliğinde bu solüsyon 10 katı sulandırılarak 1 x TBE şeklinde kullanıldı.
- 1 gr düşük sıcaklıkta eriyebilen agar (low melt temperature agar ; LMA) veya 0.75 gram normal agar tartılarak 250 ml'lik balon joje'ye aktarıldı.
- Üzerine 50 ml (küçük elektroforez tankı kullanılıyorsa) 1 x TBE ilave edildi.
- Mikrodalga fırın 540 w - 35 sn'ye ayarlandı.
- Balon joje, ağzı pamukla kapatılıp kısaca karıştırıldıktan sonra mikrodalga fırına yerleştirildi ve fırın çalıştırıldı. Her 10 sn'de bir agarın durumu kontrol edildi, böylelikle kaynatarak taşması önlendi.

- Agarın tamamen homojenize olarak eridiği anlaşıldığında beaker fırından çıkartıldı, biraz soğuması beklendikten sonra 1 µl ethidium bromide eklendi, kısaca dairesel olarak çalkalandı ve daha önce kenarları kapatılarak hazırlanan elektroforez tankına döküldü.
- Tarak tankın üzerine tabanla arasında birkaç milimetre kalacak şekilde yerleştirildi.
- Yaklaşık 10 dk agarın katılaşması beklendi ve tarak çıkartıldı.
- Elektroforez tankı yerine yerleştirildi, jelin üzeri kapanıncaya kadar 1 x TBE ile dolduruldu (Anonim, 2003).

#### **2.2.4.2. Örneklerin Jel'e yüklenmesi**

Küçük dişli tarak için;

- 5 veya 10µl marker (DNA ladder) birinci göze konuldu.
- Her örnek için 2 µl loading buffer bir parafilm üzerine konuldu.
- 10 µl örnek alınarak 2 µl loading buffer ile karıştırılıp jelin tarak tarafından açılan gözlerine sıra ile yüklendi.
- Tüm örnekler jele yüklendikten sonra kapak kapatıldı.
- Büyük tarak için miktarlar 2 ile çarpıldı (Anonim, 2003).

#### **2.2.4.3. Elektroforez İşlemi ve Sonuçların Görüntülenmesi**

Elektroforez güç kaynağı, 100 volt, 85 dk'ya programlandı, Süre bitiminde jel tanktan çıkartıldı ve UV transilluminator yardımı ile görüntülenen bantların poloroid fotoğraf makinesi veya jel dökümantasyon cihazı yardımı ile fotoğrafları çekildi (Anonim, 2003).

#### **2.2.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması**

Üreticinin (Qiagen) bildirdiği ve aşağıda kısaca özetlendiği şekilde yapıldı.

- İstenen bant olabildiğince yakından ve başka bir bant karışmadan kesildi ve 1,5 ml ependorf tüpe kondu.
- 300µl QC buffer kesilen jel üzerine ilave edildi. Jel parçası büyükse bu miktar biraz daha arttırıldı.

- ~56 °C’de ~5 dk jel eriyinceye kadar beklendi.
- Jel eriyince 100µl isopropanol ilave edildi ve karıştırıldı.
- Karışım spin kolonuna kondu ve 1 dk 13000 Rpm’de santrifüje edildi, süzüntü atıldı.
- 500µl QC buffer ilave edildi ve tekrar 1 dk 13000 Rpm’de santrifüje edildi ve süzüntü atıldı.
- 750µl PE buffer ilave edildi ve tekrar 1 dk 13000 Rpm’de santrifüje edildi süzüntü atıldı.
- 1 dk 13000 Rpm’de boş olarak santrifüje edildi.
- Spin kolonu, kapağı kesilen 1,5 ml’lik bir ependorf tüpe yerleştirildi, üzerine 25µl EB (elution buffer) veya dH<sub>2</sub>O eklenerek 1-5 dk bekletildi ve 14000 Rpm’de 1 dk santrifüje edildi.
- Süzüntü, istenen büyüklükte bir ependorfa aktarılarak etiketlendi.
- Kullanılincaya kadar -20 °C’de donduruldu veya buzda bekletildi.

### 2.2.6. Sekans PCR

Üreticinin bildirdiği (Perkin Elmer Applied Biosystems/ ABI-310) ve aşağıda kısaca özetlendiği şekilde yapıldı.

#### 2.2.6.1. Sekans PCR karışımının hazırlanması

Tablo 2.8. Sekans PCR Karışımı

	Tam Hacim	Yarım Hacim
<b>Terminator ready reaction mix</b>	8 µl	4 µl
<b>PCR ürünü</b>	~5 µl (30-90 ng)	~ 3 µl
<b>Primer</b>	3.2 pmol	1.6 pmol
<b>DNase free su</b>	Y µl	Y µl
<b>Toplam</b>	20 µl	10 µl

Y miktarları toplam hacim, tam hacimde 20 µl, yarım hacimde 10 µl olacak şekilde belirlendi. Her örnekten tam hacimde 5 µl, yarım hacimde 3 µl çalışıldı, saflaştırılmış PCR ürünlerinden elde edilen bantların beklenenden ince olması durumunda bu miktar 1-2 µl arttırıldı.

### 2.2.6.2. Sekans PCR Thermalcycler Programı

Sekans karışımı ilave edilerek hazırlanan örnekler termal cycler'a yerleştirilerek Tablo 2.9'da ayrıntıları verilen program çalıştırıldı.

**Tablo 2.9. Sekans PCR thermalcycler programı**

Stage 1	Step 1 96 °C 10 sn	x 25 cycle
	Step 2 50 °C 5 sn	
	Step 3 60 °C 4 dk	
Hold Temperature 4 °C		

### 2.2.7. Sekans PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Üreticinin bildirdiği (Qiagen) ve aşağıda kısaca özetlendiği şekilde yapıldı.

- Hafifçe çalkalanarak spin kolonu içindeki sıvı resüspanse edildi.
- Spin kolonun altındaki kulakçık çevrilerek kopartıldı.
- Kolon 2 ml lik kalıntı tüpüne (kitin içinden çıkmaktadır) aktarıldı.
- **2800 rpm'de 3 dk** santrifüje edildi.
- Spin kolonu dikkatlice temiz bir tüpe aktarıldı. Üzerine yavaşça "sekans PCR" sonrası ürün (**10-20 µl**) ilave edildi.
- **2800 rpm'de 3 dk** santrifüje edildi.
- Süzüntü sekans işleminde kullanılmak üzere buz üzerine alındı ya da bekletilecekse -20 °C'ye kaldırıldı.

### 2.2.8. Sekans İşlemi

Üreticinin (Perkin Elmer Applied Biosystems/ ABI-310) bildirdiği şekilde gerçekleştirildi.

### 2.2.9. Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Örnekler Bioedit programı yardımı ile füzyon proteinine ait başlangıç kodonundan başlamak ve 400 bazlık eşit uzunluğa sahip olmak üzere birbirleri ve ülkemiz dışında izole edilen viruslarla Clustal W metodu ile karşılaştırıldı (align). Fasta formatında kaydedilen örnekler daha sonra *neighbor tree maker* programı ile açılarak neighbor joining yöntemi ile genetik ağaçlar çizildi.

*Neighbor tree maker* programı yardımı ile çizilen genetik ağaçların daha net görüntülenmesi için programdan elde edilen veriler daha sonra Treeview programı yardımı Newhampshire (Newick) formatına çevrildi ve MEGA-3 programı ile görüntüldü.

### 2.2.10. Sonuçların Ülkemiz Dışında İzole Edilen Diğer Viruslarla Taksonomik Olarak Karşılaştırılması

Filogenetik çalışmalarda Aldous'ın (2003) yaptığı genetik sınıflandırma baz alındı ve örnekler bu sınıflandırmaya göre gruplandırıldı. Bunun yanında örnekler kendi aralarında ve komşu ülkelerden izole edilen NDV suşlarına ait DNA dizinleri ile karşılaştırılarak, muhtemel bulaşma kaynakları hakkında bilgi edinilmesi amaçlandı.

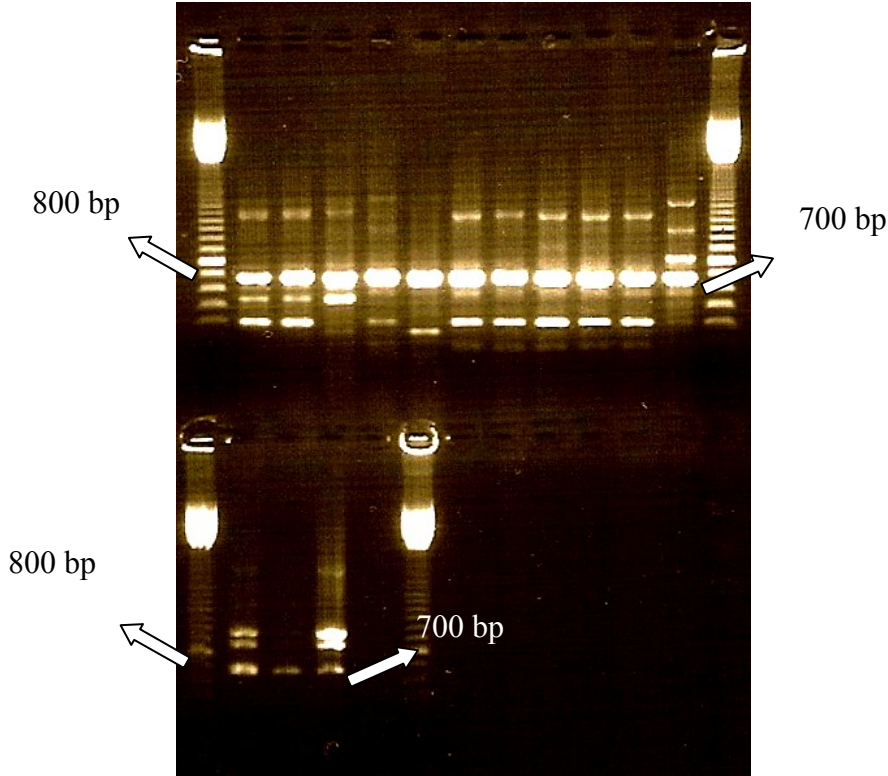
### 2.2.11. Genetik Yapıda Tespit Edilen Aminoasit Düzeyindeki Mutasyonların Füzyon Proteinine Ait Üç Boyutlu Yapıdaki Konumlarının Görüntülenmesi

Örneklere ait protein yapılarında bulunan farklılıklar ve bu farklılıklara sebep olan aminoasit yapıları, Cn3D 4.1 programı yardımı ile 3 boyutlu olarak görüntüldü.

### 3. BULGULAR

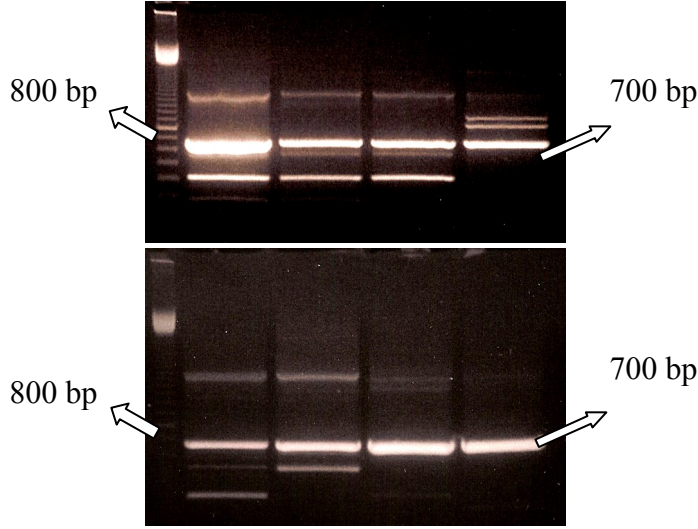
#### 3.1. RT-PCR Sonuçları

Yapılan RT-PCR sonucunda isimleri, izolasyon illeri ve edinildiği enstitüler, Tablo 2.1’de belirtilen 14 adet Newcastle virusu suşuna ve kullanılan primerlere spesifik, beklenen 700 bp’lik PCR ürünleri elde edildi. Elde edilen PCR ürünleri ethidium bromide’le boyalı agarose jelde koşturularak, UV transilluminatör yardımı ile görüntülendi ve jel dökümantasyon cihazı yardımı ile fotoğrafları çekildi (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1. RT-PCR sonuçları:** *Üst sıra soldan sağa sırasıyla;* DNA Size Marker, Bursa 28, Bursa 34, Ankara-1, Konya-1, Konya-2, Ankara-M, Ankara-Ç, Çorum, Bolu, İzmir-1, Ankara-2, DNA Size Marker. *Alt sıra soldan sağa sırasıyla;* DNA Size Marker Manisa-4, Manisa-5, Manisa-6.

Elde edilen sonuçlarda istenmeyen bantlar da bulunduğundan, PCR ürünleri Qiagen Jel Pürifikasyon Kiti yardımı ile saflaştırılmak üzere geniş bantlı taraklar kullanılarak, ethidium bromide boyalı agarose jelde 40-50 µl miktarlarda tekrar koşturuldu (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2. Jelden saflaştırma öncesi örneklerden bazıları: Üst Sıra;** DNA size marker, Ankara-M, Ankara-C, Ankara-1, Manisa-4. **Altsıra;** DNA size marker, Bursa 28, Ankara-2, Konya-1, Konya-2.

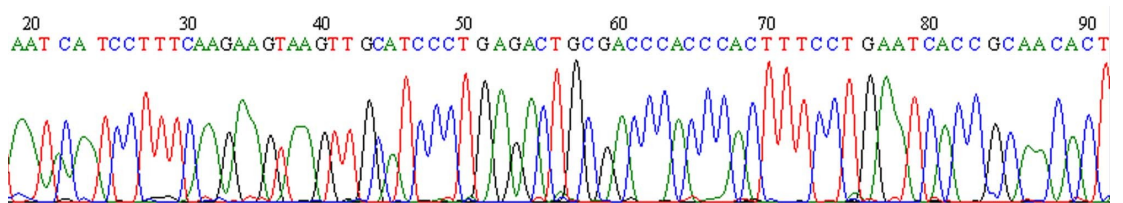
Pürifikasyon sonrası zayıf bant veren örnekler RT aşamasından itibaren kullanılan RNA ve cDNA miktarları iki katına çıkartılarak tekrar işlendi ve zayıf ürün veren örnekler çalışmadan çıkarıldı. Şekil 3.3’de pürifikasyon sonrası zayıf ürün vererek çalışmadan çıkarılan Manisa-1 ve Manisa-2 etiketli iki örnek görülmektedir.



**Şekil 3.3. Jel pürifikasyon sonrası ürünlerden bazıları: Soldan sağa sırasıyla;** DNA size marker, Ankara-M, Ankara-C, Ankara-2, İzmir, Manisa-1, Manisa-2, Manisa-4.

### 3.2. Sekans Analizi Sonuçları

Pürifiye edilen ürünler ABI 310 sekans cihazı yardımı ile sekans işlemine tabi tutuldu ve Şekil 3.4’de örneği verilen kromatogramlar elde edildi.



**Şekil 3.4. Sekans cihazından elde edilen cromotogramlardan bir kesit**

Elde edilen kromotogramlar yardımı ile tüm suşların F genine ait birinci bazdan başlamak üzere 400 bp'lik bir segmentin baz dizini tespit edildi. Dünya Gen Bankası'na Tablo 3.1'de belirtilen isim ve erişim no'ları ile 2006 yılı nisan ayında yayınlanmak üzere Türkiye adına girişleri yapılan örnekler için ait baz dizinleri Şekil 3.5'de bildirildi. Örneklerden; Bursa 28 ve Bursa 34' ün, Manisa 5 ve Manisa 6'nın, Bolu ve Ankara 2'nin, kendi aralarında aynı baz dizinine sahip olduğu görüldü.

**Tablo 3.1. Çalışmada DNA dizini belirlenen NDV suşlarının Gen Bankası erişim numaraları**

Örnek Etiketi	Gen Bank Etiketi	Erişim No'su
Bursa-28	B-28	DQ296068
Bursa-34	B-28*	DQ296068
Ankara-1	A-1	DQ296066
Konya-1	K-1	DQ296070
Konya-2	K-2	DQ296069
Ankara-M	A-M	DQ289793
Ankara-C	A-C	DQ289794
Çorum	C-1	DQ289795
Bolu	B-1	DQ296067
Ankara-2	B-1*	DQ296067
İzmir	İ-1	DQ289796
Manisa-4	M-4	DQ289797
Manisa-5	M-5	DQ289798
Manisa-6	M-5*	DQ289798

\* Aynı baz dizinine sahip örnekler için tek bir erişim numarası alındı.

Newcastle virus suşları arasında patojen - apatojen (velojenik - lentojenik) ayrımını yapmayı sağlayan F genine ait "cleavage site" adı verilen bölge, 111-119. amino asitler, tespit edildi ve çalışılan 14 adet örneğin, Manisa'dan izole edilen 3 adedi hariç tamamının velojenik olduğu görüldü (Tablo 3.2).



**Tablo 3.2. Türkiye’den izole edilen virüslara ait F geni - cleavage site bölgesi amino asit dizinleri**

<b>Velojenik</b>	NDV-Bursa-28	G G R R K K R F I G
	NDV-Bursa-34	. . . . .
	NDV-Konya-2	. . . Q . . . . .
	NDV-Ankara-1	. . . Q . . . . .
	NDV-Konya-1	. . . Q . . . V .
	NDV-Ankara-M	. . . Q R . . . . .
	NDV-Ankara-C	. . . Q R . . . . .
	NDV-Corum	. . . Q R . . . . .
	NDV-Bolu	. . . Q R . . . . .
	NDV-Ankara-2	. . . Q R . . . . .
	NDV-Izmir	. . . Q . . . . .
	<b>Lentojenik</b>	NDV-Manisa-4
NDV-Manisa-5		. . G . Q G . L . . .
NDV-Manisa-6		. . G . Q G . L . . .

Sadece velojenik suşlarda bulunan fenilalanin (F)

Sadece lentojenik suşlarda bulunan leusin (L)

İncelenen 14 NDV suşuna ait DNA dizinlerinde eklenme (insertion) veya silinme (deletion) tespit edilmedi. Farklılıkların baz düzeyinde değişimler (mutasyon) olduğu ve bu değişimlerin bazılarının aminoasit düzeyinde farklılaşmaya sebep olduğu görüldü.



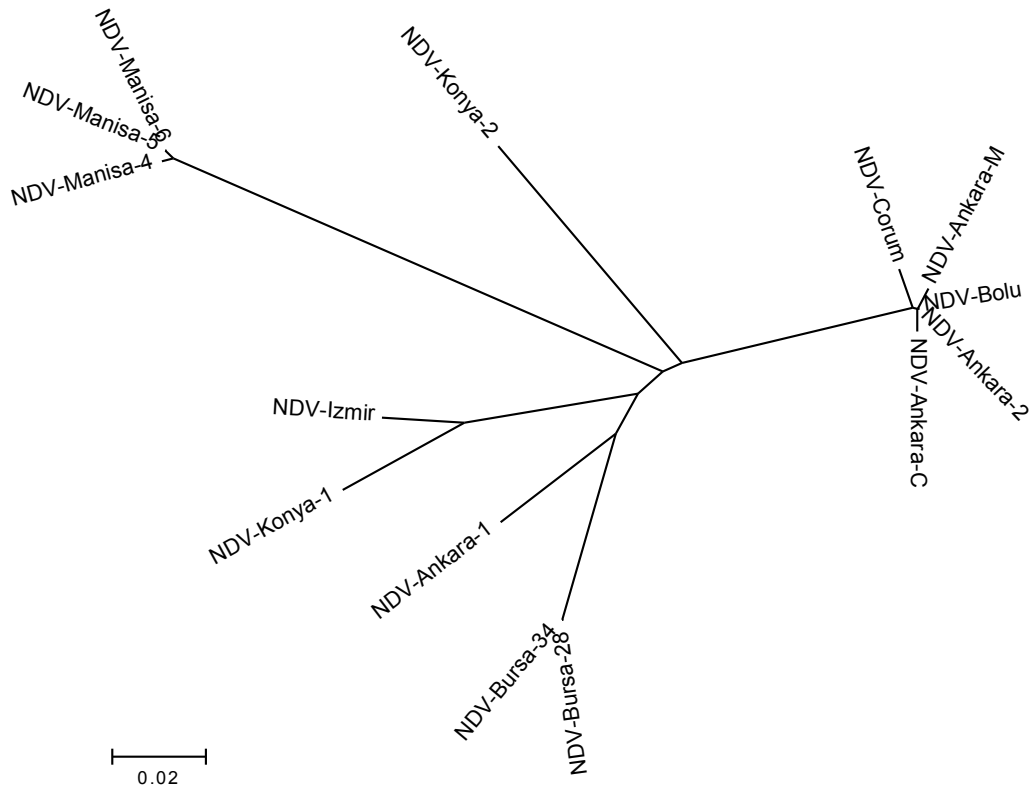
Şekil 3.5. Bu çalışmada belirlenen 400 bp uzunluğunda 14 adet DNA dizini

### 3.3. Filogenetik Analiz Sonuçları

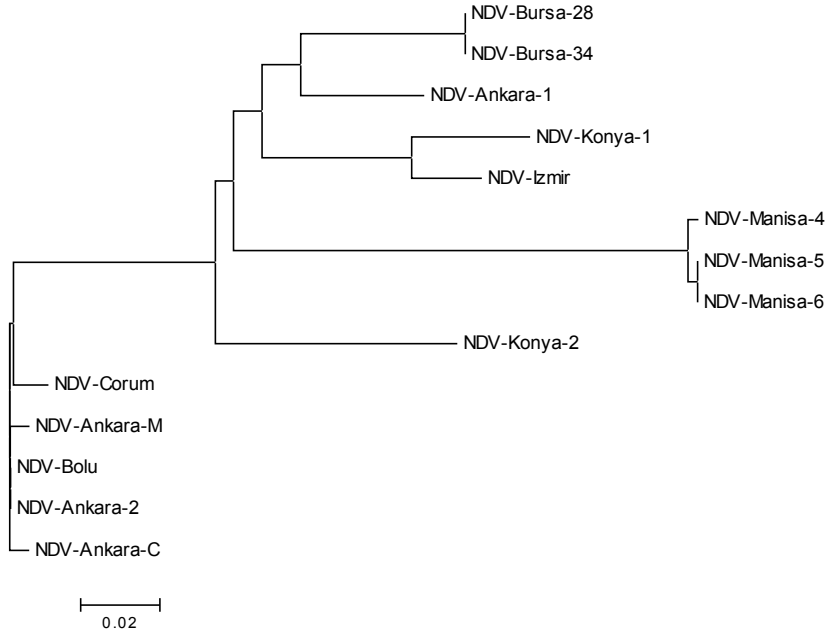
Elde edilen baz dizinleri kendi aralarında, komşu ülkelerden izole edilen örneklerle ve dünyanın çeşitli bölgelerinden izole edilen NDV suşları ile genetik yakınlık açısından neighbor joining yöntemi kullanılarak çizilen dendogramlar yardımı ile karşılaştırıldı.

Örneklerin kendi aralarında yapılan karşılaştırmalarda, yakın illerden veya aynı ilden izole edilen virusların birbirleri ile benzer genetik yapıya sahip oldukları görüldü. (Çizelge 3.1 ve 3.2).

**Çizelge 3.1. Türkiye'den izole edilen NDV suşlarının birbirlerine yakınlığını gösteren dendogram- Köksüz-Radial**



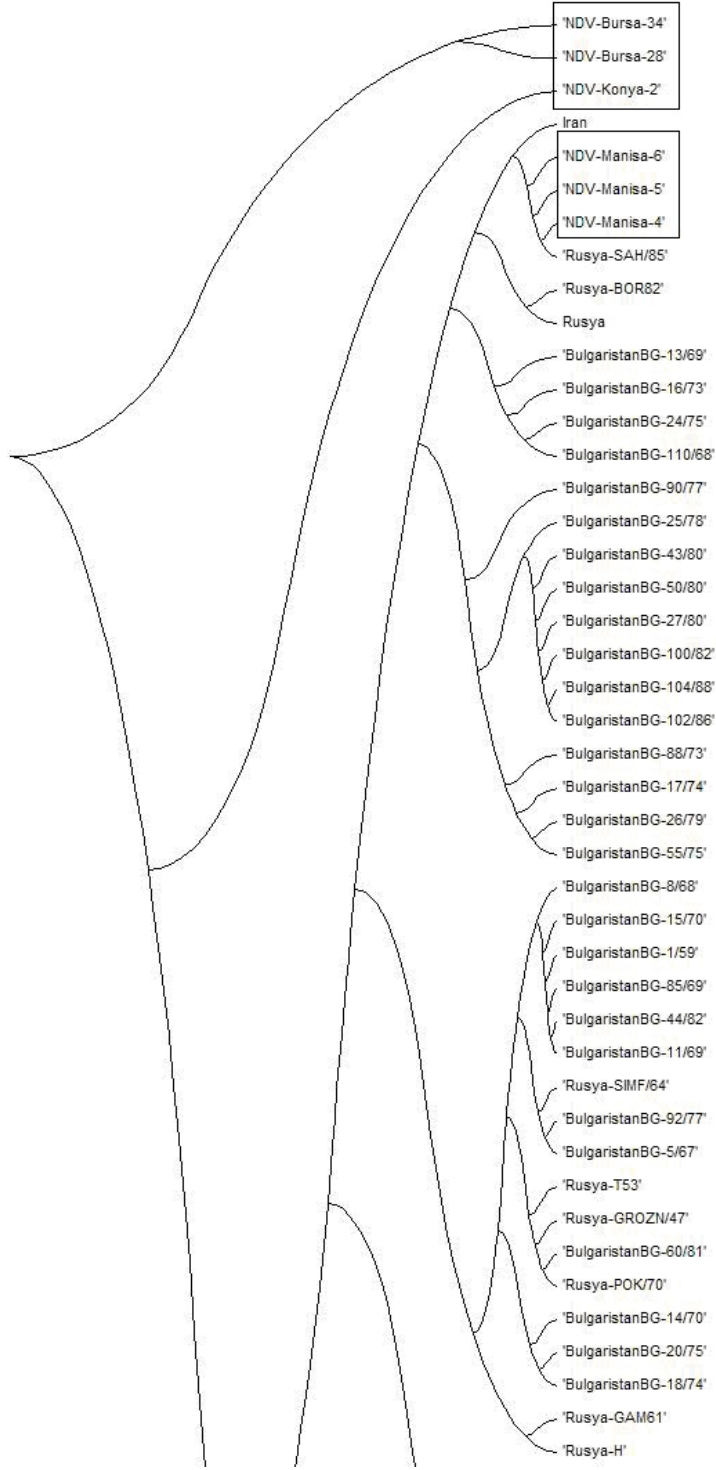
**Çizelge 3.2. Türkiye’den izole edilen NDV suşlarının birbirlerine yakınlığını gösteren dendogram- Köksüz-Rectangular**



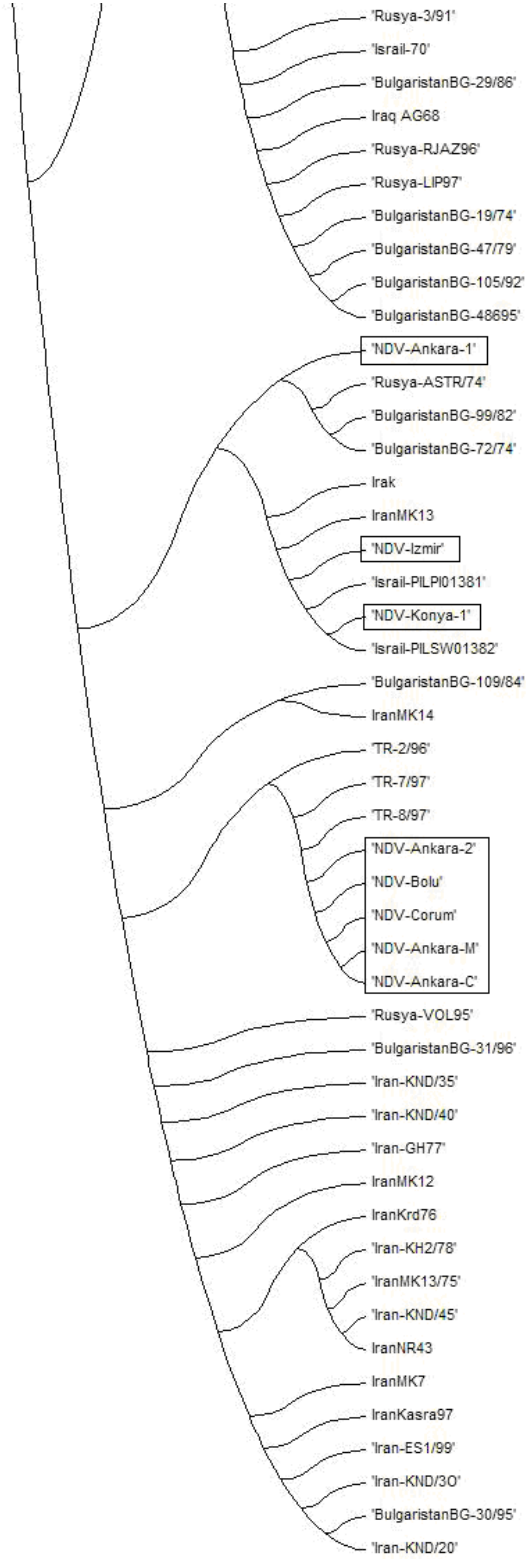
Komşu ülkelere (İran, Irak, İsrail, Bulgaristan, Rusya) ve Türkiye’den izole edilerek daha önce DNA dizinleri belirlenen üç NDV suşuna ait DNA dizinleri, ile bu çalışmada DNA dizinleri belirlenen Türkiye’ye ait NDV suşlarının karşılaştırılması sonucu, Konya’ dan izole edilen bir örneğin, İsrail’den izole edilen bir örnekle genetik bakımdan yakın olduğu görüldü (Çizelge 3.3). Bununla birlikte Yunanistan ve Suriye gibi sınır komşularımıza ait veri bulunamaması sonuçların yorumlanmasını güçleştirdi.

Türkiye’den 1996 ve 1997 yıllarında izole edilerek, DNA dizinleri Herczeg ve ark. (1999) tarafından belirlenen üç NDV suşu (TR-2/96, TR-7/97, TR-8/97) bu çalışmada Ankara ve çevresinden izole edilen suşlarla filogenetik bakımdan yakın bulundu (Çizelge 3.3). Aynı sonuçlar daha sonra çizilen kapsamlı dendogramlarda da doğrulandı (Çizelge 3.4 ve 3.6)

**Çizelge 3.3. Türkiye ve komşularından izole edilen NDV suşlarına ait cDNA dizin sonuçlarının genetik karşılaştırılması**

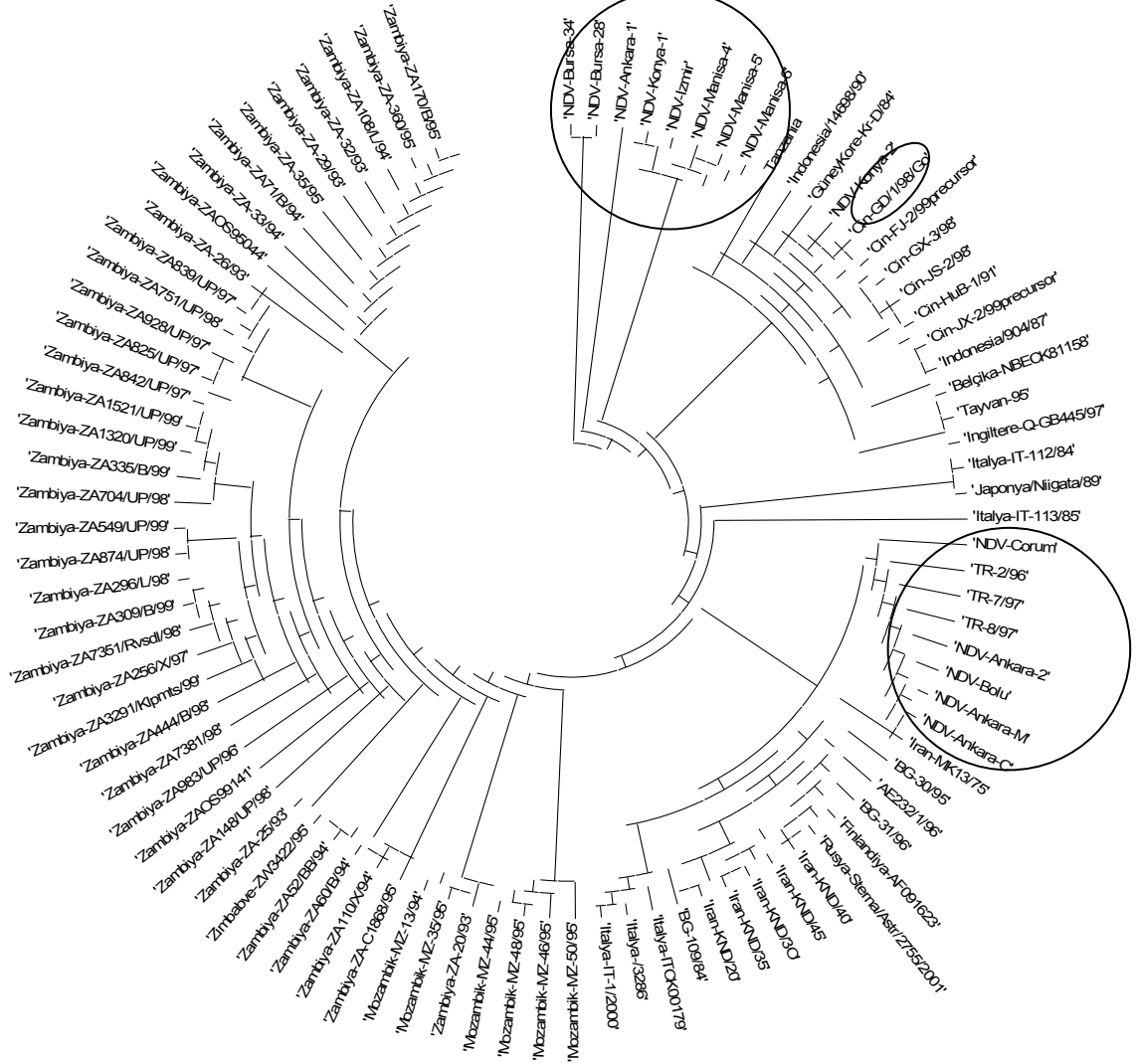


Çizelge 3.3. Devam



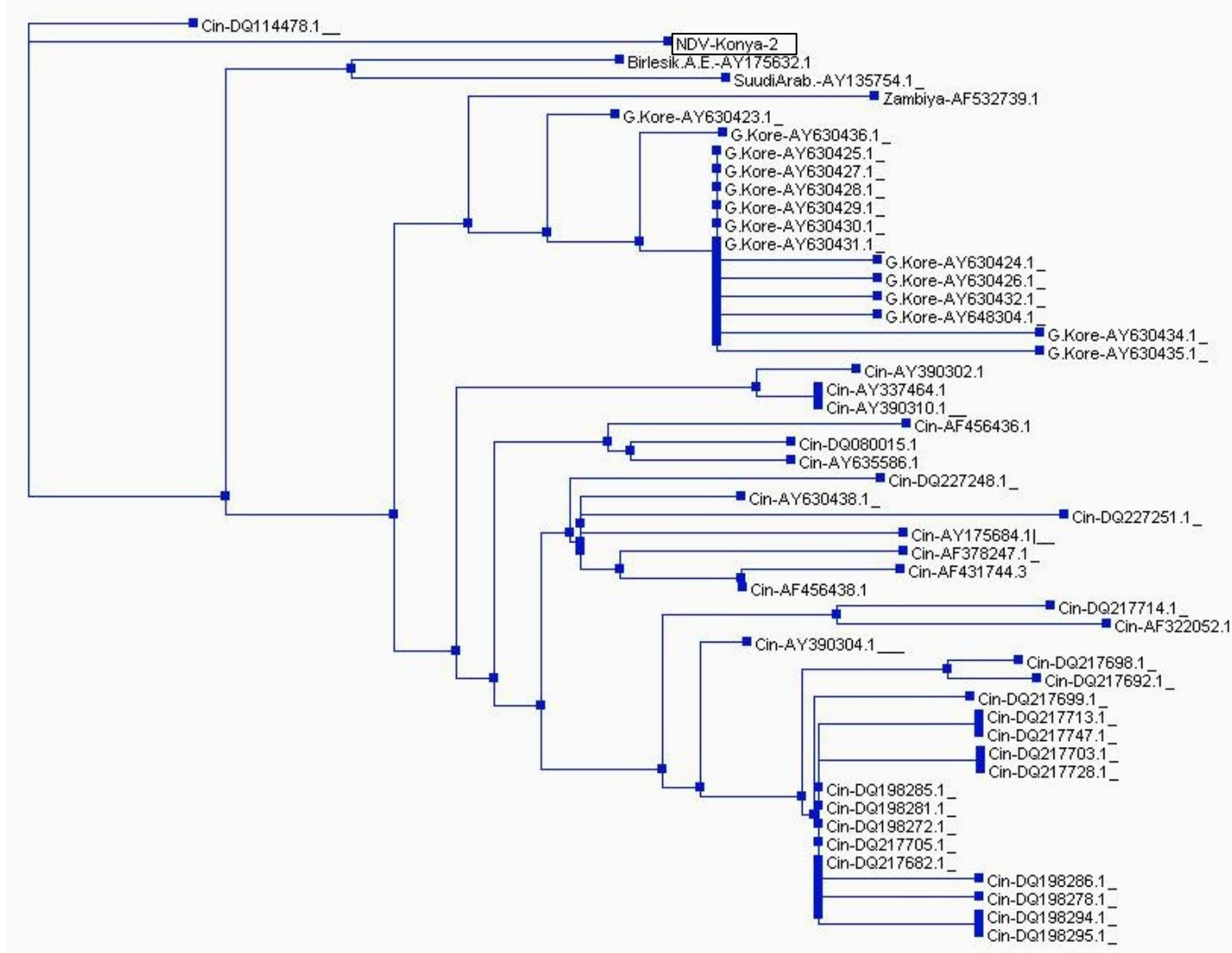
Bu çalışmada izole edilen suşların, Dünya Gen Bankası'nda bulunup, çalışmada dizinleri belirlenen suşlara, genetik yakınlığı bulunan suşlarla karşılaştırılması ile çizilen bir genetik ağaçta Konya'dan izole edilen bir suşun, Konya-2, Çin'den izole edilen bir grup suşla genetik yakınlığı tespit edildi (Çizelge 3.4).

**Çizelge 3.4. Dünya Gen Bankası'nda kayıtlı olup Türkiye'ye yakın genetik yapıya sahip olan virüslere ait DNA dizin analizi sonuçlarının genetik karşılaştırılması**



Bu sonucun doğrulanması amacı ile Gen Bankasının taranması sonucu elde edilen, ilgili suşa en yakın 50 NDV suşunu kapsayan bir başka genetik ağaç yardımı ile ilgili suşun Çin ve Güney Kore ağırlıklı bir grup içinde yer aldığı ve Çin'den izole edilen bir suşla aynı kökten gelmekle birlikte, Suudi Arabistan ve Birleşik Arap Emirliklerinden izole edilen iki NDV suşu ile genetik yakınlığının bulunduğu görüldü (Çizelge 3.5).

**Çizelge 3.5. Gen Bankası'nda kayıtlı olup, Konya'dan izole edilen 2 nolu NDV suşuna yakın genetik yapıya sahip virüslere ait DNA dizin analizi sonuçlarının genetik karşılaştırılması**





Bölüm 1.1.3’de ayrıntılı bilgi verildiği üzere, Aldous’ın (2003) tüm dünya çapında NDV suşlarının epidemiyolojik ilişkisini filogenetik yardımı ile araştırdığı moleküler çalışmasında kullandığı 328 NDV virusuna ait 375 bp’lik cDNA dizinleri, Dünya Gen Bankası’ndan temin edilerek bu çalışmada DNA dizini tespit edilen 14 NDV suşu, bu suşlara dahil edildi ve toplam 342 NDV suşunu kapsayan yeni bir genetik ağaç çizildi (Şekil 3.6 ve Çizelge 3.6). Çizilen genetik ağaç yardımı ile bu çalışmada DNA dizinleri belirlenen 14 adet NDV suşunun ait olduğu genetik gruplar tespit edildi (Tablo 3.4).

Her iki çalışma arasında, 4 adedi aynı ana grup içinde olmak üzere toplam 6 adet farklılık bulundu. Buna bağlı olarak iki çalışma arasında % 98,24 oranında korelasyon bulunduğu görüldü (Tablo 3.3).

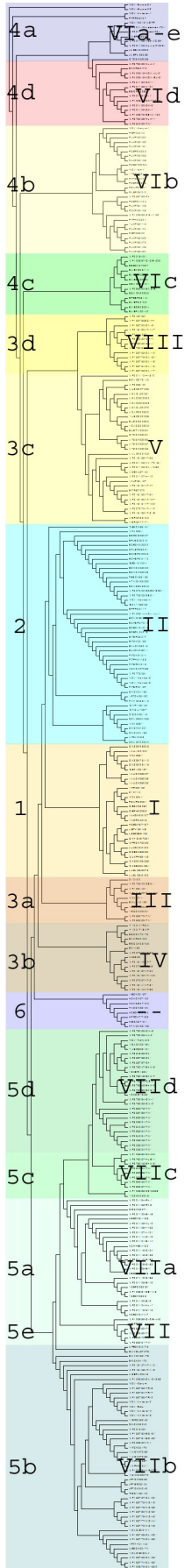
**Tablo 3.3. Aldous tarafından yapılan gruplandırma ve bu çalışmada elde edilen sonuçlar arasında farklı gruplara dahil edilen örnekler**

Örnek etiketi	Aldous (2003)	Bu çalışma	Yorum
BAEPE92085	4c	4a	Sınır bölgede
AF001112-H-310	4d	3c	Farklı gruplarda
2ESCK88161	1	2	Farklı gruplarda
Y19017-SIMF	3a	3b	-
E01438	3a	3b	-
AF001134-RI-1/88	5b	5a	Sınır bölgede

Çizelge 3.6’da kapsamlı olarak görüntülenen dendogram, Şekil 3.6’da minyatür olarak sunuldu.

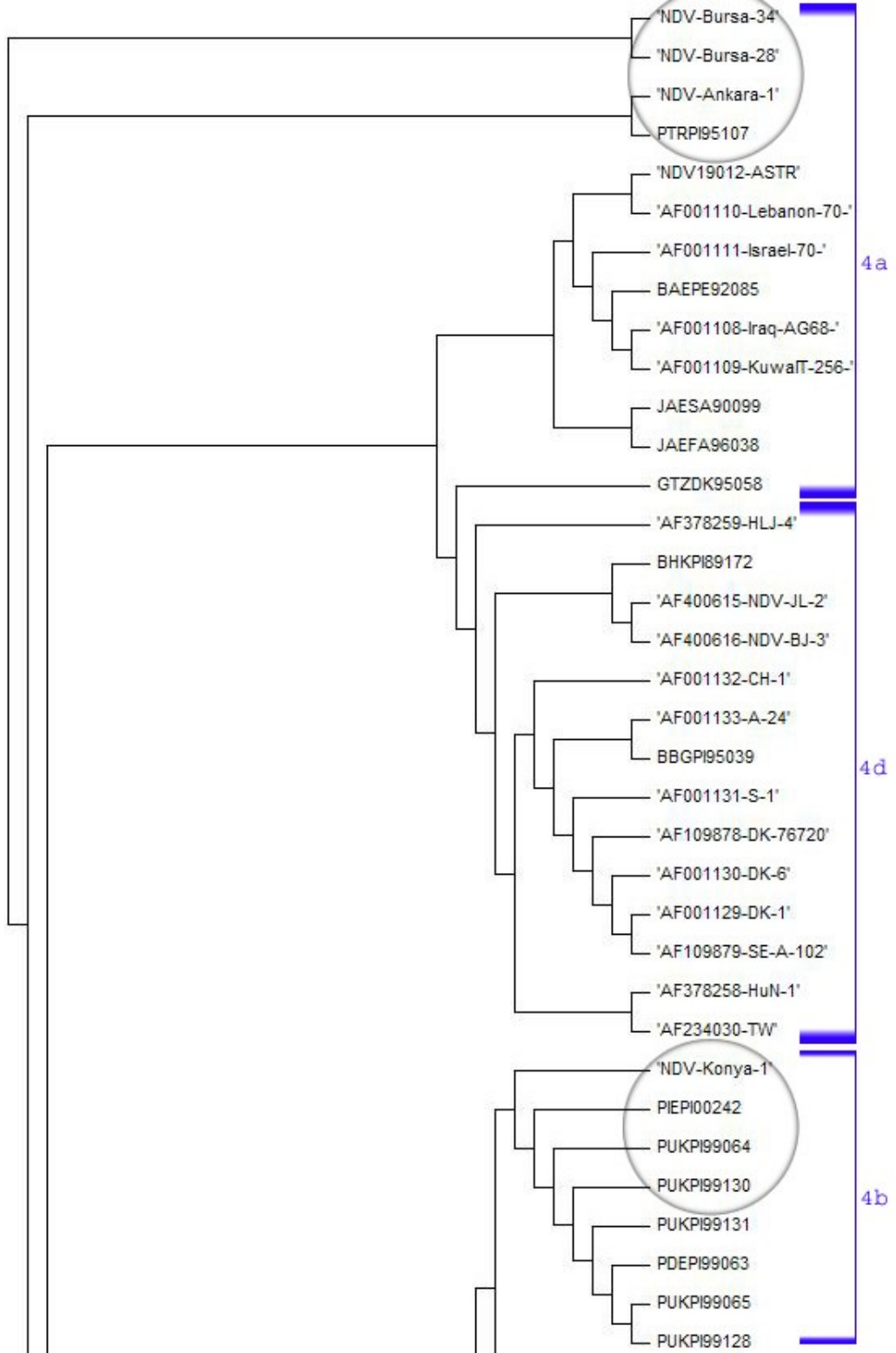
Çizelge 3.6’da; bu çalışmada DNA dizinleri belirlen NDV suşları daire içine alınarak belirtildi ve Aldous’un yaptığı çalışmada belirlediği gruplar çizelgenin sağ tarafında mavi harf ve sayılarla ifade edilerek örneklerin hangi gruba dahil oldukları görüntüledi.

Çizelge 3.6’da görüntülenen dendogramın çiziminde kullanılan 328 NDV suşuna ait kapsamlı bilgi Tablo 1.5 ve 1.6’da verildi.

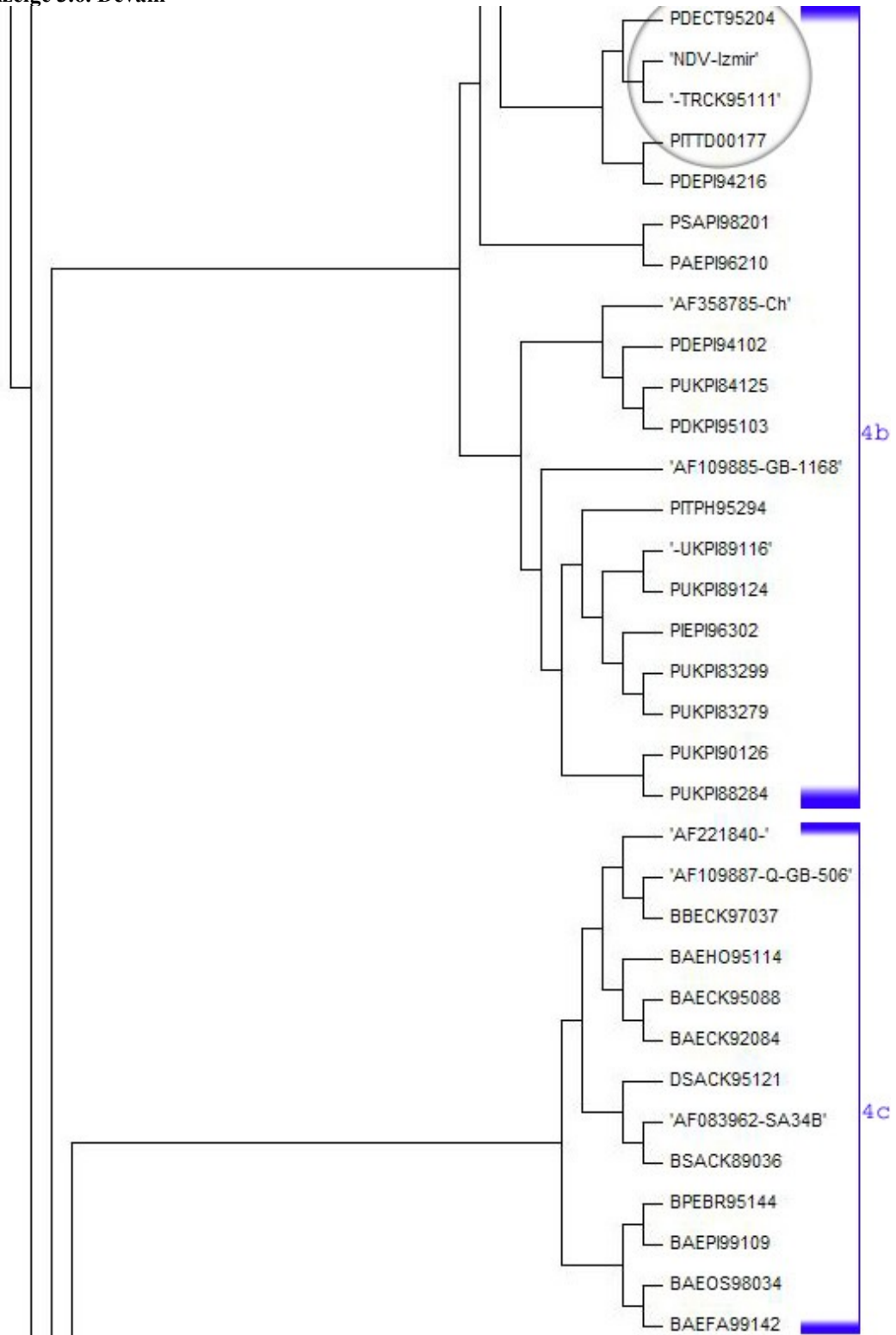


**Şekil 3.6.** Bu çalışmada DNA dizini belirlenen suşların ait olduğu genetik grubu belirlemek üzere çizilen genetik ağaç: Soldaki sayılar Aldous tarafından belirlenen genetik sınırlandırma gruplarını, sağdakiler ise daha önce MAb panelleri ile belirlenen grupları göstermektedir.

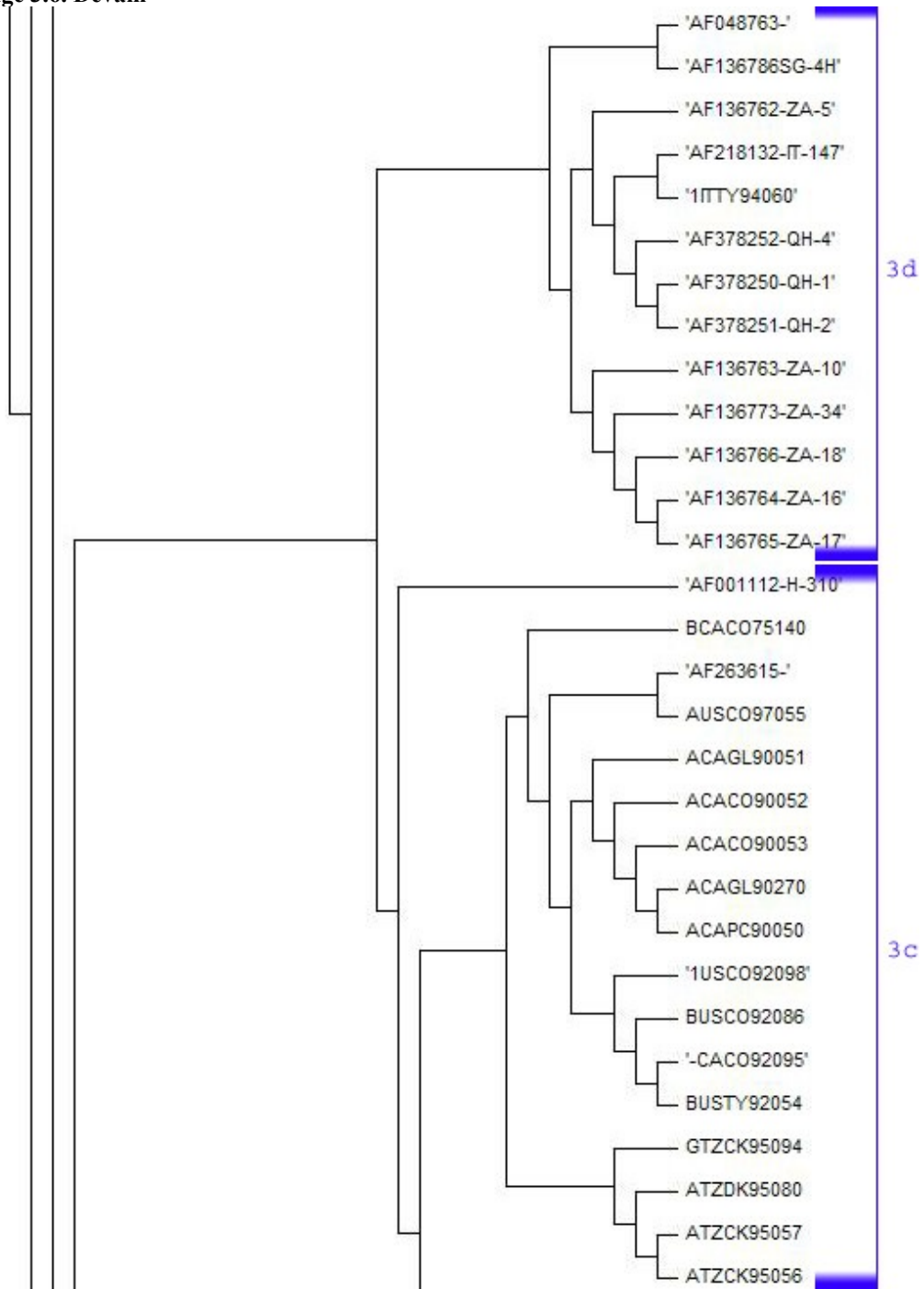
**Çizelge 3.6. Bu çalışmada DNA dizini belirlenen 14 NDV suşunun dünyanın çeşitli ülkelerinden izole edilen, 6 farklı genetik guruba mensup, 328 NDV suşu ile karşılaştırılması**



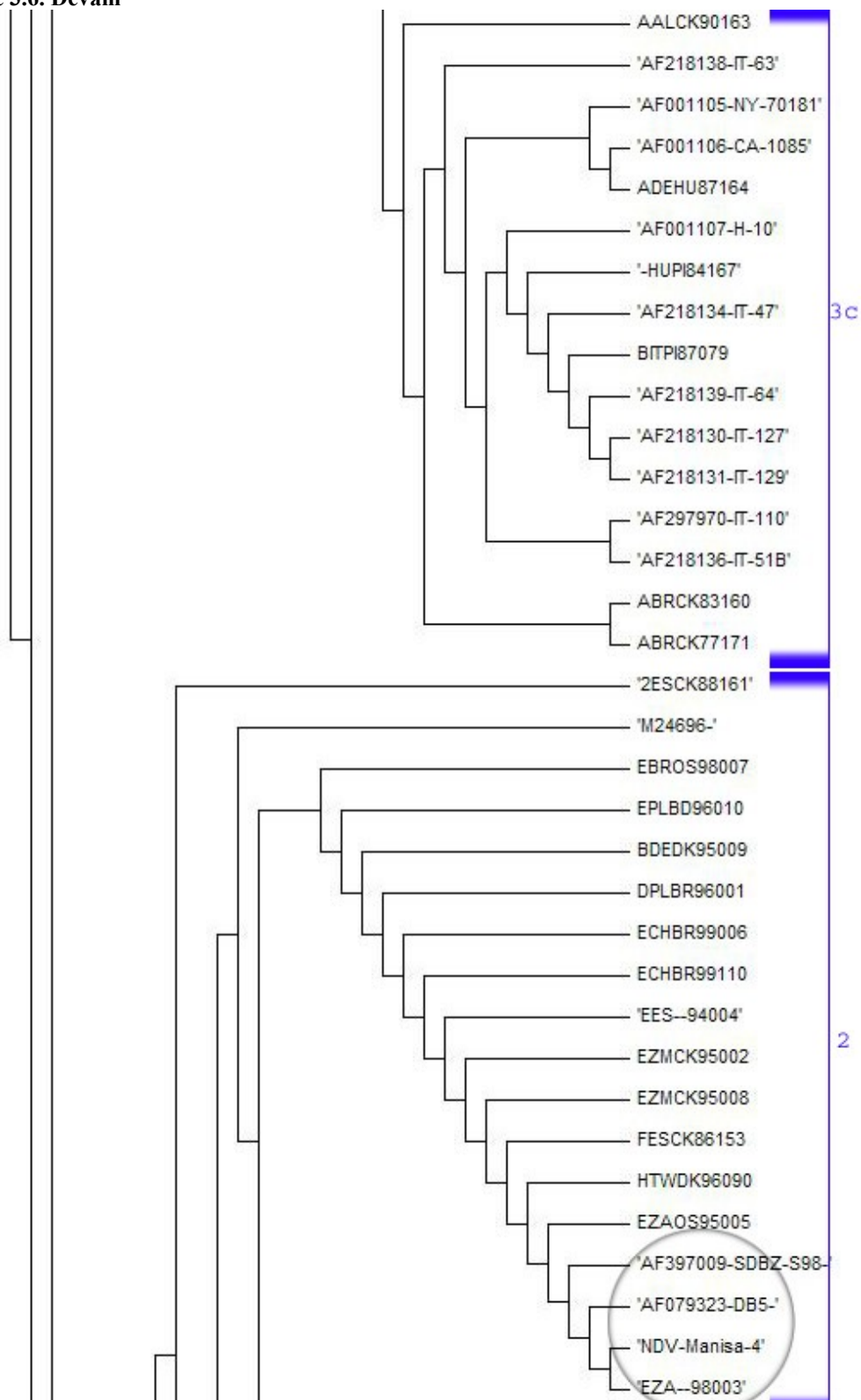
Çizelge 3.6. Devam



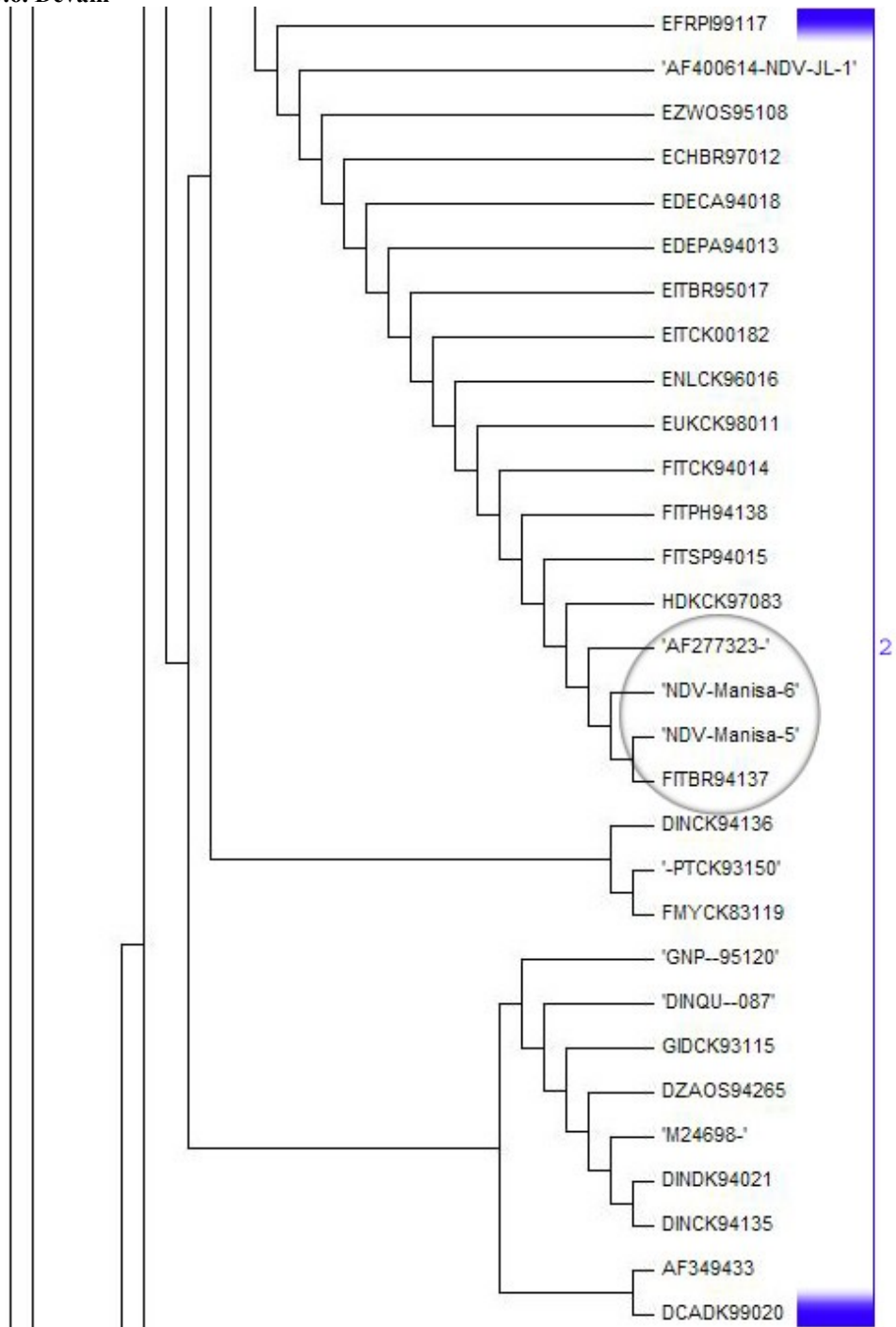
Çizelge 3.6. Devam



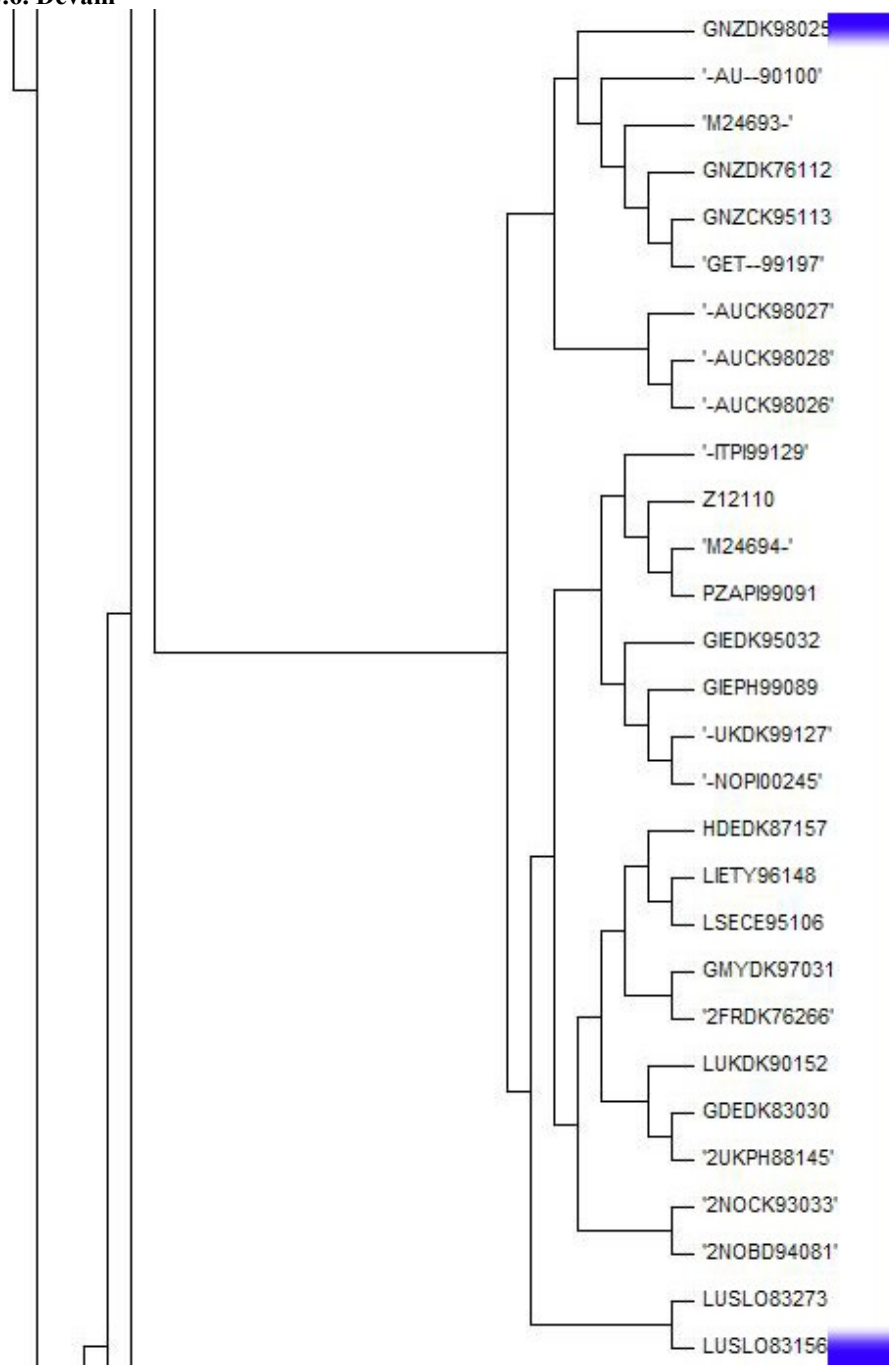
Çizelge 3.6. Devam



Çizelge 3.6. Devam

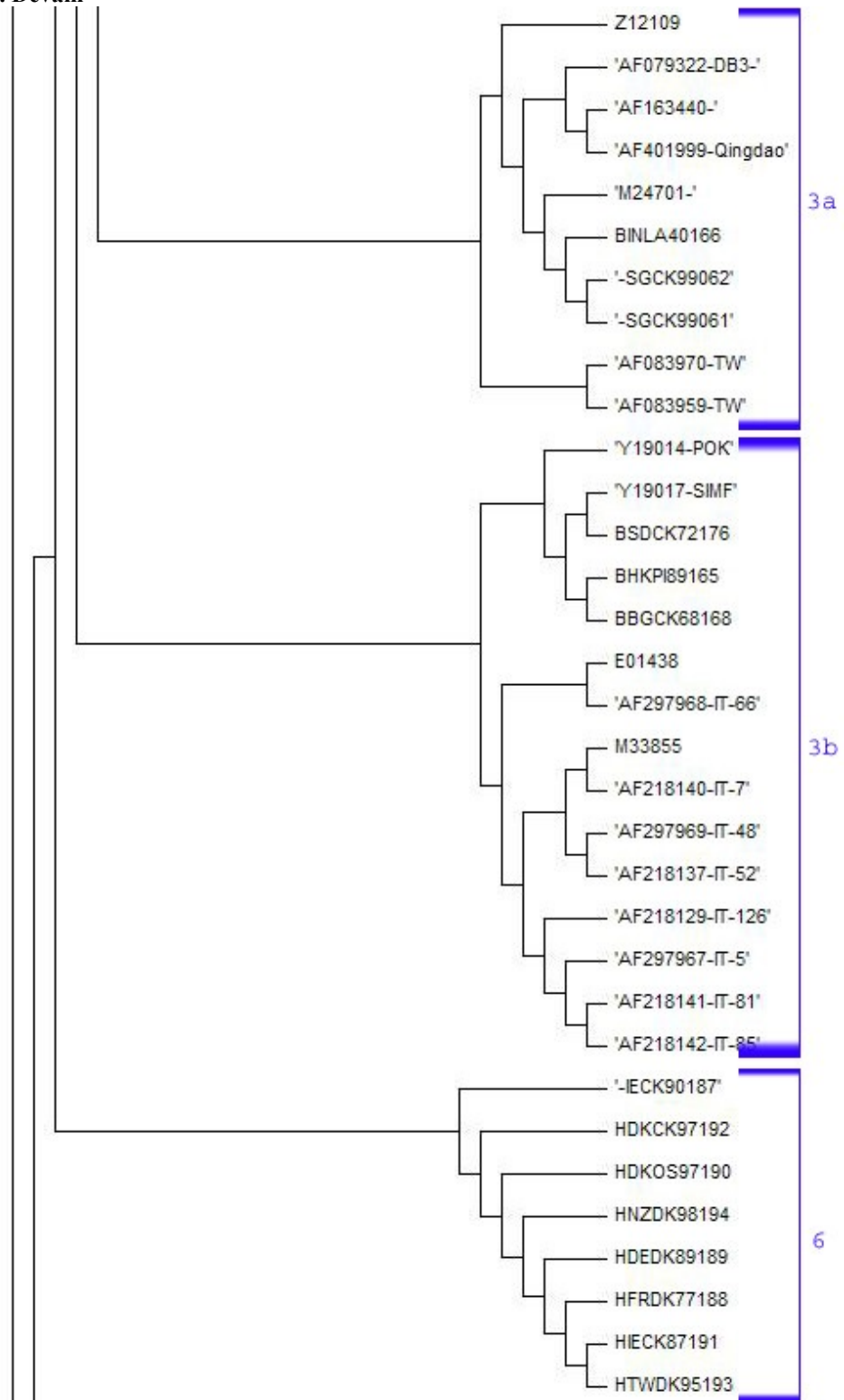


Çizelge 3.6. Devam

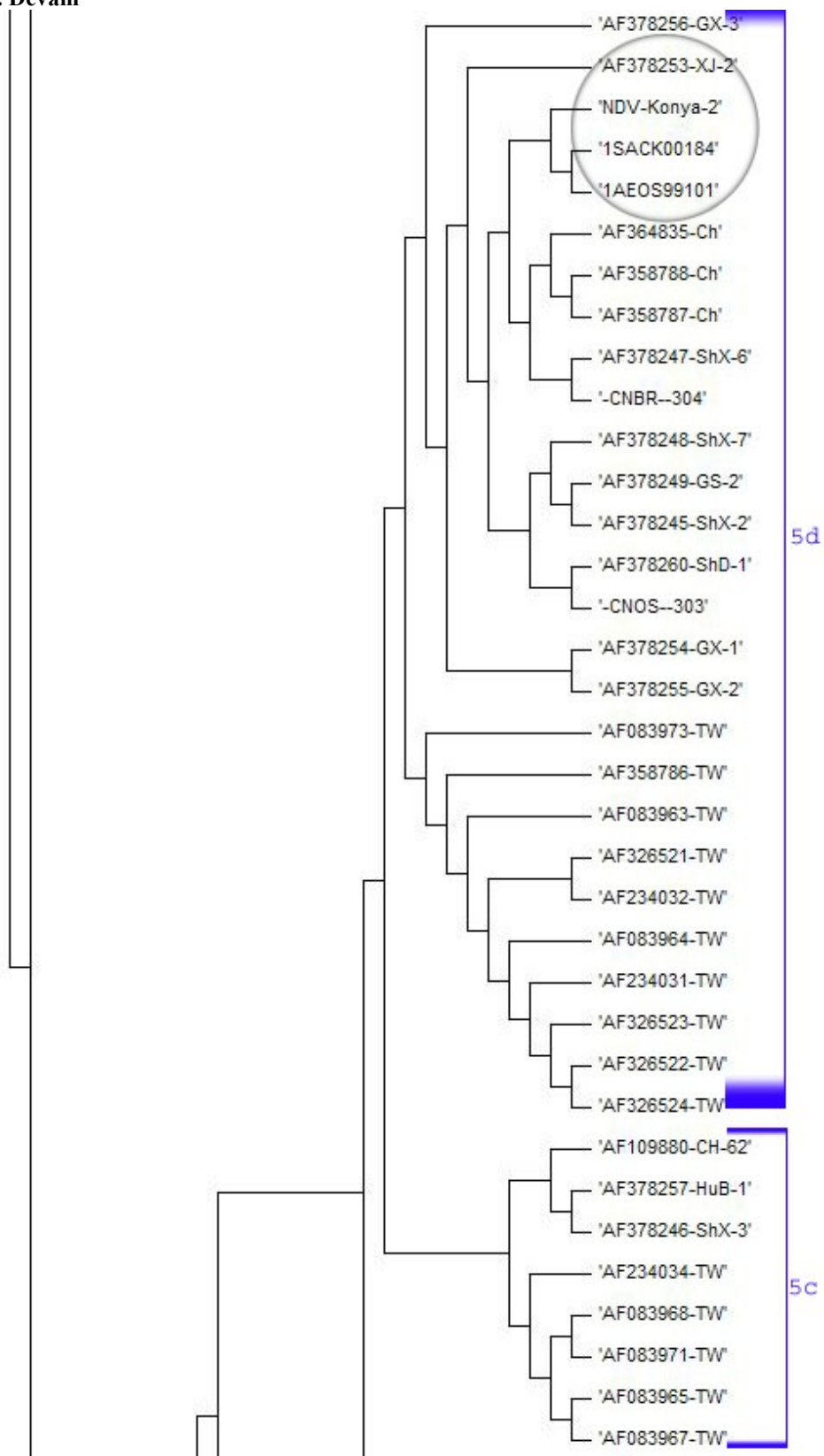




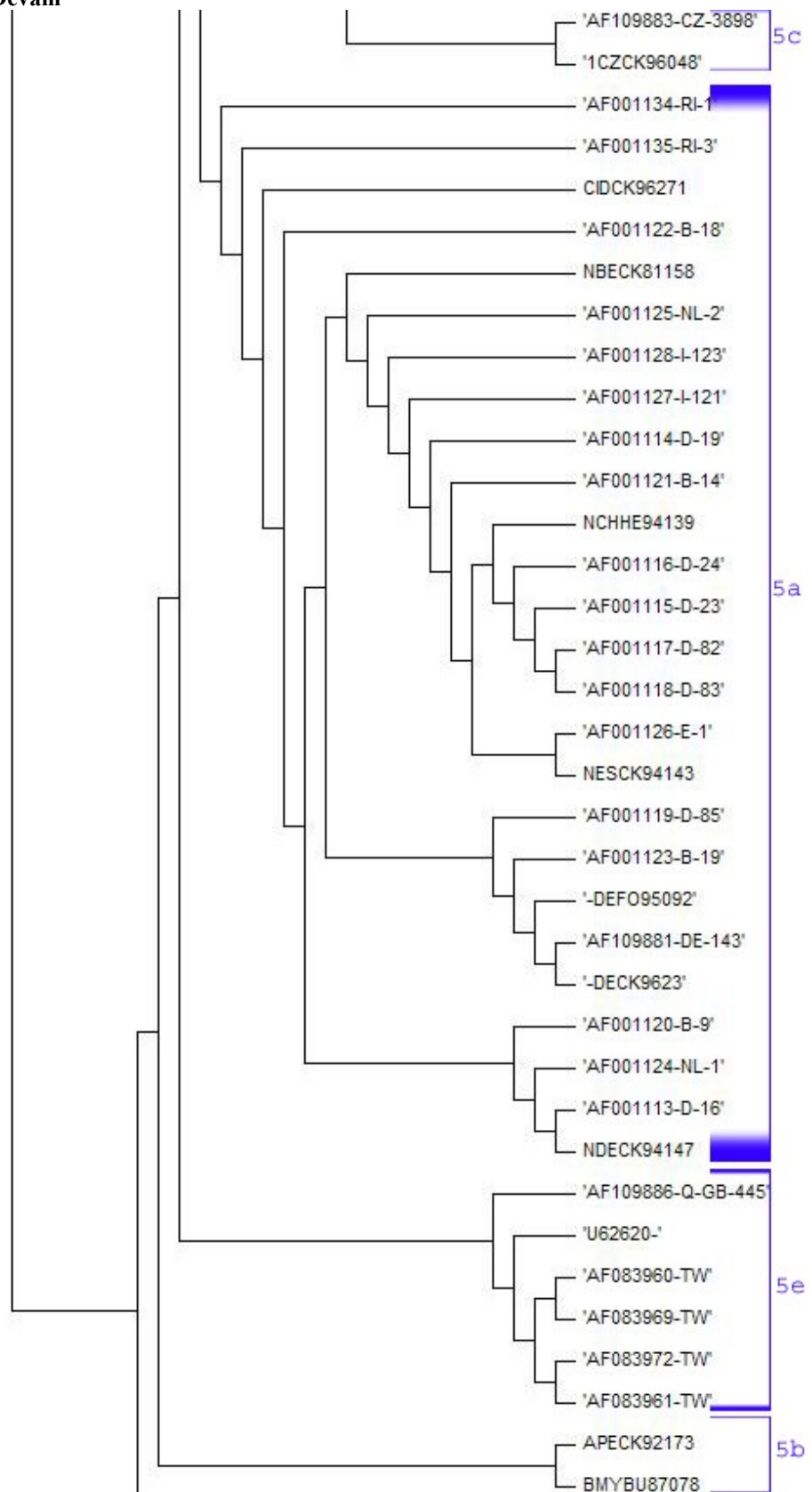
Çizelge 3.6. Devam



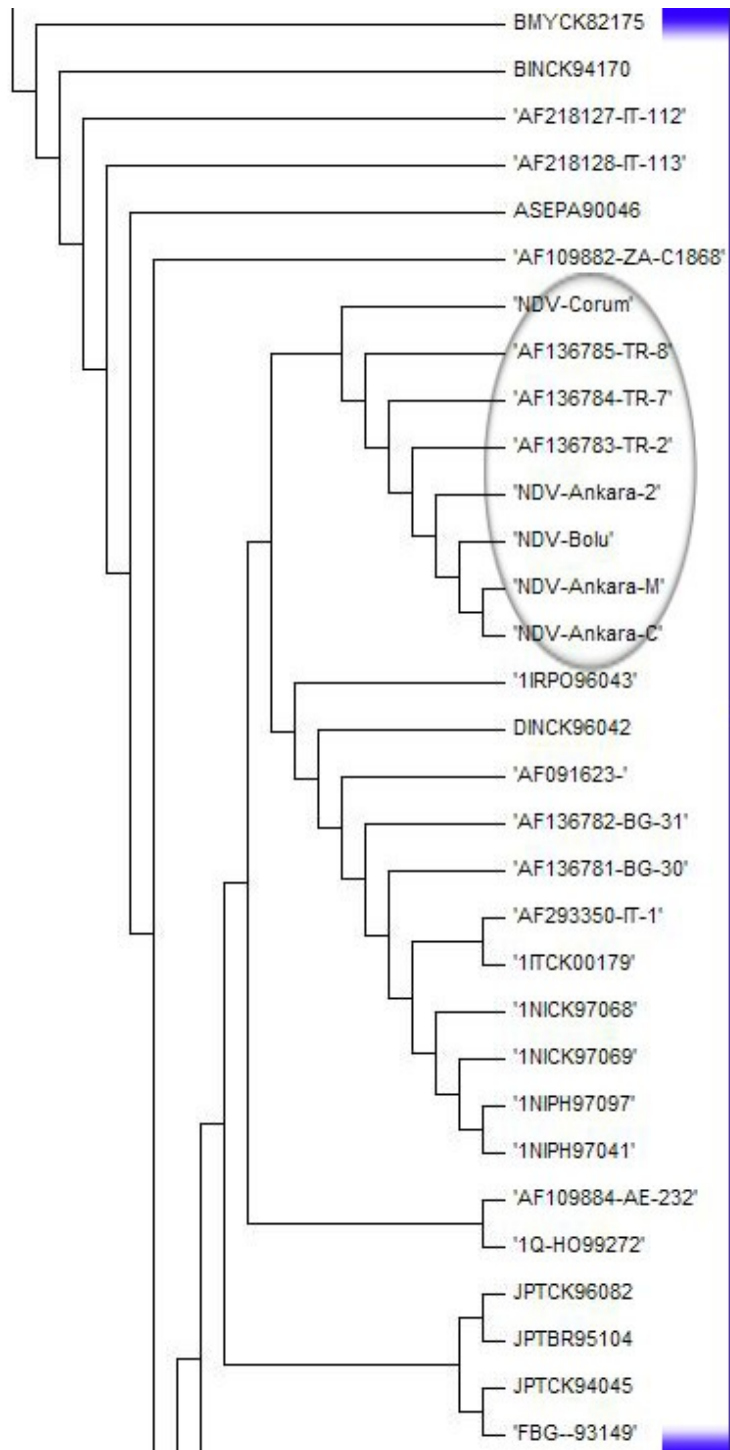
Çizelge 3.6. Devam



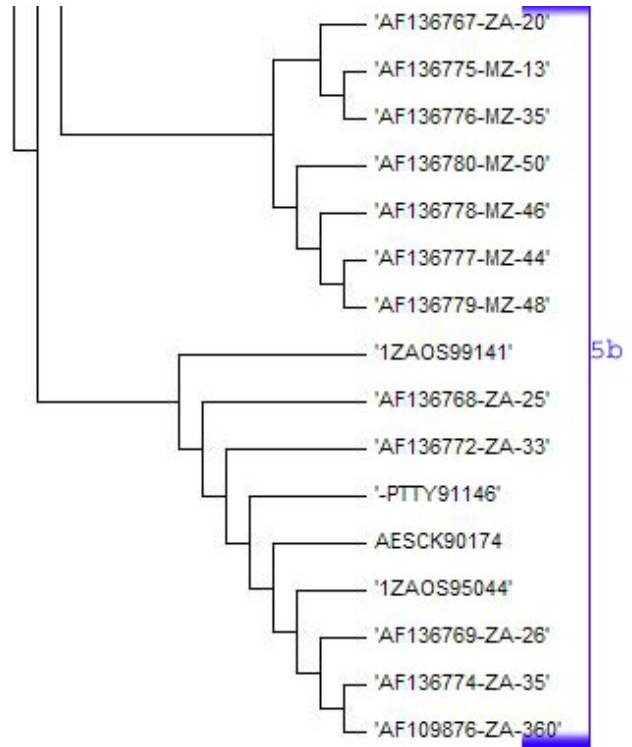
Çizelge 3.6. Devam



Çizelge 3.6. Devam



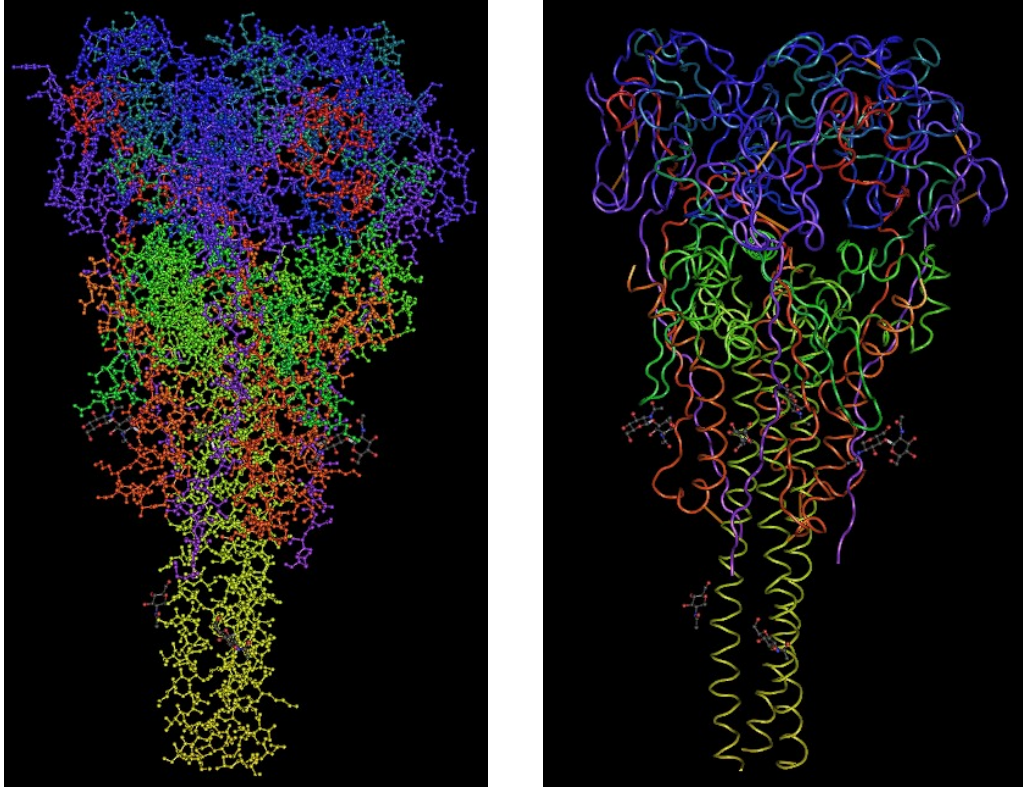
Çizelge 3.6. Devam



**Tablo 3.4. Bu çalışmada DNA dizinleri belirlenen örneklerin ait oldukları filogenetik gruplar, MAb grupları ve özellikleri**

NDV suşu	Genetik gruplandırma	MAb gruplandırması	Aldous'ın (2003) grup hakkındaki yorumu
1. Bursa 28	4a	VIa-VIe	Orta doğu kökenli ataları içermektedir. Bununla birlikte, 1995 yılında Türkiye'de bir güvercinden izole edilen bir örneği bulundurmaktadır.
2. Bursa 34			
3. Ankara-1			
4. Konya -1	4b	VIb	Grubun tüm üyeleri, Türkiye'de bir tavuktan izole edilen, atipik MAb bağlama özelliğine sahip bir örnek hariç "P" MAb grubu içindedir. Panzootik güvercin salgınlarından izole edilen örneklerden oluşan grup, 1996 öncesi İngiltere, 1998 öncesi Avrupa ve 1995 sonrası Avrupa olmak üzere üç temel gruptan oluşmaktadır.
5. İzmir-1			
6. Ankara-M	5b	VIIb	Grup; 1- 1990'ların ortalarında Avrupa'dan izole edilen örnekler 2- 1990'ların ortalarında Güney Afrika ve Mozambikten izole edilenler 3- 1993-98 arasında Portekiz ve Bulgaristan'dan izole edilen küçük bir grup 4- Asya, Amerika ve Avrupa'dan örnekleri kapsayan geniş yayımlı bir grup, olmak üzere 4 alt grup şeklinde incenebilmektedir. (Bu çalışmada 5b grubunda olduğu tespit edilen örnekler bu alt gruptan birincisine dahil edildi)
7. Ankara-C			
8. Çorum			
9. Bolu			
10. Ankara-2			
11. Konya -2	5d	VIIId	Asya'dan izole edilen örnekleri içermektedir. Grubun sahip olduğu iki alt gruptan, birincisi Tayvan izolatlarını içermekte ikincisine ait izolatlar hakkında ayrıntılı bilgi bulunmamaktadır.
12. Manisa-4	2	II	Texas GB/48 gibi virulent suşlardan, B1/47 ve La Sota gibi avirulent suşlara kadar geniş bir yelpazeyi içermektedir. Grubun geniş bir coğrafi alana yayılmış oluşu bu gruba üye olan, La Sota/47 gibi avirulent, Komarov ve Roakin gibi mezojenik aşı suşlarının tüm dünyada yaygın olarak kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.
13. Manisa-5			
14. Manisa-6			

Çalışmada tespit edilen DNA dizinlerinin daha önce Chen ve ark. (2001) tarafından hazırlanan F proteinine ait crystallografik yapı (Şekil 3.7) üzerinde konumlandırılarak incelenmesi ile örneklere ait aminoasit dizinlerinin F proteinini üzerinde hangi noktalarda farklılığa sebep olduğu görüntülendi. Bu amaçla Cn3D 4.1 programı kullanıldı.

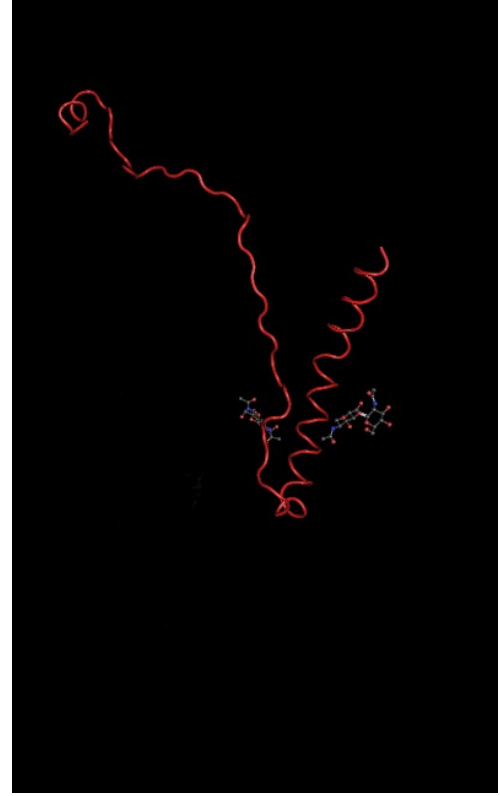


Şekil 3.7. Newcastle virusu F proteinine ait crystallografik yapı (Chen ve ark., 2001)

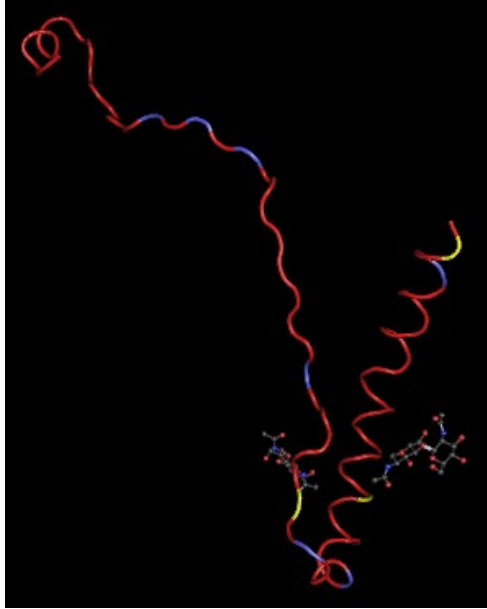
Çalışma sonucunda Şekil 3.9 ve 3.10'da görülen sonuçlar elde edildi. Kırmızı renkli bölgeler korunmuş bölgeleri, mavi ile gösterilen bölgeler; velojenik suşların kendi aralarında bulunan, sarı ile gösterilen bölgeler; velojenik ve lentojenik suşlar arasında bulunan değişken bölgeleri göstermektedir. Her bir mavi veya sarı bölge bir aminoasite karşılık gelmektedir.

Tespit edilen bu değişimlerin kaynağını teşkil eden amino asit farklılıkları Şekil 3.11'de gösterilmiştir.

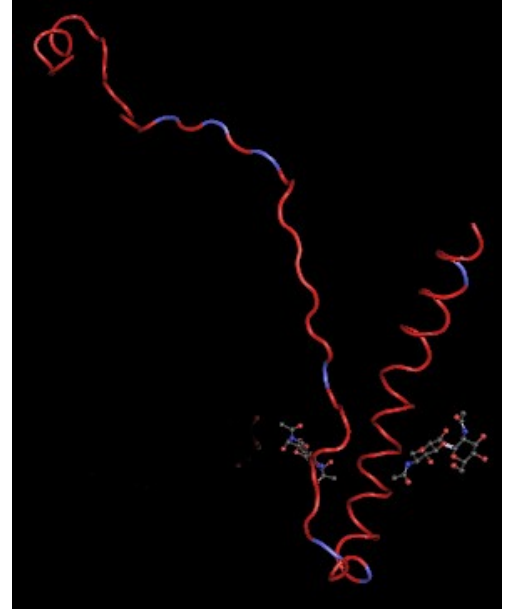
Chen ve ark. tarafından hazırlanan protein yapısında bulunmaması sebebiyle çalışmada belirlenen 130 amino asitlik dizinin, 57 adedi görüntülenmemiştir.



Şekil 3.8. Çalışmada belirlenen DNA dizininin F proteini içindeki yeri: Kırmızı ile belirtildi.



Şekil 3.9. Çalışma boyunca DNA dizinleri belirlenen velojenik ve lentojenik NDV suşları arasındaki farklılıklar



Şekil 3.10. Çalışma boyunca DNA dizinleri belirlenen velojenik NDV suşları arasındaki farklılıklar



NDV-Bursa-28 DGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTS SQTGSIIVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRKIQGS  
 NDV-Bursa-34 DGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTS SQTGSIIVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRKIQGS  
 NDV-Konya-2 DGRPLAAAGIVVTGDKAVNVYTS SQTGSIIVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRKIQGS  
 NDV-Ankara-1 DGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTS SQTGSIIVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQGS  
 NDV-Konya-1 DGRPLAAAGIVVTGDKAINIYTS SQTGSIIVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQGS  
 NDV-Ankara-M DGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTS SQTGSIIVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQGS  
 NDV-Ankara-C DGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTS SQTGSIIVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQGS  
 NDV-Corum DGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYSS SQTGSIIVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQGS  
 NDV-Bolu DGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTS SQTGSIIVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQGS  
 NDV-Ankara-2 DGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTS SQTGSIIVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQGS  
 NDV-Izmir DGRPLAAAGIVVTGDKAINIYTS SQTGSIIVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQGS  
 NDV-Manisa-4 DGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTS SQTGSIIVKLLPNLPKDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQES  
 NDV-Manisa-5 DGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTS SQTGSIIVKLLPNLPKDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQES  
 NDV-Manisa-6 DGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTS SQTGSIIVKLLPNLPKDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQES

**Şekil 3.11.** Çalışma sonucu nükleotid dizini tespit edilerek CD3d 4.1 programı yardımı ile görüntülenen örnekler için F proteini amino asit dizini: Korunmuş bölgeler kırmızı, velojenik suşlar arasında farklılıklar gösteren bölgeler mavi harflerle gösterildi. Velojenik-lentojenik suşlar arasında farklılık gösteren bölgeler sarı sütunlarla ifade edildi.

NDV-Bursa-28 DGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTS SQTGSIIVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRKIQGS  
 NDV-Bursa-34 .....  
 NDV-Konya-2 .....V.....I.....R.....  
 NDV-Ankara-1 .....R.....  
 NDV-Konya-1 .....I.....R.....  
 NDV-Ankara-M .....R.....  
 NDV-Ankara-C .....E.....R.....  
 NDV-Corum .....S.....R.....  
 NDV-Bolu .....R.....  
 NDV-Ankara-2 .....R.....  
 NDV-Izmir .....I.....R.....  
 NDV-Manisa-4 .....L.....D.....R.....E.....  
 NDV-Manisa-5 .....L.....D.....R.....E.....  
 NDV-Manisa-6 .....L.....D.....R.....E.....

**Şekil 3.1.** Çalışma sonucu nükleotid dizini tespit edilen örnekler için F proteini amino asit dizini farklılıkları (BioEdit)

#### 4. TARTIŞMA

Çalışma sonucunda; Herczeg ve ark. (1999) tarafından yapılan bir çalışma ile DNA dizinleri tespit edilen, Türkiye' ye ait NDV suşlarından TR-2/96, TR-7/97 ve TR-8/97' nin, bu çalışmada Ankara ve çevresinden izole edilen suşlara yakın genetik yapıya sahip olduğu görüldü. Bu durumun aynı yıllarda Türkiye' de görülen salgınlar esnasında dolaşan benzer genetik yapıda virus suşlarının tespitinden kaynaklanabileceği düşünüldü. Bununla birlikte çalışma boyunca değişik enstitülerden temin edilen virus suşlarına ait izolasyon yılı kaydı bulunmadığından kesin bir kanıya varılamadı.

Kronolojik ve coğrafi ilişkilerin Newcastle etkenlerinin filogenetik sınıflandırmasında önemli rol oynadığı düşüncesi genel bir kanı olmakla birlikte, bir çok filogenetik çalışmada tespit edildiği gibi (Aldous ve ark., 2003; Herczeg ve ark., 1999, Herczeg ve ark., 2001) bu çalışmada da Newcastle hastalık etkenlerinin filogenetik ilişkilendirilmelerinde coğrafi yakınlıktan başka faktörlerin de rol oynadığı görüldü. Türkiye'den izole edilen suşların İngiltere ve Çin gibi uzak ülkelerden izole edilen suşlarla yakınlığının tespit edilmesi hastalığın yayılmasında uluslar arası kanatlı ve kanatlı ürünleri ile kafes kuşları ve güvercin ticaretinin önemli yer tuttuğu fikrini (Aldous ve ark., 2003) destekler mahiyette bulundu.

Çalışmada identifiye edilen lentojenik suşların, Mast ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, tespit edilen La Sota alt tipi F genine ait bir DNA dizini ile amino asit dizini yönünden karşılaştırılması sonucu, suşların amino asit dizini yönünden tamamen aynı olduğu ancak baz düzeyinde farklılıkların bulunduğu görüldü. Bu suşların aynı zamanda La sota ile aynı filogenetik grup, 2, içinde yakın olarak bulunması sebebi ile bu suşların La sota kökenli aşı suşları olabileceği kanısına varıldı.

Aldous ve ark. ile bu çalışmada elde edilen bulgular arasında ortaya konulan %1.76'lık fark, her iki çalışmada da aynı yöntem kullanılmasına karşın, filogenetik ağaç çiziminde farklı programların kullanılması ile ilişkilendirildi.

Türkiye ve komşularına ait NDV suşlarından oluşan bir dendogramda Konya'dan izole edilen 1 no'lu suş, İsrail'den izole edilen PILPI01381 ve PILSW01382 nolu suşlarla yakın ilişkili bulunurken (Çizelge 3.3) aynı suşun dünya çapında yapılan karşılaştırmalarında İrlanda ve İngiltere'den izole edilen bir grup suşla yakınlığı tespit edildi (Çizelge 3.6). Bu durum zaman skalası bakımından incelenirse İngiltere'den 1999, İrlanda'dan 2000 ve İsrail'den 2001 yılında izole edilen suşlar göz önüne alındığında bu virusun 1999 yılında İngiltere'de güvercinlerde çıkan bir salgından İrlanda'ya ve İsrail'e bulaştığı yorumu yapılabilecektir. Türkiye'den izole edilen suşun izolasyon yılı bilinmediğinden Türkiye bu yoruma dahil edilmemiştir.

Ancak aynı suşun gen bankasında yapılan karşılaştırmalarında İngiltere ve İrlanda'dan izole edilen suşların bu suşa yakınlığı izlenirken (veri gösterilmedi) İsrail suşlarına yakınlık gözlenmedi. Bu veriler ışığında coğrafi yakınlık baz alınarak kısıtlı sayıda virus suşu ile çizilen genetik ağaçlarda gözlemlenen benzerliklerin hatalı veya eksik sonuçlar verebileceği bu sebeple virus suşlarının orjinlerinin tespitinde kapsamlı araştırmaların yapılması gerektiği kanısına varıldı.

Kwon ve ark. (2003) tarafından Kore'de ve Ke ve ark. (2001) tarafından Tayvan'da yapılan iki moleküler epidemiyolojik çalışmada; sekans dizini bu çalışmada belirlenmeyen ancak inceleme amaçlı olarak bu çalışmaya dahil edilen iki Türkiye izolatu, TR-7/97, TR-8/97, Bulgaristan'dan izole edilen 31/96 referens no'lu suşla benzer genetik yapıya sahip bulunmuştur. Bu çalışmada da Bulgaristandan izole edilen 31/96 nolu suşun, Ankara ve çevresinden izole edilen bir grup suş ile yakın genetik yapıya sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 3.3, 3.4 ve 3.6).

Öncel ve ark. (1997) tarafından, Marmara Bölgesi'nden izole edilen bir grup NDV suşu üzerinde MAb panelleri yardımı ile yapılan bir karakterizasyon çalışmasında örneklerin Portekiz'den izole edilen NDV suşları ile benzer olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada DNA dizinleri belirlenerek 5b grubu altında incelen örneklerin Portekiz'den izole edilen bir grup NDV suşu ile aynı grup içinde olduğu görülmektedir. Ancak Ankara ve çevresinden izole edilen bu örnekler, Aldous ve ark.'ın (2003) 5b grubu içinde yaptığı alt sınıflandırmada "1990 ortalarında Avrupa'dan izole edilen örnekler" grubuna girmekte ve "Portekiz ve Bulgaristan'dan izole edilen küçük bir grup" olarak adlandırılan sınıfın dışında kalmaktadır. Bu

suşların İtalya, Kuzey İrlanda ve Bulgaristan gibi Avrupa ülkelerine yakınlığının Portekiz'e olan yakınlıktan daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum, MAb panelleri ile yapılan sınıflandırmanın yakın genetik yapıya sahip bireylerin ayırımında yetersiz kaldığı savını destekler mahiyette bulunmuştur. Bununla birlikte test edilen suşların farklı olması sebebiyle kesin bir kanıya varılamamıştır.

Wehmann ve ark. (2003) tarafından yapılan moleküler epidemiyolojik bir çalışmada; 1979-2002 yılları arasında Bosna-Hersek, Sırbistan, Yugoslavya ve Slovenya'dan izole edilen 68 NDV suşunun tamamının V nolu genetik gruba ait alt gruplara dahil olduğu görülmüştür. Türkiye'den izole edilen 14 NDV suşu üzerinde yapılan bu çalışmada izolatların VIa-VIe, VIb, VIIb, VIIId ve II no'lu genetik gruplara dahil oluşu ve bu grupların, uzak doğudan, orta doğu ve Avrupa'ya kadar geniş bir yelpazeyi içermesi, bilimsel açıdan Türkiye'nin antijenik varyasyon yönünden zenginliğini göstermekte ve bu virusların ilgili kaynaklardan değişik yollarla Türkiye'ye girebileceğini de ortaya koymaktadır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma sonucunda, DNA dizinleri belirlenen NDV suşları üzerinde yapılan filogenetik çalışmalarda ülkemizden izole edilen virusların Tablo 3.4.'de bildirilen genetik gruplara üye oldukları tespit edildi. Etkenlerin farklı kıtalardan izole edilen virus suşları ile genetik yakınlığının tespiti, uluslar arası kanatlı ve ürünleri ticareti ile ilişkilendirildi.

Cn3D programı yardımı ile elde edilen görüntülerde farklılıkların proteine ait sekonder yapılar da olduğu dikkat çekici bulundu (veri gösterilmedi). Aynı program yardımı ile proteine ait ikincil yapıların yanında, hidrophobicity ve sıcaklık gibi değerler de görüntülenebilmektedir. Çalışmada tespit edilen F proteinine ait amino asit dizini, protein içinde kısa bir zincir olması sebebiyle virus suşları arasında tespit edilen amino asit farklılıklarının hidrophobicity ve sıcaklık ile ilişkileri incelenemedi. Farklı NDV suşlarına ait F proteini amino asit dizinlerinin tamamının tespit edilmesi ve var olan farklılaşmaların hidrophobicity, sıcaklık ve üç boyutlu konum yönünden incelenmesi yeni bilimsel verilerin eldesi açısından yararlı olabilecektir.

Filogenetik ağaç çiziminde yaygın olarak kullanılmakta olan Phylip programı güvenilir olmakla birlikte kullanımının zor olması sebebi ile, DNA dizinlerinin karşılaştırılması ve filogenetik ağaçların çiziminde, temelde Phylip programını kullanan ancak kolay bir arayüz ile kullanıcıya hızlı ve güvenilir sonuçlar verebilen neighbor treemaker ve bioedit gibi programların kullanılmasının yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma ve diğer filogenetik çalışmalar sonucu uzak ülkeler arasında tespit edilen filogenetik ilişkiler, ülkeler arası kanatlı ve ürünlerinin ithalat ve ihracatında yapılacak laboratuvar kontrollerinin önemini vurgular mahiyette bulunmuştur. Çalışmada kendisine yakınlık tespit edilen Çin orjinli suşların kaz izolatları oluşu, hastalık etkenini vücutlarında barındırmakla birlikte klinik belirti göstermeyen su kuşlarının gerek göçleri gerekse ithalat ve ihracatları esnasında Newcastle

hastalığınının bulaşmasında diğerk kuşlara nazaran daha önemli olduklarını ve bunlar üzerinde yapılacak kontrollerin önemini vurgulamaktadır.

## ÖZET

### **Kanatlı Hayvanlarda Newcastle Hastalığı Viruslarının Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ile Teşhisi ve Moleküler Karakterizasyonu:**

Bu çalışmada; sahadan izole edilerek embriyolu tavuk yumurtalarında üretilen ve konvansiyonel yöntemlerle teşhis edilmiş ancak tiplendirilmemiş olan Newcastle disease virus (NDV) suşlarının RT-PCR ile teşhisi ve genetik yapılarının DNA Sequencing yardımı tespit edilmesi böylelikle bu suşların patojen-velojenik ya da apatojen-lentojenik olup olmadığının anlaşılması, Dünya Gen Bankası'na Türkiye'de bulunan suşların genetik yapısı hakkında yeni verilerin eklenmesi, bunun yanında elde edilen sonuçların dünyanın çeşitli bölgelerinden daha önce izole edilerek DNA dizinleri tespit edilen diğer NDV virusları ile karşılaştırılarak olası bulaşma kaynaklarının tespit edilmesi amaçlandı.

Çalışmada; daha önce Türkiye'den izole edilen 14 adet NDV suşuna ait 400 bp'lik DNA dizinleri tespit edildi, farklı illerden elde edilen bu suşlardan 11 adedinin velojenik, 3 adedinin lentojenik olduğu görüldü. İlgili dizinlerin Aldous ve ark. (2003) tarafından "NDV viruslarının moleküler karakterizasyonu" üzerinde yapılan dünya çapındaki bir araştırmada kullanılan NDV virusları ile karşılaştırılması sonucu Türkiye'den izole edilen bu suşların Aldous'un yaptığı genetik gruplandırma; 4a (VIa-VIe), 4b (VIb), 5b (VIIb), 5d (VIId) ve 2 (II) gruplarına dahil edildiği tespit edildi.

Genetik yapıda oluşan mutasyonların aminoasit düzeyinde sebep olduğu farklılaşmalar ve bunların füzyon proteininin üç boyutlu yapısı üzerindeki yerleri Cn 3D 4.1 Programı yardımı ile görüntülendi.

Anahtar kelimeler: Newcastle Hastalığı Virusunu, NDV, RT-PCR, DNA dizin analizi, filogenetik, moleküler çalışma.

## SUMMARY

**Diagnosis of Newcastle Disease Viruses Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Molecular Characterisation:** In this study; differential diagnose of the Newcastle disease virus (NDV) patotypes using RT-PCR and partial Fusion (F) gene cDNA sequences of the isolated field viruses were aimed in order to add new information about Turkey's NDV types' genotypic structures into the World Gene Bank.

Moreover, revealing of the possible original source of the virus via comparative phylogenetic analysis between Turkey's NDV strains and NDV isolates from other countries was another purpose of this study.

At the end of the study; 400 bp long, 14 partial cDNAs were recovered and found out that 11 of them were pathogen/velogenic and 3 of them were non-pathogen/lentogenic. Comparing the obtained partial cDNAs with the NDV strains, used in the study of Aldous et al. (2003) which is about “Worldwide molecular epidemiological analysis of variant ND viruses” it is revealed that Turkey’s NDV strains are in the group 4a (VIa-VIe), 4b (VIb), 5b (VIIb), 5d (VIIId) and 2 (II).

Using an artificial crystallographic protein structure program, Cn3D 4.1, mutations in the virus's fusion (F) protein is displayed in 3 dimensional structure.

Key words: Newcastle Disease Virus, NDV, RT- PCR, nucleotide sequence analyze, DNA sequencing, phylogenetic, molecular study.



## KAYNAKLAR

1. ALDOUS, E.W., ALEXANDER, D.J. (2001). Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathology*, **30**: 117-128.
2. ALDOUS, E.W., MYNN, J.K., BANKS, J., ALEXANDER, D.J. (2003). A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathology*, **32**: 239-257.
3. ALEXANDER, D.J. (1990). Avian Paramyxoviridae-recent developments. *Vet. Microbiol.*, **23**: 103-114.
4. ALEXANDER, D.J. (1993). Paramyxovirus Infection. In: *Virus Infection of Birds*. Ed.: McFerran J.B. ve McNulty M.S., Netherlands: Elsevier Science Publisher, p.: 321-340.
5. ALEXANDER, D.J., MANVELL, R.J., LOWINGS, P., FROST, K.M., COLLINS, M.S., RUSSELL, P. & SMITH, J. (1997). Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. *Avian Path.*, **26**, 399-418.
6. AMBERG, D. (2001). Colony PCR. Erişim: [[http://www.upstate.edu/biochem/amberg/protocols/colony\\_pcr.html](http://www.upstate.edu/biochem/amberg/protocols/colony_pcr.html)]. Erişim tarihi: 20.09.2005.
7. ANONİM. (2003). Polymerase Chain Reaction (PCR) Course Book. Pirbright Institute of Animal Health (IAH). Londra/İngiltere.
8. ANONİM. (2005a). Chain termination method. Erişim: [[http://en.wikipedia.org/wiki/Sanger\\_sequence](http://en.wikipedia.org/wiki/Sanger_sequence)]. Erişim tarihi: 12.10.2005
9. ANONİM. (2005b). Dye terminator sequencing. Erişim: [[http://en.wikipedia.org/wiki/Sequencing#DNA\\_sequencing](http://en.wikipedia.org/wiki/Sequencing#DNA_sequencing)]. Erişim tarihi: 12.10.2005.
10. AYDIN, N. (2002). Newcastle Hastalığı (Yalancı Veba). *Kanatlı Hastalıkları*. Ed: İzgür, M., Akan, M. Ankara: Medisan Yayın Evi, s.: 135-147.
11. BERRES, M.E. (2002). An introduction to AFLP and fAFLP Erişim: [[http://ravel.zoology.wisc.edu/sgaap/AFLP\\_html/fAFLP\\_Introduction.htm](http://ravel.zoology.wisc.edu/sgaap/AFLP_html/fAFLP_Introduction.htm)] Erişim tarihi: 20.09.2005.
12. BITZER, M., LAUER, U., BAUMANN, C., SPIEGEL, M., GREGOR, M., NEUBERT, W. J. (1997). Sendai virus efficiently infects cells via the asialoglycoprotein receptor and requires the presence of cleaved F0 precursor proteins for this alternative route of cell entry. *J. Virol.*, **71**: 5481-5486.
13. BOWMAN, M.C., SMALLWOOD, S., MOYER, S.A. (1999). Dissection of individual functions of the sendai virus phosphoprotein in transcription. *J. Virol.*, **73**: 6474-6483.
14. BU, Z., GE, J., HU, S., WEN, Z. (2005). NDV Lasota complete genom. Erişim: [[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/seq.cgi?db=nucleotidevedopt=graphveextrafeat=16veid=61621428veout=onve\\_from=1ve\\_to=15186ve\\_sfrom=6593ve\\_gene=ve\\_bCDS=onve\\_bSEQ=on](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/seq.cgi?db=nucleotidevedopt=graphveextrafeat=16veid=61621428veout=onve_from=1ve_to=15186ve_sfrom=6593ve_gene=ve_bCDS=onve_bSEQ=on)]. Erişim tarihi: 09.06.2005.

15. BUCHHOLZ, C.J., SPEHNER, D., DRILLIEN, R., NEUBERT, W.J., HOMANN, H.E. (1993). The conserved n-terminal region of Sendai virus nucleocapsid protein np is required for nucleocapsid assembly. *J. Virol.*, **67**: 5803-5812.
16. BUCHHOLZ, C.J., RETZLER, C., HOMANN, H.E., NEUBERT, W.J. (1994). The carboxy-terminal domain of Sendai Virus nucleocapsid protein is involved in complex formation between phosphoprotein and nucleocapsid-like particles. *Virology*, **204**: 770-776.
17. CHAMBERS, P., PRINGLE, C.R., EASTON, A.J. (1992). Sequence analysis of the gene encoding the fusion glycoprotein of pneumonia virus of mice suggests possible conserved secondary structure elements in paramyxovirus fusion glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **73**: 1717-1724.
18. CHANOCK, R.M., MURPHY, B.R., COLLINS, P.L. (2001). Parainfluenza Viruses. In: *Fields Virology, 4. baskı*. Ed: Knipe, D.M., Howley, P.M. USA: Lippincott Williams & Wilkins Press, p.: 1341-1379.
19. CHAVES, R.L., GRAFF, J., NORMANN, A., FLEHMIG, B. (1994). Specific detection of minus strand hepatitis A virus RNA by Tail-PCR following reverse transcription. *N.Acids Res.*, **22**: 1919-1920.
20. CHEN, L., GORMAN, J.J., MCKİMM-BRESCHKIN, J., LAWRENCE, L.J., TULLOCH, P.A., SMITH, B.J., COLMAN, P.M., LAWRENCE, M.C. (2001). Structure of the Fusion Glycoprotein of Newcastle Disease Virus. Erişim: [http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pdbId=1G5G]. Erişim tarihi: 06.06.2005.
21. CHENG, S., FOCKLER, C., BARNES, W.M., HIGUCHI, R. (1994). Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Genetics*, **91**: 5695-5699.
22. COLLINS, P.L., MOTTET, G. (1991). Homooligomerization of the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Human Parainfluenza Virus Type 3 occurs before the acquisition of correct intramolecular disulfide bonds and mature immunoreactivity. *J. Virol.* **65**: 2362-2371.
23. COLLINS, M.S., BASHIRUDDIN, J.B., ALEXANDER, D.J. (1993). Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Arch. Virol.*, **128**: 363-370.
24. COLLINS, M.S., STRONG, I., ALEXANDER, D.J. (1996). Pathogenicity and phylogenetic evaluation of the variant Newcastle disease viruses termed 'pigeon PMV-1 viruses' based on the nucleotide sequences of the fusion protein gene. *Arch. Virol.*, **141**: 635-647.
25. COLMAN, P.M., HOYNE, P.A., LAWRENCE, M.C. (1993). Sequence and structure alignment of Paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with Influenza Virus neuraminidase. *J. Virol.*, **67**, 2972-2980.
26. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. (1992). Council directive 92/66/EEC of 14th July 1992 introducing Community measures for the control of Newcastle disease. Official Journal of the European Communities, **L260**: 1-20.
27. CORONEL, E.C., MURTI, K.G., TAKIMOTO, T., PORTNER, A. (1999). Human Parainfluenza Virus Type 1 Matrix and Nucleoprotein Genes Transiently Expressed in Mammalian Cells Induce the Release of Virus-Like Particles Containing Nucleocapsid-Like Structures. *J. Virol.*, **73**: 7035-7038.

28. CURT, M., HORVATH, C.M., LAMB, R.A. (1992). Studies on the fusion peptide of a Paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion. *J. Virol.*, **66**: 2443-2455.
29. DONI, R.H., COX, P.T., WAINWRIGHT, B.J., BAKER, K., MATTICK, J.S. (1991). Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nuc.Acids Res.*, **19**: 4008.
30. DYBUS, A., KNAPIK, K. (2005). A new PCR-RFLP within the domestic pigeon (*Columba livia* var. domestica) cytochrome b (MTCYB) gene. *J. Appl. Gen.*, **46**: 315-317.
31. ELNIFRO, E.M., ASHSHI, A.M., COOPER, R.J., KLAPPER P.E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin. Micr. Reviews*, **13**: 559-570.
32. FELSENSTEIN, J. (2004). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Erişim: [<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/getme.html>]. Erişim Tarihi: 14.06.2005.
33. FERLICOT, S., PARADIS, V., DARGERÉ, D., MONGES, G., BEDOSSA, P. (1999). Detection of telomerase in hepatocellular carcinomas using a PCR ELISA assay: comparison with hTR expression. *J. Clin. Path.*, **52**: 725-729.
34. HALL, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, **41**: 95-98.
35. HERCZEG, J., WEHMANN, E., BRAGG, R.R., TRAVASSOS DIAS, P.M., HADJIEV, G., WERNER, O., LOMNICZI, B. (1999). The novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Sout Africa, one of which (VIIb) reached to Southern Europe. *Arch. Virol.*, **144**: 2087-2099.
36. HERCZEG, J., PASCUCCI, S., MASSI, P., LUINI, M., SELLI, L., CAPUA, I., LOMNICZI, B. (2001). A longitudinal study of velogenic Newcastle disease virus genotypes isolated in Italy between 1960 and 2000. *Avian Path.*, **30**: 163-168.
37. HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P.S, GRIFFITH, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, **10**: 413-417.
38. HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., WATSON, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, **11**: 1026-1030.
39. HOSHINO, T., NODA, N., TSUNEDA, S., HIRATA, A., INAMORI, Y. (2001). Direct detection by in situ PCR of the amoA gene in biofilm resulting from a nitrogen removal process. *Appl. Environ. Micr.*, **67**: 5261-5266.
40. HSU, M.C., SCHEID, A., CHOPPIN, P.W. (1981). Activation of the Sendai virus fusion protein (f) involves a conformational change with exposure of a new hydrophobic region. *The J. Biologzcai, Chem.*, **256**: 3557-3563.
41. JONES, M.E., FOX, A.J., BARNES, A.J., OPPENHEIM, B.A., BALAGOPAL, P., MORGENSTERN, G.R., SCARFFE, J.H. (1998). PCR-ELISA for the early diagnosis of invasive pulmonary aspergillus infection in neutropenic patients. *J. Clin. Path.*, **51**: 652-656.

42. KABOEV, O.K., LUCHKINA, L.A., TRET'LAKOV A.N., BAHRMAND A.R. (2000). PCR hot start using primers with the structure of molecular beacons (hairpin-like structure). *Nucl. Acids Research*, **28**: e94.
43. KAIJALAINEN, S., KARHUNEN, P.J., LALU, K., LINDSTROM, K. (1993). An alternative hot start technique for PCR in small volumes using beads of wax-embedded reaction components dried in trehalose. *Nucleic Acids Research*, **21**: 2959-2960.
44. KE., M.G., LIU, H.J., LIN, Y.M., CHEN, J.H., TSAI, S.S., CHANG, C.P. (2001). Molecular characterization of Newcastle disease viruses isolated from recent outbreaks in Taiwan. *J. Vir. Meth.*, **97**: 1-11.
45. KIMBALL, J.W. (2003). DNA Sequencing. Erişim: [<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/D/DNAsequencing.html>]. Erişim tarihi: 12.10.2005.
46. KINJO, M. (1998). Detection of asymmetric PCR products in homogeneous solution by fluorescence correlation spectroscopy. *Biotechniques*, **25**: 706-715.
47. KOUWENHOVEN, B., (1993). Paramyxovirus Infection. In: *Virus Infection of Birds*. Ed.: McFerran J.B. ve McNulty M.S., Netherlands; Elsevier Science Publisher, p.: 341-374.
48. KWON, H.J., CHOA, S.H., AHNA, Y.J., SEO, S.H., CHOI, K.S., KIM, S.J. (2003). Molecular epidemiology of Newcastle disease in Republic of Korea. *Vet. Micr.* **95**: 39-48.
49. LAMB, R.A., COLLINS, P.L., KOLAKOFSKY, D., MELERO, Y., NAGAI, Y., OLDSTORE, M.B.A., PRINGLE, C.R., RIMA, B.K. (2000). Family Paramyxoviridae. In *Virus Taxonomy*. Ed: Van Regenmortel, M.V.H. New York: Academic Press., Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, p.: 549-561.
50. LAS ALAMOS NATIONAL LABORATORY (2004). Neighbor treemaker. Erişim: [<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/CONTAM/TreeMaker/TreeMaker.html>]. Erişim Tarihi: 14.06.2005.
51. LEE, L.G., CONNELL, C.R., BLOCH, W. (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucl. Acids Res.*, **21**: 3761-3766.
52. MACKAY M.I., ARDEN, E.K., NITSCHKE, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucl. Acids Res.* **6**: 1292-1305.
53. MAST, J., NANBRU, C., GILSON, D., DECAESSTECKER, M., LAMBRECHT, B., VANDENBERG, T., MEULEMANS, G. (2004). Immunoselection of Newcastle disease virus strains suitable for in ovo vaccination. Erişim: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=57282824>]. Erişim tarihi: 13.06.2005.
54. MAXAM, A.M., GILBERT, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Biochemistry*. **74**: 560-564.
55. MAYO, M.A. (2002). A summary of the changes recently approved by ICTV. *Arch. Virol.* **147**: 1655-1656.
56. MILLAR N.S., CHAMBERS, P., EMMERSON, P.T. (1988). Nucleotide sequence of the haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein genes of Newcastle disease virus, strain Ulster: molecular basis for variations in pathogenicity between strains. *J. Gen. Virol.*, **69**: 613-620.

57. MIRZA, A.M., DENG, R., IORIO, R.M. (1994). Site-Directed mutagenesis of a conserved hexapeptide in the Paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein: effects on antigenic structure and function department of molecular genetics and microbiology. *J. Virol.* **68**: 5093-5099.
58. MORENO, Y., BOTELLA, S., ALONSO, J.L., FERRU'S, M.A., HERNA'NDEZ, M., HERNA'NDEZ, J. (2003). Specific detection of Arcobacter and Campylobacter strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Envir. Micr.*, **69**: 1181-1186.
59. MORRISON, T., WARD L.J., SEMERJIAN, A. (1985). Intracellular processing of the Newcastle disease virus fusion glycoprotein. *J. Virol.*, **53**: 851-857.
60. MORRISON, T.G. (1988). Structure, function, and intracellular processing of Paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res.*, **10**: 113-135.
61. MOTTET, G., PORTNER, A., ROUX, L. (1986). Drastic immunoreactivity changes between the immature and mature forms of the Sendai Virus HN and fo glycoproteins. *J. Virol.*, **59**: 132-141.
62. MOUNIR, S. (1993). Polymerase chain reaction (PCR). In: *Methods. and Technology. In Virolog.* Ed: Payment, P., Trudel, M., New York: Marcel Dekker Inc., p.: 297-302.
63. MUELLER, U.G., WOLFENBARGER, L.L.. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. *Tree*, **14**: 389-393.
64. NAGAI, Y., OGURA, H., KLENK, H.D. (1976a). Studies on the assembly of the envelope of the Newcastle virus. *Virology*, **69**: 523-538.
65. NAGAI, Y., KLENK, H.D., ROTT, R. (1976b). Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and it significance for the virulence of Newcastle Disease Virus. *Virology*, **72**: 494-508.
66. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). (2002). Newcastle disease. Erişim: [[http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a\\_A160.htm](http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a_A160.htm)] Erişim tarihi: 14.06.2005.
67. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) MANUEL. (2004). Newcastle disease. Erişim: [[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00038.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00038.htm)]. Erişim tarihi: 14.06.2005.
68. OGASAWARA, T., GOTOH, B., SUZUKI, H., ASAKA, J.I., SHIMOKATA, K., ROTT, R., NAGAI, Y. (1992). Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo. *The EMBO Journal*, **11**: 467-472.
69. ÖNCEL, T., ALEXANDER, D.J., MANVELL, R.J., TÜRE, O. (1997). Characterization of Newcastle disease viruses isolated from chickens and pigeons in the South Marmara Region of Turkey. *Avian Path.*, **1**: 129-137.
70. REGENMORTEL, M.H.V, FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CARSTENS, E.B., ESTES, M.K., LEMON, S.M., MANILOFF, J., MAYO, M.A., MCGEOCH, D.J., PRINGLE, C.R., WICKNER, R.B. (2000). Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Erişim:[<http://www.virustaxonomyonline.com/virtax/lpext.dll?f=templates&fn=main-h.htm>]. Erişim Tarihi: 24.06.2005.

71. RETZEL, E.F., STASKUS, K.A., EMBRETSON, J.E., HAASE, A.T. (1994). The in situ PCR: amplification and detection in a cellular context. Erişim: [<http://wheat.pw.usda.gov/~lazo/methods/minn/chapter3.7/chapter3.7.fm.html>]. Erişim tarihi: 18.11.2005
72. RODERİC, D.M. (2001). Treeview. Erişim: [<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview>]. Erişim tarihi: 09.06.2005.
73. ROSE, J.K., WHITT, M.A. (2001). Rhabdoviridae: the viruses and their replication. In: *Fundamental Virology*. Ed: Knipe, D.M., Howley, P.M. USA: Lippincott Williams & Wilkins Press, p.: 665-725.
74. SANGER, F, AIR, G.M., BARRELL, B.G., BROWN, N.L., COULSON, A.R., FIDDES, C.A., HUTCHISON, C.A., SLOCOMBE, P.M., SMITH, M. (1977). Nucliotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, **265**: 687-695.
75. SCANLON, D.B., CORINO, G.L, SHIELL, B.J., DELLA-PORTA, A.J., MANVELL, R.J., ALEXANDER, D.J., HODDER, A.N., GORMAN, J.J. (1999). Pathotyping isolates of Newcastle disease virus using antipeptide antibodies to pathotype-specific regions of their fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins. *Arch. Virol.*, **144**: 55-72.
76. SEAL, B.S., KING, D.J., BENNET, J.D. (1995). Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription pcr coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. *J. Clin.Micr.*, **33**: 2624-2630.
77. SECHOY, O., PHILIPPOT, J.R., BIENVENUEE, A. (1987). F protein - F protein interaction within the Sendai virus identified by native bonding or chemical cross-linking. *The J. Biol.Chem.*, **262**: 11519-11523.
78. STAMPS, A.C., TERRETT, J.A., ADAM, P.J. (2003). Application of in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) to tissue microarrays. *J. Nanobiotechnology*. Erişim: [<http://www.jnanobiotechnology.com/content/1/1/3>]. Erişim tarihi: 15.11.2005.
79. STRICKER, R., ROUX, L. (1991). The major glycoprotein of Sendai virus is dispensable for efficient virus particle budding. *J. Gen. Virol.*, **72**: 1703-1707.
80. TAMURA, K., KUMAR, S. (2002). Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA3). Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages. *Mol. Biol. Evol.*, **19**: 1727-1736.
81. TANI, K., KUOKAWA, K., NASU, M. (1998). Development of a direct in situ PCR method for detection of specific bacteria in natural. *Appl. Envir. Micr.*, **64**: 1536-1540.
82. TETTELIN, H., RADUNE, D., KASIF, S., KHOURI, H., SALZBERG, S.L. (1999). Optimized multiplex PCR: efficiently closing a whole-genomeshotgun sequencing project. *Genomics*, **62**: 500-507.
83. THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAC, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G. (1997). The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.*, **25**: 4876-4882.

84. THOMPSON, S.D., LAVER, W.G., MURTI, K.G., PORTNER, A. (1988). Isolation of a biologically active soluble form of the hemagglutinin-neuraminidase protein of Sendai virus, *J. Virol.*, **62**: 4653-4660.
85. VALASEK, M.A., REPA, J.J. (2005). The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.*, **29**: 151-159.
86. VIERSTRAETE, A. (2004). Sequencing of the obtained PCR product. Erişim: [<http://users.ugent.be/~avierstr/index.html>]. Erişim tarihi: 12.10.2005.
87. WANG, H.C., LEE, H.S., CHANG, T.J., WONG, M.L. (2004). Examination of meat components in commercial dog and cat feed by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique. *J. Vet. Med. Sci.* **66**: 855-859.

## ÖZGEÇMİŞ

### **I- Bireysel Bilgiler**

Adı: Mehmet Fatih

Soyadı: Barut

Doğum yeri ve tarihi: Malatya 21.04.1978

Uyruğu: TC

Medeni durumu: Evli

Askerlik durumu: Tecilli

İletişim adresi ve telefonu: Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü  
/Ankara,

Tel: 0 -505- 4746447, 0- 312- 3260090/149

### **II- Eğitimi**

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi 1999

Samsun Veteriner Sağlık Meslek Lisesi 1994

Aydın Merkez İmam Hatip Lisesi- Ortaokul bölümü 1991

Aydın Cumhuriyet İlköğretim okulu 1988

### **III- Ünvanları**

Veteriner Hekim

### **IV- Mesleki Deneyimi**

7 yıl

### **V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar**

Yok

### **VI- Bilimsel İlgi Alanları**

Yayınları: Yok

### **VII- Bilimsel etkinlikleri**

Aldığı burslar: Yok

Ödüller: Yok

Projeleri: Yok

Verdiği Konferans ve Seminerler: Yok

Katıldığı Paneller: Yok



## VIII-Diğer Bilgiler

### Aldığı kurslar:

Mavi dil hastalığı (BT) virus'unun vektör sineklerden izolasyon ve identifikasyonu, Pirbright Institute of Animal Health/ İngiltere, 2004.

Monoklonal Antikor Üretimi, Paul Ehrlich Institute/ Almanya, 2004.

Küçük ruminant vebası (PPR) virusunun teşhisinde moleküler tekniklerin kullanımı, Pirbright Institute of Animal Health/ İngiltere, 2005.