

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE BATI BÖLGELERİNDE
HANTAVİRUS ARAŞTIRILMASI: TRAKYA
BÖLGESİ KEMİRİCİLERİNDE HANTAVİRUS
VARLIĞININ POLİMERAZ ZİNCİR
TEPKİMESİ İLE ARAŞTIRILMASI**

ALİHAN BULĞURCU

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ

ANABİLİMDALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2013

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2010970072

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE BATI BÖLGELERİNDE
HANTAVİRUS ARAŞTIRILMASI: TRAKYA
BÖLGESİ KEMİRİCİLERİNDE HANTAVİRUS
VARLIĞININ POLİMERAZ ZİNCİR
TEPKİMESİ İLE ARAŞTIRILMASI**

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİMDALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALİHAN BULĞURCU

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. İ. M. ALİ ÖKTEM

DEU.HSI.MSc-2010970072

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Yüksek Lisans
programı öğrencisi Alihan BULĞURCU '**TÜRKİYE BATI
BÖLGELERİNDE HANTAVİRUS ARAŞTIRILMASI: TRAKYA
BÖLGESİ KEMİRİCİLERİNDE HANTAVİRUS VARLIĞININ
POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ İLE ARAŞTIRILMASI**' konulu
Yüksek Lisans tezini 26.08.2013 tarihinde başarılı olarak
tamamlamıştır.


Doç. Dr. İ. Mehmet Ali Öktem
BAŞKAN


Prof. Dr. Zeynep GÜLAY
ÜYE


Prof. Dr. Şöhret AYDEMİR
ÜYE

Doç. Dr. Ö. Alpay Özbek
YEDEK ÜYE

Doç. Dr. H. Ogün Sercan
YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
TABLO DİZİNİ.....	vi
KISALTMALAR.....	vii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. HANTAVIRUS.....	4
2.1.1. Tarihçe, Sınıflandırma ve Genel Yapısı.....	4
2.1.2. Hantaviral İnfeksiyonlar ve Epidemiyoloji.....	6
2.1.2.1. Türkiye' de Durum.....	9
2.1.3. Hantavirus Replikasyonu.....	9
2.1.4. Hantavirus Tanısı.....	10
2.1.4.1. Seroloji.....	10
2.1.4.1.1. Immunfloresans Antikor Testi (IFAT).....	11
2.1.4.1.2. ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>).....	12
2.1.4.1.3. Strip Immunblotlama Testi (SIA).....	12
2.1.4.1.4. Western Blotlama (WB).....	12
2.1.4.1.5. Fokus Redüksiyon Nötralizasyon Testi (FRNT).....	13
2.1.4.2. Hantavirus Moleküler Tanısı.....	13
2.1.4.2.1. Yuvalanmış Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi (Nested RT-PCR).....	14
2.2. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT).....	14
2.2.1. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PCR).....	16
2.2.2. Yuvalanmış Polimeraz Zincir Tepkimesi (<i>Nested-PCR</i>).....	16
2.2.3. Kademeli Sıcaklık Düşürme PZT (<i>Touchdown PCR</i>).....	17
2.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi.....	18
2.3. Hantavirus İnfeksiyonlarından Korunma ve Tedavi.....	19

3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Araştırmanın Tipi	20
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	20
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	20
3.4. Çalışma Materyali	20
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	20
3.6. Veri Toplama Araçları	21
3.6.1. Kullanılan sarf malzemeleri ve cihazlar	21
3.6.2. Rodent Dokularından RNA İzolasyonu	24
3.6.3. cDNA Sentezi	25
3.6.4. Dobrava, Saaremaa ve Puumala Hantavirus Taraması İçin Öncül Tasarımı	25
3.6.4.1. Dobrava Virus Taraması İçin Öncül Tasarımı.....	26
3.6.4.2. Saaremaa Virus Taraması İçin Öncül Tasarımı.....	26
3.6.4.3. Puumala Virus Taraması İçin Öncül Tasarımı.....	27
3.6.5. Liyofilize Dobrava, Saaremaa ve Puumala Virus Öncüllerinin Sulandırılması	27
3.6.6. Dobrava, Saaremaa ve Puumala Virus İçin İç İç Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi Tasarımı	30
3.6.6.1. Dobrava Virüsü İçin İç İç Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) Tasarımı.....	30
3.6.6.1.1. MgCl ₂ Optimizasyonu.....	30
3.6.6.1.2. cDNA Konsantrasyon Optimizasyonu.....	30
3.6.6.1.3. DMSO (Dimetil Sülfoksit, (CH ₃) ₂ SO) Konsantrasyonu Optimizasyonu.....	31
3.6.6.1.4. Öncül Konsantrasyonu ve T _m Optimizasyonu.....	33
3.6.6.1.5. Dobrava İç İç 2. PZT, Ürün Konsantrasyon Denemesi.....	34
3.6.6.1.6. Dobrava Virus İç İç 1. PZT ve 2. PZT Tepkime Karışımı ve Tepkime Koşulları.....	36
3.6.6.2. Saaremaa Virus İçin İç İç Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) Tasarımı.....	37
3.6.6.2.1. Saaremaa Virus İçin İç İç 1. PZT Denemesi.....	37
3.6.6.2.2. Saaremaa Virus İçin İç İç 2. PZT Denemesi.....	39

3.6.6.3. Puumala Virus İçin İç İçe Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) Tasarımı.....	40
3.6.7. Rodent Dokularının Dobrava Virus Varlığı Açısından Taranması.....	43
3.6.8. Rodent Dokularının Saaremaa Virus Varlığı Açısından Taranması.....	44
3.6.9. Rodent Dokularının Puumala Virus Varlığı Açısından Taranması.....	46
3.6.10. Agaroz Jel Elektroforezi.....	47
3.6.10.1. Agaroz Jel Hazırlanması.....	47
3.6.10.2. Elektroforez Yüklenmesi ve Yürütme.....	47
3.6.10.3. Jel Görüntüsü Alınması.....	48
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	48
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	48
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	48
3.10. Etik Kurul Onay.....	49
4. BULGULAR.....	50
5. TARTIŞMA.....	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	71
7. KAYNAKLAR.....	73
8. EKLER.....	80

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1 : Hantaviral genom segmentleri.....	5
Şekil 2: A. flavicollis ve A. agrarius' un dağılımı.....	8
Şekil 3: Dünya genelinde Hantavirus türlerinin dağılımı.....	9
Şekil 4: Yuvalanmış polimeraz zincir tepkimesi basamakları	17
Şekil 5: Dobrava virus MgCl ₂ optimizasyon agaroz jel görüntüsü.....	50
Şekil 6: cDNA konsantrasyon jel görüntüsü (1/1000-1/10.000).....	50
Şekil 7: cDNA konsantrasyon jel görüntüsü (1/10.000-1/1.000.000).....	50
Şekil 8: %2, %5, %10 DMSO konsantrasyon jel görüntüsü	51
Şekil 9: %2 DMSO konsantrasyon jel görüntüsü	51
Şekil 10: Öncül ve T _m optimizasyon ürünleri jel görüntüsü	52
Şekil 11: Dobrava 2. PZT, ürün konsantrasyon denemesi jel görüntüsü	52
Şekil 12 : Saaremaa 1. PZT ürün konsantrasyon denemesi jel görüntüsü.....	53
Şekil 13: Saaremaa 2. PZT ürün konsantrasyon denemesi.....	54
Şekil 14: Puumala 2. PZT ürünleri agaroz jel görüntüsü	55
Şekil 15: Puumala 2. PZT optimizasyon ürünleri agaroz jel görüntüsü.....	55
Şekil 16 : 1-11 arası dalak örneğinin Dobrava virus taraması agaroz jel görüntüsü	56
Şekil 17 : 12-44 arası dalak örneklerinin Dobrava virus taraması agaroz jel görüntüsü.....	56
Şekil 18 : 44-91 arası dalak örneklerinin Dobrava virus taraması agaroz jel görüntüsü.....	57
Şekil 19 : 44, 48, 56 numaralı böbrek örneklerinin Dobrava virus taraması agaroz jel görüntüsü.....	57
Şekil 20 : 49, 50, 51, 52, 58 numaralı böbrek örneklerinin Dobrava virus taraması agaroz jel görüntüsü.....	57
Şekil 21 : 1-44 arası dalak örneklerinin Saaremaa virus taraması agaroz jel görüntüsü.....	58
Şekil 22 : 45-91 arası dalak örneklerinin Saaremaa virus taraması agaroz jel görüntüsü.....	59
Şekil 23 : 32, 42, 44, 58, 76, 77, 80, 81, 82, 84 numaralı dalak örneklerinin Saaremaa virus taraması agaroz jel görüntüsü.....	60
Şekil 24 : 58 numaralı <i>bulk</i> ve karaciğer örneğinin Saaremaa virus taraması agaroz jel görüntüsü.....	60
Şekil 25: 26, 39, 40, 42, 44, 45, 46, 47, 90, 91 numaralı böbrek örneklerinin Saaremaa virus taraması agaroz jel görüntüsü.....	61
Şekil 26 : 48, 49, 50, 51, 52, 56, 80, 81 numaralı böbrek örneklerinin Saaremaa virus taraması agaroz jel görüntüsü.....	61

Şekil 27 : 1-33 arası dalak örneklerinin Puumala virus taraması agaroz jel görüntüsü.....	62
Şekil 28 : 34-91 arası dalak örneklerinin Puumala virus taraması agaroz jel görüntüsü.....	62
Şekil 29 : 48, 49, 50, 51, 52, 56 numaralı böbrek örneklerinin Puumala virus taraması jel görüntüsü.....	63
Şekil 30 : Serolojik olarak Hantavirus pozitif olan örneklerin Dobrava ve Saaremaa virus taraması agaroz jel görüntüsü.....	63

TABLO DİZİNİ

Tablo 1 : Avrupa’ da sirküle eden hantaviruslar.....	8
Tablo 2: DNA molekülünün büyüklüğüne göre agaroz konsantrasyonları.....	18
Tablo 3 : MgCl ₂ optimizasyonu tepkime karışımı konsantrasyon değerleri.....	29
Tablo 4 : cDNA seyreltme değerleri.....	30
Tablo 5 : cDNA konsantrasyon optimizasyonu için kullanılan tepkime karışımı.....	30
Tablo 6 : DMSO konsantrasyon optimizasyonu tepkime karışımı değerleri.....	32
Tablo 7 : Öncül konsantrasyon optimizasyonu tepkime karışımı.....	33
Tablo 8 : 2. PZT için kullanılan 1. PZT ürün konsantrasyon değerleri.....	34
Tablo 9 : Dobrava 2. PZT tepkime karışımı.....	35
Tablo 10 : Dobrava 1. PZT tepkime karışımı.....	36
Tablo 11 : Saaremaa Virus 1. PZT tepkime karışımı.....	38
Tablo 12 : Saaremaa pozitif kontrol cDNA seyreltme değerleri.....	38
Tablo 13 : Saaremaa virus 2. PZT tepkime karışımı.....	39
Tablo 14 : Saaremaa 2. PZT için kullanılacak 1. PZT ürün seyreltme değerleri.....	39
Tablo 15 : Puumala Virus 1. PZT tepkime karışımı.....	40
Tablo 16 : Puumala 2. PZT tepkime karışımı.....	41
Tablo 17 : Araştırma planı ve takvimi.....	48

KISALTMALAR

- HPS** Hantavirus Pulmoner Sendrom
HFRS Renal Sendromlu Kanamalı Ateş
IFAT İmmün Floresan Antikor Testi
ELISA “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”
IgE Immunglobulin E
RNA Ribonükleik Asit
RT-PCR Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi
cDNA Kompleman Deoksiribo Nükleik Asit
PZT Polimeraz Zincir Tepkimesi
HTNV Hantaan Virus
DOBV Dobrava-Belgrad Virus
SAAV Saaremaa Virus
SEOV Seoul Virus
AMRV Amur Virus
RdRp RNA bağımlı RNA polimeraz
SN Sin Nombre Virus
NY New-York Virus
TUL Tula Virus
ER Endoplazmik Retikulum
BCCV *Black-Creek Canal Virus*
IgG Immunglobulin G
FITC *Fluorescein Isothiocyanate*
Np Nükleokapsit Proteini
SDS-PAGE Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
rN Rekombinant N antijeni
FRNT Fokus Redüksiyon Nötralizasyon Testi
FFU Odak oluşturan ünite
MMLV Moloney Murine Leukemia Virus
AMV Avian Myeloblastozis Virusu
BP *Base pair* (baz çifti)
M *Marker*

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminin boyunca bilgisi ve anlayışı ile her zaman yanımda olan, engin bilgi deneyimleriyle katkılarını esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. İ. M. Ali ÖKTEM' e, tez çalışmamla dahili olduğum projenin diğer üyelerine, yetişmemde emeği geçen tüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarıma katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitiminin boyunca, Yurt içi Yüksek Lisans Bursu ile bana destek sağlayan ve bilim görüşünü bana kazandıran TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı' na teşekkürlerimi sunarım.

Manevi destekleri ile yanımda olan yüksek lisans, doktora ve uzmanlık eğitimi alan arkadaşlarıma, bölüm çalışanlarına ve her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimle.

Saygılarımla
Alihan BULĞURCU

TÜRKİYE BATI BÖLGELERİNDE HANTAVİRUS ARAŞTIRILMASI: TRAKYA BÖLGESİ KEMİRİCİLERİNDE HANTAVİRUS VARLIĞININ POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ İLE ARAŞTIRILMASI

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji AD.

Alihan BULĞURCU

alihanbulgurcu@hotmail.com

Hantaviruslar, üç segmentli genomları negatif iplikli olan RNA viruslarıdır. İnsanlarda iki önemli sendroma sebep olurlar. Birincisi Asya ve Avrupa’ da görülen renal sendromlu kanamalı ateş (HFRS), diğeri ise Amerika’ da hantavirus pulmoner sendromudur (HPS). Hantaviruslar, kemirici türleri tarafından taşınırlar ve her bir kemirici türü bir hantavirus türüne spesifiktir. Hantavirus tanısı için serolojik ve moleküler yöntemler kullanılır. Serolojik yöntemlerde en çok; IFAT, ELISA, Fokus Redüksiyon Nötralizasyon Testi ve Strip İmmunoblot yöntemi kullanılırken epidemiyolojik çalışmalarda ise IFAT ve ELISA özellikle yüksek aviditedeki IgG antikorlarını tespit etmeye yönelik kullanılır. Moleküler yöntemler ise hantavirus enfeksiyonlarının 12 ile 24 saat içinde ölüme gidebilen tablosundan ötürü hızlı tanıda önem kazanmaktadır. İnsan ve rodent doku örneklerindeki viral RNA’ nın düşük seviyelerde bulunmasından ötürü, yüksek homolojiye sahip bölgeler için seçilmiş primerler kullanılarak gerçekleştirilen yuvalanmış ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesine (*nested-RT-PCR*) gerek duyulmaktadır. Bu çalışmada, Trakya Bölgesi’ nden toplanan kemiriciler optimize ettiğimiz yuvalanmış-RT-PCR yöntemi kullanılarak Dobrava, Saaremaa ve Puumala virüs varlığı açısından taranmıştır.

Optimizasyon çalışması öncesi her üç türe özgü öncüller tasarlanmış ve sentezletirilmiştir. Rodent dokuları ekstraksiyon kiti üreticisinin talimatlarına göre RNA ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuş ve RNA’ lardan cDNA sentezletirilerek, sentezlenen cDNA’ lar PZT ile taranmasına kadar -80 °C’ de saklanmışlardır. PZT tepkimesinin yuvalı olmasına literatürler ışığında karar verilmiş ve Dobrava virüs için sırasıyla MgCl₂ konsantrasyonu, cDNA konsantrasyonu, DMSO konsantrasyonu, öncül konsantrasyonu, ürün konsantrasyonu ve Tm optimizasyonu yapılmış ve bu koşullar Saaremaa ve Puumala için de denenerek üç virüs için de yöntem optimizasyonu oturtulmuştur. Daha sonra ise dokulardan ekstrakte edilen RNA’ lardan elde edilen cDNA’ lar üç virusun varlığı açısından ayrı ayrı taranmıştır. Tarama sonucunda üç serotip için de pozitif sonuç bulunamamıştır. Bu çalışmada optimize edilen PZT yöntemi, tanısal ve immünolojik ileriki çalışmalarda da kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Hantavirus, nested RT-PCR, optimizasyon

INVESTIGATION OF HANTAVIRUS IN WESTERN REGIONS OF TURKEY:
INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF HANTA VIRUS IN RODENTS IN THRACE
REGION BY USING POLYMERASE CHAIN REACTION

Dokuz Eylül University Institute of Health Sciences, Microbiology Department

Alihan BULGURCU

alihanbulgurcu@hotmail.com

Hantavirus is the RNA virus which has three-segmented and negative-strand genomes. It causes two major syndrome in humans. The first is hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Asia and Europe, the other is hantavirus pulmonary syndrome (HPS) in USA. Hantavirus is carried by rodent species and each rodent species is unique to only one Hantavirus species. Serological and molecular methods are used for the diagnosis of hantavirus. Immunofluorescence Antibody Test (IFAT), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Focus Reduction Neutralization Test and Strip Immunoblot method are generally used as serological methods, also IFAT and ELISA are used to detect high avidity IgG antibodies in epidemiological studies. Molecular methods are highly important for rapid diagnosis because hantavirus infections can cause death within 12 to 24 hours. Since viral RNA presences in low-levels in tissue samples of human and rodents, the nested reverse transcription polymerase chain reaction (nested-RT-PCR) which is performed by specific primers to regions with high homology is necessary. In this study, the rodents collected from Thrace Region have been screened for the presence of Dobrava, Saaremaa and Puumala viruses by using optimized nested-RT-PCR.

Specific primers for each three species were designed and synthesized prior to the optimization study. RNA extraction from rodent tissues have been performed according to extraction kit manufacturer's instructions. It has been decided in the light of the literature that PCR method is performed as nested PCR and concentration of MgCl₂, cDNA, DMSO, primers, product and T_m were optimized respectively for Dobrova virus. These conditions also have been tested for each Saaremaa and Puumala viruses to the end that method optimization was finalized for three viruses, too. Then, cDNAs obtained from the RNA extracted from tissues have been screened for the presence of these three viruses. The positive results were not found for three serotypes in result of molecular screening. PCR method which is optimized in this study may also be used for further diagnostic and immunological studies.

Keywords: Hantavirus, nested-RT-PCR, optimization

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hantaviruslar; *Bunyaviridae* ailesi içinde *Hantavirus* genusunda bulunan zarflı negatif yönelimli üç segmentli RNA viruslarıdır. Tüm dünyada önemli halk sağlığı sorunu haline gelen (her yıl 200.000'den fazla vaka (1)) ve oldukça yüksek mortaliteye sahip klinik tablolar yaratan hantavirüs pulmoner sendrom (HPS) ve renal sendromlu kanamalı ateş (HFRS) etkeni olan Hantavirusların çok sayıda genotipi bulunmaktadır. Hantaan, Seoul, Dobrava, Puumala, Saarema Eski Dünya Hantavirusları arasında en yaygın virüs tipleridir ve HFRS'den sorumludur. Amerika'da ise başı çeken tür Sin Nombre virustur ve HPS'den sorumludur (2). Hantavirusların her türü, özgül kemiriciler veya böcekçillerle taşınır ve insanlara bu hayvanların çikartılarının solunması ile bulaşır.

Türkiye'de 12 kişiyi içeren ilk laboratuvar onaylı olgu raporu Şubat 2009'da Bartın ve Zonguldak'tan bildirilmiştir (3). Hantavirus taşıyan kemirici ve böcekçillerin yurdumuzda da görülmesi ve Bartın ve Zonguldak salgınları da göz önüne alınırsa hantavirus enfeksiyonunun yurdumuzda da önemli halk sağlığı problemi olduğu görülmektedir.

Bu araştırmada Türkiye'nin batı bölgelerinde hantavirusların başlıca taşıyıcıları olan yabani kemiricilerde virusun varlığının polimeraz zincir tepkimesi ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

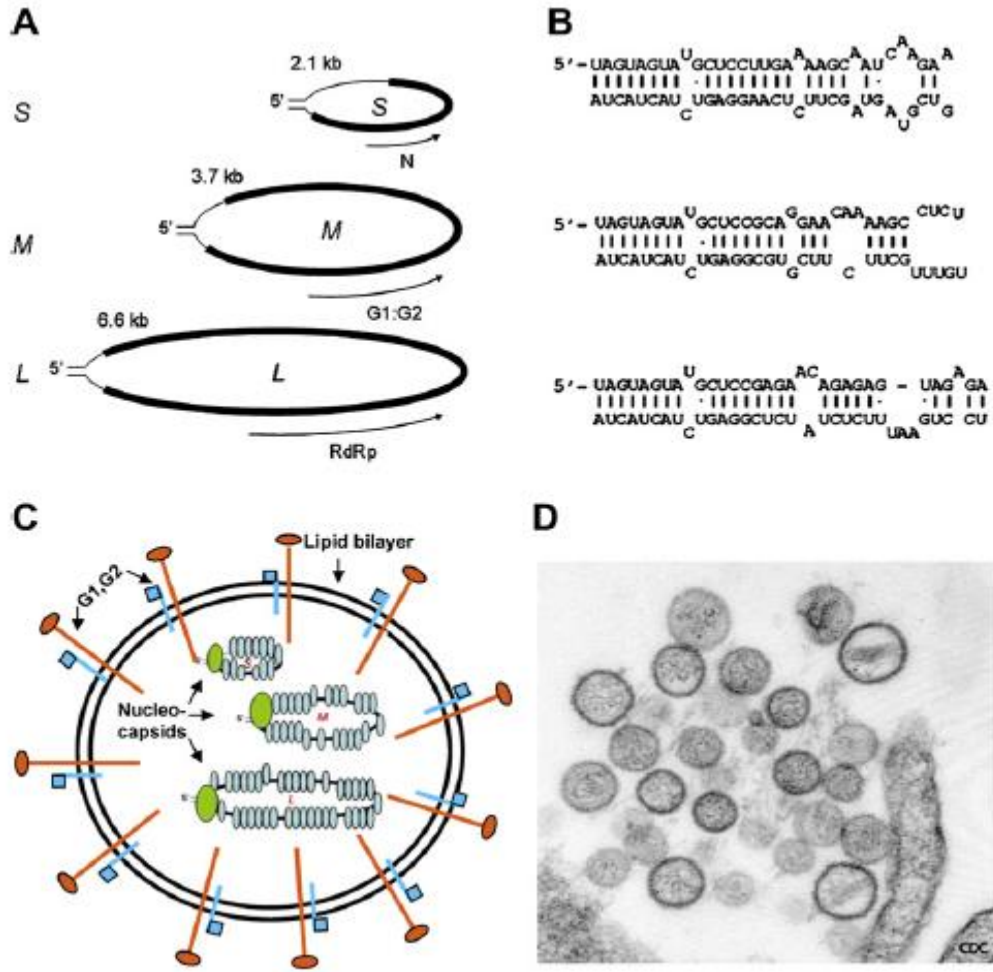
2.1. HANTAVİRUS

2.1.1. Tarihçe, Sınıflandırma ve Genel Yapısı

Geçtiğimiz yüzyılda, hastalığın iki önemli salgını, Eski ve Yeni Dünya hantaviruslarının keşfinde öncülük etmiştir. İlk salgın, Kore Savaşı (1950-1953) sırasında oluşmuştur. 3000' den fazla Birleşmiş Milletler askeri, daha sonra hep renal sendromlu kanamalı ateş olarak bahsedilecek olan Kore kanamalı ateşi ile hasta düşmüştür. Başlarda Four Corners hastalığı olarak anılan, şimdi ise hantavirus pulmoner sendromu ya da hantavirus kardiyopulmoner sendromu olarak anılan hastalığın diğer salgını ise 1993' te, Amerika Birleşik Devletleri' nin Four Corners bölgesinde gerçekleşmiştir. 1978' de, yani HFRS' nin tanımlanmasından yaklaşık 25 yıl sonra ise, bu hastalığın etiyolojik ajanı Hantaan virus (HTNV) ve onun rezervuarı olan çizgili orman faresi (*Apodemus agrarius*) Lee ve ark. tarafından rapor edilmiştir (4).

Hantavirusların her biri, kendilerine spesifik rodent türleriyle taşınırlar. Dobrava-Belgrade virus (DOBV), şiddetli HFRS ile ilişkilidir ve sarı boyunlu orman faresi (*Apodemus flavicollis*) tarafından taşınır. Saaremaa virusun doğal konağı çizgili orman faresidir (*Apodemus agrarius*) ve ılımlı HFRS' ye sebep olur. SAAV, ilk başlarda *A. agrarius* tarafından taşınan DOBV' un genetik bir varyantı olarak göz önünde bulunduruluyordu, bu yüzden bir süre SAAV' ın taksonomi ve terminolojisinde anlaşmazlık yaşanmıştır. Şimdi tamamen ayrı bir tür olarak tanımlanan virus hala bazı yayınlarda “DOBV-Aa” olarak adlandırılmaktadır (5). Puumala virus, kızıl orman faresiyle (*Myodes glareolus*), Seoul virus (SEOV) Norveç ratıyla (*Rattus norvegicus*), Amur virus (AMRV) Kore tarlafaresiyle (*Apodemus peninsulae*) taşınır (6). Sivriburunlu fareler (shrews), köstebekler ve yarasalar da ayrıca hantavirusların rezervuarlarıdır, fakat bugüne kadar insanlar için patojenlik belirlenmemiştir (7).

Hantaviruslar, çapları 80 ile 120 nm arasında değişen pleomorfik zarflı partiküllerdir (8). Hantaviruslar; L proteini (en az bir replikaz, transkriptaz ve endonükleaz olarak görev alan, RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp)), bir glikoprotein öncüsü (GPC, iki yüzey glikoproteini olan G1 ve G2' nin üretilmesinde görevli), ve bir nükleokapsid proteinini (N) kodlayan, tekli RNA' ların boyutlarına göre isimlendirilen, sırasıyla L (large), M (medium) ve S (small) olarak adlandırılan üç segmentli genomları negatif-iplikli olan RNA viruslarıdır (9;10).



Şekil 1. (A) Hantaviral genom segmentleri, (B) Üç Hantaviral genomik RNA' sında *panhandle* yapısı, (C) Hantavirus partikülünün şematik yapısı, (D) Sin-Nombre Virus' un elektron mikroskopik görüntüsü (11).

S segment tarafından kodlanan N proteini, yaklaşık 50 kDa moleküler kütleyle sahip glikozillenmemiş bir proteindir. Varsayılan yapısal olmayan protein NS_S (7-10 kDa) için bir açık okuma penceresi (Open Reading Frame: ORF) HNT, SEO ve DOB (THAI ve TPM hantavirusları için veri mevcut değildir) hantaviruslarında değil; BAY, BCC, ELMC, ILV, KBR, NY, PH, PUU, RIOS, SN ve TUL hantaviruslarının S segmentlerinde bulunmuştur. *Bunyaviridae* ailesinin diğer üyelerinin M ve/veya S segmentleri yapısal olmayan proteinleri kodlar. Örneğin bunyaviruslar, S segmentin hemen hemen aynı bölgesinde ve benzer boyutlarda fonksiyonel ORF içerir (12). Şimdiye kadar, NS_S, hantavirus-infekte hücrelerde bulunamamıştı, ama çift kodlama kapasiteli bölgelerde nükleotid yerdeğiştirmelerinin (substitutions) azalan sıklığı, ORF' nin en azından SN ve PUU hantavirusları için fonksiyonel olabileceğini düşündürmektedir (13). HTN-benzeri virüslerde uyumlu ORF' nin yokluğu açıklanmayı sürdürmektedir. Hantavirus RNA genomunun 3' ve 5' terminal uçları oldukça

korunmuştur ve komplementerdir, bu yüzden *Bunyaviridae* ailesine özgü olan panhandle yapısının oluşturabilir. Hantavirüslerde panhandle yapıları, en az 17 bp uzunluğundadır; her bir uçtaki 17 bazın 14 tanesi genus-spesifiktir ve tüm mevcut bilinen hantavirüs sekanslarında uçların tamamlayıcılığı, 9. pozisyondaki yanlış eşleşme ile eksiktir (14;15). 10. pozisyondaki kurallara uymayan U-G çifti, G→A değişiminin kurallara uyan çiftleşmenin onarımına neden olduğu BAY ve PH hantavirüslerinde değil, HTN, SEO, PUU, SN ve BCC hantavirüslerinde bulunmaktadır. Hantavirüslerin tahmin edilen panhandle-benzeri yapılarının, veziküler stomatitis ve influenza virüslerindeki benzer şekilde, viral transkripsiyon ve replikasyonun regülasyonunda görev aldığı düşünülmektedir (16;17). Genomun uçları, yalnızca monofosfat içeren 5' uçlarında replikasyon sonlanmasının öngörüldüğü prime-and-realign mekanizmasında yer aldığı düşünülen 3 üçlünükleotit tekrarı içerir (5' pUAGUAGUAG) (9). Hantaan virüsünde, mRNA sentezi ve virüs replikasyonunun başlatılması için prime-and-realign modeli önerilmektedir (18). Bu *prime-and-realign* mekanizmasında, başlıklı RNA öncüsü başlangıçta, viral genom kalıbının 3' ucuyla primerlenir ve birkaç nükleotitten biri tarafından uzatılır. Yeni oluşan zincir sonradan, terminal sekans tekrarlarından dolayı uzun mesafeli uzama meydana gelmeden önce geriye doğru yeniden gruplanır (*realign*). Bu modelde 3' G rezidüsü (kalıntısıyla) veya tek bir GTP ile sonlanan başlıklı RNA öncüsü, sırasıyla transkripsiyon veya replikasyon için primer olarak kullanılır. Prime-and-realign mekanizması ayrıca, viral mRNA' ların 5' ucundaki ekstra tekrarlayan nükleotitlerin varlığının açıklanması için, Germiston ve LaCrosse bunyavirüsleri için de önerilir (19).

2.1.2. Hantaviral İnfeksiyonlar ve Epidemiyoloji

Hantavirüsler (genus Hantavirus, aile Bunyaviridae), insanlarda iki klinik sendroma neden olur: Asya ve Avrupa' da renal sendromlu kanamalı ateş (Hemorrhagic fever with renal syndrome "HFRS") ve Amerika' da hantavirüs pulmoner sendromu (Hantavirus pulmonary syndrom "HPS") (7). Ölüm oranları, Puumala virüsün sebep olduğu HFRS için <math><0,5\%</math> ten, HTN virüsün sebep olduğu HFRS için yaklaşık %5-10' a kadar değişim gösterir. HPS ise yaklaşık %50 ölüm oranına sahiptir (20). Bazı salgınlarda ise ölüm oranları, HFRS için %12, HPS için ise %60' a kadar ulaşabilmektedir (4).

Çiftçiler, askerler, avcılar, kamp yapan insanlar, doğa yürüyüşü yapan kişiler ve laboratuvar çalışanları hantavirüs infeksiyonlarında önemli risk gruplarıdır (21).

Dobrava-benzeri virüs, 2002 yılında, Estonya' nın Saaremaa adasında yakalanmış olan çizgili orman faresinden (*Apodemus agrarius*) izole edilmiştir. Genetik çalışmalar, açığa

Çıkarılmış G1/G2 proteinlerinin aminoasit sekanslarının %6' dan fazla çeşitlilik gösteren Saaremaa izolatu ve Slovenya' dan Dobrava prototipinin M segment sekansları arasında %19' a kadar çeşitlilik olduğunu açığa çıkarmıştır. Virus başlarda, Dobrava virusun *A. agrarius*-taşıyıcılı varyantı olarak kabul ediliyordu, fakat biriken genetik veriler, DOBV' un alt türü olarak yeniden sınıflandırılmasını ya da benzersiz bir hantavirus türü olarak anılması tartışmalarını yaratmıştır (22). Macaristan' da 1999 yılında yapılan bir çalışmada, asıl konakçısı olmayan *A. agrarius*' ta DOBV varlığının gösterilmiştir. DOBV' un hem *A. agrarius*' ta hem de *A. flavicollis*' te bulunmasının ise, akraba olan rodent konaklarında bulunan hantavirusların birbiriyle ilişkili yayılımı hipotezinin gelişmesine olanak tanıyan bir kanıt olarak gösterilmiştir (23). Sonra, SAAV-benzeri türler *A. agrarius*' ta, orta Rusya ve Slovakya' da tanımlanmıştır. Slovenya' nın aynı bölgelerinden analiz edilen iki rodent türünden - *A. agrarius* ve *A. flavicollis* - alınmış hantavirus sekansları arasında kayda değer genetik ve filogenetik farklılıklar olduğu ortaya çıkarılmıştır. Benzer tablo Slovakya' da da gözlemlenmiştir. Bu bulgular, konukçu türler ile hantavirus tipleri arasında yakın ilişki fikrine uyan bir biçimde, her iki virus türünün (*A. flavicollis*' te DOBV ve *A. agrarius*' ta SAAV) karışım olmadan aynı alan içinde, birlikte-yayıldığına kanıt olmuştur (22).

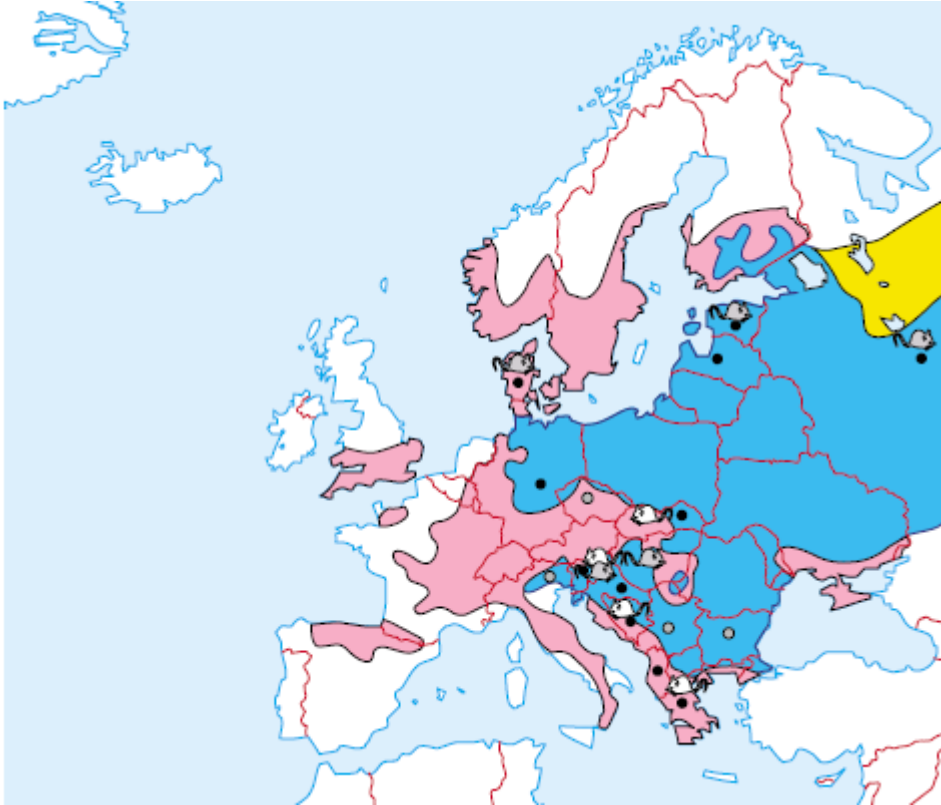
Dobrava hantavirusu kökensel olarak Slovenya' da keşfedilmiş ve izole edilmiştir (24).

PUUV, *Muridae* ailesinin *Arvicolinae* alt ailesine mensup kızıl orman faresiyle (*Myodes glareolus*) taşınır. Virus, kuzey ve orta Avrupa ve Rusya' nın batı kesimindeki insanları etkileyen renal sendromlu kanamalı ateşin ılımlı formu olan nephropathia epidemica (NE) etmenidir. Konukçu rodentlerde virus, hayat boyu kalıcı asemptomatik infeksiyona sebep olur (25).

Tablo 1. Avrupa’ da sirküle eden hantaviruslar (26).

Virus	Taşıyıcı Rodent	Hastalık
Puumala	<i>Myodes glareolus</i> (kızıl orman faresi)	HFRS (ılımlı, NE)
Dobrava	<i>Apodemus flavicollis</i> (sarı boyunlu orman faresi)	HFRS (şiddetli)
Saaremaa	<i>Apodemus agrarius</i> (çizgili orman faresi)	HFRS (ılımlı)
Tula	<i>Microtus arvalis</i> (Avrupa’ nın yaygın tarla faresi)	Hastalıkla ilgisi yok
Seoul	<i>Rattus norvegicus</i> , <i>Rattus rattus</i> (rat)	HFRS (1980’lerde sadece laboratuarlarda salgın doğrulanmış)

HFRS=renal sendromlu kanamalı ateş, NE=nephropathia epidemica



Şekil 2. Sadece *A. flavicollis*’ in dağılımı (pembe), *A. flavicollis* ve *A. agrarius* (mavi), sadece *A. agrarius* (sarı); doğu (gri) ve batıya (beyaz) dönük olan rodent figürleri Saaremaa veya Dobrava sekanslarının sırasıyla *A. agrarius* ve *A. flavicollis*’ te bulunduğu ülkeleri göstermekte; gri noktalar Saaremaa veya Dobrava’ dan kaynaklanan insan hantavirus infeksiyonlarını göstermekte; siyah noktalar ise çapraz nötralizasyon testleri veya RT-PCR ve sekanslama ile teyit edilen olguları göstermektedir (23).



Şekil 3. Dünya genelinde hantavirus türlerinin dağılımı. HPS: Hantavirus Pulmoner Sendromu, HFRS: Renal Sendromlu Kanamalı Ateş (8).

2.1.2.1. Türkiye’ de Durum

HFRS Türkiye’ de ilk defa 2009 yılında Karadeniz kıyısındaki salgın sırasında tanımlanmıştır (3). Hastaneye yatan hastalar arasında ölüm oranı %8 idi ve PUUV’ e göre vakaların DOBV’ den kaynaklandığı düşünülmektedir (27). Ölümcül bir DOBV enfeksiyonu, Türkiye’ nin Avrupa tarafında bulunan İstanbul’ un kentsel bölümünde gözlenmiştir (28). DOBV enfeksiyonu ayrıca iki hastada, Doğu Karadeniz Bölgesi’ nde bulunan Giresun ilinde serolojik olarak tanısı konmuştur (29).

2.1.3. Hantavirus Replikasyonu

Hantavirusların hücreye girişi için birçok reseptör tanımlanmıştır. Hantaviruslar, endotel, epitel, makrofaj, foliküler dendritik ve lenfosit hücreler gibi geniş hücre tiplerini, konukçu hücre yüzey reseptörlerine kendi viral glikoproteinleri aracılığıyla bağlanarak infekte edebilirler (30; 31). Çok çeşitli çalışmalar göstermektedir ki; viral glikoproteinlere bağlanan reseptörlerin geniş bir grubunu integrinler içermektedir. $\beta 1$ integrin, apatojenik olarak nitelendirilen Microtus-kaynaklı hantaviruslarla ilişkili iken, $\beta 3$ integrin ise HFRS ve HPS etkeni olan patojen hantaviruslar ile ilişkilidir (32, 33, 34). Integrinler hücreye girişte rol oynayan tek reseptörler değildir, zira $\beta 3$ integrinden yoksun hücrelerin enfeksiyona izin vermeleri buna en açık göstergedir (35,36). Yapılan çalışmalarla lektin moleküllerinin de hücreye girişte hantaviruslara yardımcı olduğu gösterilmiştir (37). Hantaviruslar polarize haldeki hedef hücrelere apikal ve bazolateral membran yüzeylerinden giriş yapabilirler (38, 39). Örneğin Hantaan virus, kltrin-kaplı kuyucuklarla hücreye giriş yapar ve bunu erken

endozomlar ve ardından gelen geç endozom ya da lizozom formasyonu takip eder (40). Endolizozomal kompartmanlarda virus önce soyulur ve üç ribonükleoprotein (RNP) sitoplazmada serbest hale gelir. Viral RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp), S, M ve L mRNA' larının artmasını sağlayacak şekilde ilk transkripsiyonu başlatır. S ve L mRNA transkriptlerinin translasyonu serbest ribozomlarda gerçekleşirken, M segment transkriptlerinin translasyonu partiküllü endoplazmik retikulumdaki bağlı ribozomlarda gerçekleşir. Hantaviruslarda, N proteini hayati önem taşıyan bir proteindir ve infekte hücre sitoplazmasında en bol bulunan viral proteindir (41). Dahası, yapılan araştırmalar göstermektedir ki, N proteini konukçu immün sistemini değiştirerek virüse savunma yaratmaktadır (41, 42). Glikoprotein öncülü, endoplazmik retikuluma (ER) girerken Gn ve Gc olarak proteolitik olarak işlem görür (43, 44). Gn ve Gc proteinleri ER' de glikozillenerek Golgi kompleksine transfer edilir (45). İlk transkripsiyonu takiben viral polimeraz mekanizmayı transkripsiyondan replikasyona çevirerek S, M ve L genomik RNA' larını çoğaltmayı sağlar. Yeni sentezlenen viral RNA' lar N proteini tarafından RNP formuna enkapside edilirler (46).

Hantaviruslar matris proteinlerine sahip olmadıkları için, N proteini birleşmede anahtar rol oynar. Konfokal mikroskopi kullanılarak yapılan bir çalışmada, N proteininin Hantaan virus ile infekte Vero E6 hücrelerinde, ER, Golgi aygıtı ya da erken endozomda değil, ER-Golgi ara kompartmanında (ERGIC) lokalize olduğu gösterilmiştir (47). Bunyaviridae ailesinin diğer üyelerinden olan Bunyamwera virus ve Uukuniemi viruslarında ise viral proteinler ve virion partikülleri Golgi kompleksinde birikir (48, 49). Bu da ER-Golgi ara kompartmanı ve Golgi aygıtının virus birleşmesinde önemli bir yeri olduğunu göstermektedir. Bir Yeni Dünya hantavirusu olan Black Creek Canal virus (BCCV) üzerinde yapılan çalışmada, birleşmenin plazma membranı üzerinde olduğu gözlenmiştir. Bu da, Yeni Dünya hantaviruslarının, Eski Dünya hantaviruslarının intraselüler birleşmesinden farklı olarak, plazma membranı üzerinde birleşip olgunlaştığı düşüncesini ortaya çıkarmaktadır (50).

2.1.4. Hantavirus Tanısı

2.1.4.1. Seroloji

Birçok virus infeksiyonunda olduğu gibi, hantavirus tanısında da kullanılan birçok yöntem vardır. Hantavirusların tehlikeli doğalarından, yavaş replikasyon süreçlerinden ve hücre kültürlerindeki düşük ve değişken verimlerinden ötürü serolojik yöntemlerde antijen olarak rekombinant hantavirus proteinleri kullanılmaktadır. Baculovirus-eksprese

rekombinant proteinler, E. coli-ekspresye proteinlere göre optimal sensitivite ve spesifite göstermektedir. Zira, Baculovirus-ekspresyon vektör sistemleri; antijen saflaştırmasına ihtiyaç duymadan, büyük miktarda düzgün olarak post-translasyona uğramış (katlanma, disülfid bağları oluşumu, oligomerizasyon, glikozilasyon, açılasyon, proteolitik kesim), biyolojik olarak aktif ve fonksiyonel rekombinant proteinlerin üretilmesini sağlarlar. Fakat yine de serolojik yöntemlerde direkt viral antijenler de kullanılmaktadır (51).

Akut faz hantavirus tanısında, *nested RT-PCR*, IgM ve IgG IFAT ve ELISA, Western Blotlama, Fokus Redüksiyon Nötralizasyon Testi (FRNT) ve Strip İmmunblot yöntemi gibi yöntemler kullanılırken, epidemiyolojik çalışmalarda ise IFAT ve ELISA özellikle yüksek aviditedeki IgG antikorlarını tespit etmeye yönelik kullanılır (7).

2.1.4.1.1. İmmunfloresans Antikor Testi (IFAT)

Serolojik testler içerisinde immunfloresans antikor testi (IFAT) tarihi açıdan en eski yöntemlerden biri olup, hantavirus tanısı için, antijen olarak virus epitoplarını içeren virus ile enfekte hücreleri kullandığı için en duyarlı testlerden biri olarak kabul görülür ve bu sebeple altın standart yöntem olarak adlandırılır (52, 53). Bu sebepten ötürü immunfloresans antikor testi, laboratuvar hayvanlarında hantavirus varlığı taranması amacıyla kullanılmaktadır (54). İmmunfloresans antikor testi, direkt ve indirekt olarak ikiye ayrılır. Direkt IFA antijen tespiti için kullanılır. Bilinmeyen antijen lam üzerine fikse edilir. Şüphelenilen antijene karşı, floresan işaretli, bilinen antikor eklenir. Belirli bir inkübasyon sonrası yıkama yapılır ve floresan mikroskopunda gözlem yapılır. İndirekt IFA ise antikor tespiti için yapılır. Bilinen antijen lam üzerine yayılır. İçinde şüphelenilen antikorlu içeren örnek bu lama uygulanır ve inkübe edilir. Yıkama sonrası floresans işaretli anti-anti Ig'lerle inkübe edilir ve floresan mikroskopta incelenir (55). E6 hücre hattında çoğalmış doğal virusun kullanıldığı indirekt immunfloresans yöntemi, duyarlı ve grup spesifik bir test olması ve hem IgG hem de IgM antikorlarını tespit edebildiği için serolojik yöntemler içinde en çok kullanılan yöntemdir. (52). İndirekt IFA ile yapılan bir çalışmada; Hantaan suş Z10 ve Seoul suş Z39 ile enfekte Vero E6 hücreleri lam üzerine yayılmış ve havada kurutularak asetonla fikse edilmiştir. Antikor yönünden incelenecek olan serum PBS ile seri dilüsyonlara uğratılmış ve lama uygulanarak 30 dak. 37 °C'de inkübe edilmiştir. Lamalar PBS ile yıkanmış ve fluorescein isothiocyanate (FITC)-işaretli tavşan anti-insan IgG ya da rat örnekleri için FITC-işaretli keçi anti-rat IgG ile 30 dak. 37 °C'de inkübe edilmiştir. Örnekler UV ışığı altında incelenmiştir. Sitoplazmik granüllerde floresans görülmesi pozitif olarak yorumlanmıştır (56).

2.1.4.1.2. ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Hantavirus enfeksiyonlarının rutin klinik tanısı, doğal viral antijenler kullanılarak, ya immunfloresans yöntemi ile ya da ELISA ile yapılmaktadır (57). ELISA yöntemi, hem IgM antikorlarını, hem de IgG antikorlarını tespit etmeye yönelik çalışılabilmektedir. Yapılan bir çalışmada ELISA, Sin Nombre N proteinine karşı oluşturulan IgG antikorlarını belirlemek için kullanılmıştır. Belirli bağlı antikor, anti-insan IgG (ağır ve hafif zincirler) peroksidaz-bağlı keçi IgG'si ile belirlenmiştir. Renk, 2,29-azinobis-3-ethylbenzthiozoline sulfonic acid (ABTS) substratı eklenerek gözlenmiştir. 1:100 IgG titresini geçmiş örnekler hantavirus enfeksiyon bulgusu olarak yorumlanmıştır (58). Akut hantavirus hastalarının hızlı tanısı için IgM ELISA yöntemi daha başarılı sonuçlar vermektedir (59). Hantavirusun nükleokapsit proteini, erken insan antikor cevabı için baskın antijenik hedef olduğu için ve yüksek seviyede N-spesifik IgM hastalığın akut fazında üretildiği için, nükleokapsit proteini (Np) ELISA yöntemi için en etkili ve en elverişli proteindir (60).

2.1.4.1.3. Strip Immünblotlama Testi (SIA)

Özellikle Sin Nombre virus (SNV) nükleokapsit (N) antijenine karşı oluşturulan antikorların belirlenmesine yönelik çalışmalarda sıklıkla, ticari bir kit olan SIA kullanılır. Bantlar 4 farklı SN virus antijeni ve Seoul virus için rekombinant nükleokapsit proteini içermektedir. Bu striplere şüphelenilen hasta serumu uygulanmaktadır. Hasta serumunda antikor varsa strip üzerine bağlanmaktadır ve bu bağlı antikorlar *horseradish peroksidaz* bağlı keçi anti-insan ağır ve hafif zincir antikoruyla belirlenmektedir (61, 62, 63). Strip immunoblotlama yöntemi, PUUV ve SNV tanısı için hem duyarlı hem de hızlı bir test olmasına karşın, HTNV ve SEOV enfeksiyonlarının tanısı için duyarlılığı düşüktür (64).

2.1.4.1.4. Western Blotlama (WB)

Western blotlama; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, destek membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metotlarla gösterilmesidir. Blotlamadan önce, çalışılan örnekteki proteinler elektriksel ortamda jel üzerinde göç ettirilmektedir. Proteinlerin elektroforezleri sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jelde (SDS-PAGE) gerçekleştirilir. SDS-PAGE, proteinlerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında kullanılan temel biyokimyasal yöntemlerden biridir (65). Enfekte Vero E6 hücreleri SDS-PAGE kullanılarak ayrımlanmış ve nitrosellüloz membrana aktarılmışlardır.

Escherichia coli' de eksprese edilmiş rekombinant N antijenleri (rN) ile bağışıklanmış olan tavşan serumu belirleyici antikor olarak kullanılmıştır. Böylece membranda tutulmuş olan antijenler belirlenmiştir. Bağlı antikorlar ise HRP-bağlı protein A ve substrat olarak 4-klor-1-naftol ile belirlenmiştir (66).

2.1.4.1.5. Fokus Redüksiyon Nötralizasyon Testi (FRNT)

FRNT; geniş çapta, plak indirgeme nötralizasyon testine alternatif olarak hantavirus nötralizasyon cevap çalışmaları için kullanılır. Çünkü bazı hantaviruslar hücre monolayerlerinde tutarlı plaklar oluşturamazlar (61). Hasta serumu seri dilüsyonlara uğratılır ve eşit miktarlarda hantavirusun ilgili suşunun odak oluşturan ünitesiyle (ffu) karıştırılır ve inkübasyona bırakılır. Bu karışım, hücre kültür plaklarının gözlerine eklenir ve inkübasyona bırakılır. Daha sonra Tavşan anti-hantavirus serumu ve bunu takiben peroksidaz bağlı keçi anti-tavşan IgG eklenir. Substrat ilavesinden sonra gözlem yapılır. Virüs nötralizasyon titresi olarak ise genelde odak numarasının %80 redüksiyonu kabul edilir (22). Daha yüksek duyarlılık ve daha kısa inkübasyon süresi ile avantaj sağlayan kemilüminesans fokus redüksiyon nötralizasyon testi, klasik FRNT' nin önüne geçmektedir. Bu yöntemde, Hantavirusların Vero E6 monolayerinde detekt edilebilir seviyeye ulaşması için, kullanılan hantavirüs türüne bağlı olarak 5-11 gün çoğalma için beklenir. Hücreler metanol ile fikse edilir. Üzerine primer antikor eklenerek inkübe edilir, daha sonra HRP-bağlı sekonder antikor eklenerek inkübe edilir. Kemilüminesans substratın ilavesinden sonra enfekte hücre odakları direkt olarak otoradyografi ile görüntülenebilir (67).

2.1.4.2. Hantavirus Moleküler Tanısı

Hantaviral infeksiyonlarda hızlı tanı çok önemlidir. Özellikle HPS, yüksek vaka ölüm oranları ile hızlı gelişen bir hastalıktır, bu sebepten ötürü, hızlı tanı testlerine olan ihtiyaç açıktır. 12 ile 24 saat arasında, hasta akut ateşli hastalıktan, solunum yetmezliği ve kardiyojenik şok ile gelişen ciddi pnömoniye geçebilir. Bu yüzden hızlı tanı, bu hastalar için esastır. Virus genomunun tesbitine dayanan yüksek duyarlılıktaki tanı testleri geliştirilmiştir. Hastalığın başlangıcından sonraki ilk günden itibaren, kan, serum ya da organ parçaları gibi klinik örneklerden ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi (RT-PZT) ile hantavirus genomu hızlı bir şekilde saptanabilmektedir. Fakat, insan ve rodent doku örneklerindeki viral RNA' nın düşük seviyelerde bulunmasından ötürü, yüksek homolojiye sahip bölgeler için

seçilmiş primerler kullanılarak gerçekleştirilen yuvalanmış-RT-ZT' ye (*nested-RT-PCR*) gerek duyulabilmektedir (4).

2.1.4.2.1. Yuvalanmış Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi (*Nested RT-PCR*)

Hücre kültüründe virus izolasyonu ve poliklonal veya monoklonal antikolarla nötrofillerde ve periferal kan mononükleer hücrelerinde antijen tespiti erken HFRS tanısı için yararlı olarak rapor edilmektedir. Fakat klinik örneklerden hantavirus izolasyonu çoğunlukla zor olmaktadır. En iyi ihtimalle dahi, virusun primer izolasyonu haftalar alabilmektedir. İki ya da üç pasaj ise çoğu durumda gerekli olmakta ve bu kadar uzun süren bir proses, özgülüğü ve duyarlılığı yüksek olmasına karşın, tanısal açıdan değerini yitirmektedir.

Ters-transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi, cins spesifik veya tür spesifik öncüller tasarlanarak, bize tür bazında, hızlı ve güvenilir sonuçlar vermektedir (68). Daha önce de belirtildiği gibi, özellikle HPS gibi hızlı gelişen ve mortalitesi yüksek olan bir hastalık için hızlı tanı, önem teşkil etmektedir. 12 ile 24 saat içerisinde hastanın kliniği ölümcül seviyelere gelebilmekte, bu sebeple de hızlı tanı konması gerekmektedir. Hastalığın başlangıcından sonraki ilk günlerde, kan, serum ya da organ parçaları gibi klinik örneklerde hantavirus genomu ters transkripsiyon PZT ile hızlı bir şekilde tespit edilebilmektedir. Hastada semptomların görüldüğü ilk günden önceki günlerde viral genomun tespit edildiğine yönelik yayınlar bulunmaktadır (69, 70).

Serolojik testlerde görülen hantaviruslar arası çapraz-reaksiyon riski de göz önüne alınınca, infekte hantavirus türünü, o türe spesifik tasarlanan öncüller ve daha sonrasında yapılan sekanslama yöntemi ile güvenilir bir sonuç elde edilmesi önem kazanmaktadır. İnsan ya da rodent doku örneklerinde düşük miktarda viral RNA varlığında ise, yüksek homoloji gösteren bölgeler (genelde S segmentin korunmuş 3' ve 5' bölgeleri) için seçilmiş öncüller kullanılarak gerçekleştirilen ve iki basamakta gerçekleşen yuvalanmış ters transkripsiyon PZT yöntemi gerekmektedir (71, 72, 73).

2.2. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT)

Belli bir DNA dizisini özgün olarak çoğaltmak için kullanılan PZT, Kary Mullis tarafından 1986 yılında keşfedilmiştir. PZT, klonlama yapmaya gerek kalmadan, bir genomdan özgün bir DNA dizisinin çok sayıda kopyasını çıkarma olanağı sağlar. Bu işlem

tamamen in vitro koşullarda DNA sentezidir. PZT, tek iplikli DNA' yı kalıp alan ve deoksiribonükleotitleri substrat olarak kullanan DNA polimeraz enzimi ile gerçekleştirilir. DNA polimeraz, bütün diğer polimerazlar gibi, 5'→3' yönünde sentez yapar ve senteze başlaması için mutlaka serbest 3'-OH grubuna gereksinim duyar. PCR' da kullanılan öncüller oligonükleotitler olup, enzimin senteze başlaması için bu 3'-OH grubunu sağlar. Daha sonra DNA polimeraz, öncüllerin ucuna serbest deoksiribonükleotitleri ekleyerek komplementer DNA ipliğini sentezler. Bu karışım, enzimin verimli çalışması amacıyla en uygun koşulları sağlamak için tampon bir çözeltide, genellikle 20-100 µL hacimde hazırlanır. İki sentetik tek iplikli oligonükleotit olan öncüllerin biri kalıp (*sense* ya da *forward*) olarak kullanılan DNA' dan sentezlenecek olan hedef DNA dizilerinin 5' sınırı, diğeri ise onun komplementeri (*antisens* ya da *reverse*) olan ipliğin 5' sınırındaki nükleotit dizileri ile komplementerdir. Öncüller genellikle, 15-35 nükleotit uzunluğundadır (74).

PZT reaksiyonunda temel üç basamak vardır:

- 1- İlk adımda, çoğaltılacak DNA denatüre edilerek, tek zincirli hale getirilir (90-95 °C' de yaklaşık 5 dakika süreyle).
- 2- Sıcaklık 50 ile 70 °C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA' ya bağlanması sağlanır.
- 3- DNA polimerazın ısıya dayanıklı bir şekli (sıcak su kaynaklarında yaşayan bir bakteriden elde edilenenzim, *Taq polimeraz*) reaksiyon karışımına ilave edilir ve DNA sentezi 70 ile 75 °C arasındaki sıcaklıkta gerçekleşir.

PZT, zincir tepkimesi olarak adlandırılır, çünkü bu üç basamak her defasında tekrarlanır ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılarak DNA zincirlerinin sayısı her defasında iki katına çıkar. Yaklaşık otuzbeş döngü sonra ise DNA miktarı 2^{35} artmış olur. Bu sebeptendir ki, başlangıç DNA miktarı çok az olsa bile, sonucunda elde edilecek DNA miktarı bir milyondan fazla kopya olacaktır. Bu işlem *thermocycler* (ısı döngücüsü) adlı otomatik cihazlarda, döngü sayısı ve sıcaklıkları belirten programlar önceden girilerek gerçekleştirilir.

PZT ile yapılan klonlama işlemi, konakçı hücre ile yapılan klonlamadan daha avantajlıdır. PZT reaksiyonu hızlıdır ve konakçı ile yapılan klonlama işlemi haftalar alırken PZT ile yapılan klonlama birkaç saat içinde tamamlanır. Öncüllerin tasarlanabilmesi ve tepkime koşullarının belirlenebilmesi için hedef DNA' nın nükleotit dizisi hakkında bilgi

sahibi olunmalıdır. Çalışma sırasında tepkime karışımına bulaşabilecek küçük bir kontaminant dahi çalışmayı bozabileceğinden, çok dikkatli çalışılmalıdır (75).

2.2.1. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PCR)

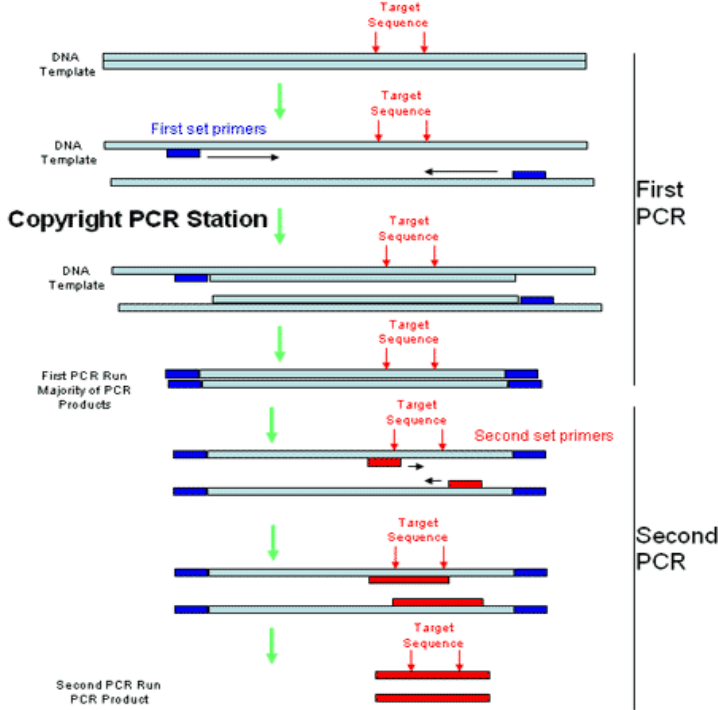
Ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi, PZT' nin bir modifikasyonu olup, PZT amplifikasyonundan önce retroviruslerin ters transkriptazının kullanılması ile viral RNA' nın ya da mesajcı RNA' nın DNA' ya çevrilmesi aşamasını içerir. Hantavirus dizileri, RT-PZT öncülleri olarak, 1993' te New Mexico' nun Four Corners bölgesinde hemorajik pulmoner hastalık salgınına sebep olan etkeni tanımlamak için kullanılmıştır. Çalışma sonucunda ise, hantavirus, enfeksiyon etkeni olarak gösterilmiştir (76).

Ters transkriptaz (RNA-bağımlı DNA polimeraz) iki tür aktiviteye sahiptir: DNA polimeraz aktivitesi ve RNaz H aktivitesi. DNA polimeraz aktivitesinde, viral RNA' yı ya da mRNA' yı kalıp olarak kullanarak DNA sentezi işlevini gerçekleştirir. RNaz H, RNA-DNA hibritlerindeki RNA' yı parçalayan bir ribonükleazdır. Ekzo- ve endonükleaz aktivitesine sahiptir. Ticari olarak en çok kullanılan iki ters transkriptaz enziminden biri tek polipeptid zincirli olup lösemi virüsü (Moloney Murine Leukemia Virus=MMLV), diğeri de iki polipeptid zincirlidir ve Avian Myeloblastosis Virusuna (AMV) aittir. Bu enzimlerin işlevleri sonucunda RNA molekülünden komplementer DNA (cDNA) elde edilir (74). PZT işleminde sadece DNA molekülü kalıp olarak kullanılabilirdiği için, RNA' nın öncelikle cDNA sentez işlemine tabi tutulması gerekmektedir. İçinde; RNA ekstraktı, deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP)' lar, *Random Heksamer* primeri (tasarlanmış primerler de kullanılabilir), RT tamponu (Tris, MgCl₂, KCl) bulunan reaksiyon karışımı RNA linearizasyonunu sağlamak için 95 °C'de 3 dk. bekletilir. Süre sonunda 4 °C'ye soğutulan karışıma RNaz inhibitörü ve Ters Transkriptaz ilave edilerek 37 °C'de 1-2 saat inkübe edilir ve cDNA sentez işlemi gerçekleştirilmiş olur (72).

2.2.2. Yuvalanmış Polimeraz Zincir Tepkimesi (Nested-PZT)

Klasik PZT reaksiyonunda bir çift öncül bulunurken, yuvalanmış PZT reaksiyonunda iki çift öncül kullanılır. Dış öncül çiftleri, DNA' da, hedef bölgenin bulunduğu parçadan daha büyük bir parçayı çoğaltır, iç öncül çiftleri ise, bu parçadan, asıl hedef olan bölgenin çoğaltılmasını sağlar. Yuvalanmış PZT' nin en büyük avantajı, 1. PZT sırasında (dış öncüllerle gerçekleştirilen) çoğaltılan bölge yanlış olsa dahi, 2. PZT sırasında (iç öncüllerle

gerçekleştirilen) hedef bölge mutlaka çoğaltılabilmektedir. Bu sebeple bu yöntem, çok spesifik bir PZT yöntemidir (77). Yöntemin en büyük kısıtlaması ise, tekrarlı bir PZT işlemi gerektirdiği için, kontaminasyon riskinin iki katına çıkmasıdır.



Şekil 4. Yuvalanmış Polimeraz Zincir Tepkimesi Basamakları (77).

2.2.3. Kademeli Sıcaklık Düşürme (*Touchdown*) PZT

Özellikle kompleks genomlarda, hedef bölgenin çoğaltıldığı PZT reaksiyonlarındaki en büyük problemlerden biri, ürün spektrumunda gözlenen spesifik olmayan yalancı bantların varlığıdır. $[Mg^{++}]$ miktarının optimize edilmesi ya da bağlanma sıcaklığının artırılması bu sorunu çözebilir. Ya da bir PZT çözümü olan kademeli azalan PZT (*touchdown* PZT) ile, her bir siklusta $1^{\circ}C$ azaltma ile bağlanma sıcaklığı $65^{\circ}C$ ' den $55^{\circ}C$ ' ye 10 siklus sonra düşecek ve doğru T_m sıcaklığını yakalama ihtimali her siklus için 2 kat, her sıcaklık için ise 4 kat artacaktır. Bu durumda, $5^{\circ}C$ ' lik fark, 4^5 kat avantaj sağlayacaktır. Bu teknikte öncül bağlanma sıcaklıkları ilk önce çok yüksek tutularak öncüllerin spesifik olarak hedef diziyeye bağlanması amaçlanmaktadır (78).

2.2.4. Agaroz Jel Elektrofezi

Agaroz ortalama moleköl ağırlığı 12000 olan doğrusal bir polisakkarittir ve kırmızı bir alg türü olan *Agar agar*’ dan izole edilir. Birbiri ardına gelen galaktoz ve 3,6-anhidrogalaktoz birimleri agarobiyozu (agarobiose), agarobiyoz da agarozu oluşturur. Yüksek sıcaklıklarda suda çözünmesi ve soğutulduğunda bu polimerde çapraz bağların oluşması sonucu jel yapısı oluşur. Agaroz, orta büyüklükte ve büyük DNA moleküllerini elektroforezle ayırmak için en yaygın destek ortamıdır. Ayrıştırılacak moleküllerin büyüklüğüne bağlı olarak genelde %0.3 ile %2.0 agaroz konsantrasyonları kullanılır (Tablo 2).

Tablo 2. DNA molekölünün büyüklüğüne göre agaroz konsantrasyonları (74).

Agaroz Konsantrasyonu (%ağırlık/hacim)	Doğrusal DNA Molekölünün Büyüklüğü (kb)
0.3	5.0-60.0
0.6	1.0-20.0
0.7	0.8-10.0
0.9	0.5-7.0
1.2	0.4-6.0
1.5	0.2-3.0
2.0	0.1-2.0

En çok 50 kb’ a kadar olan nükleik asitler agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılabilir. Agaroz konsantrasyonu ayarlanarak jelde moleküllerin hareket ettiği porların çapı değiştirilebilir. Jelin konsantrasyonu arttıkça porların çapı küçülür. Böylece küçük DNA parçaları için yüksek, büyük DNA parçaları için ise düşük agaroz konsantrasyonları kullanılarak nükleik asitlerin en iyi şekilde ayrılmaları sağlanır.

Agaroz jeller, genellikle floresan bir boya olan etidyum bromür ile boyanır ve UV ışığı altında DNA parçaları görüntülenir. DNA’ nın jelde görünür hale gelmesi, etidyum bromürün DNA’ nın iki zinciri arasına girerek 300 veya 360 nm dalga boyundaki ışığı soğurması sonucu floresan etki göstermesi ile gerçekleşir. Yapısı itibari ile eşleşmiş bir pürin ve pirimidin

bazına benzer ve bu özelliği ile de bir baz analogu olarak hareket edip çift zincirli DNA parçaları arasına kolayca yerleşir (74).

2.3. Hantavirus İnfeksiyonlarından Korunma ve Tedavi

Hantaviruslar, rodentler tarafından taşındığından ötürü, korunmada en etkili yöntem, rodentlerle etkileşimin en aza indirilmesi ile gerçekleştirilebilir. Özellikle açık hava aktivitelerinde, piknik, kamp gibi doğa ile yakın temasla gerçekleştirilen aktivitelerde, yemek ve sular rodentlerin ulaşamayacağı yerlerde tutulmalıdır. Yaşam alanlarının temizlik yönetiminin gerçekleştirilmesi önemlidir. Arazi çalışanlarının ve temizlik işçilerinin ise bu konuda daha dikkatli olmaları gerekmektedir. Zira yerlerin süpürülmesi sırasında yerden kalkan toz partikülleri, hantavirus ile infekte rodent çıkartıları ile bulaşık olabilmekte, bu da inhalasyonla kişiye geçebilmektedir. Özellikle tehlikeli bölgelerde çalışan kişiler mutlaka maske gibi korunma ekipmanları takıp çalışmalıdır.

In vitro çalışmalar ve hayvan denemeleri, hantavirus replikasyonunun ribavirin ve α -interferon tarafından inhibe edildiğini göstermektedir (79; 80). Bu sebepten ötürü ribavirin, hantaviral enfeksiyonların tedavisi için özellikle Çin Halk Cumhuriyeti' nde sıkça kullanılmaktadır. Ribavirin tedavisi sayesinde, HFRS' de mortalite oranında azalma görülmesi ribavirinin tedavi başarısını göstermektedir (81). Hantavirus enfeksiyonları için geliştirilen aşılarda ise ölü virus ve rekombinant DNA teknolojisi ile geliştirilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Yapılan çalışma, girişimsel olmayan deneysel nitelikte bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma, 2010-2013 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırma Türkiye'nin batı bölgelerinden toplanan kemirici örnekleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. İnsan üzerinde bir çalışma yapılmamıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Araştırmada Kırklareli-İğneada bölgesinde kapan tuzaklarla yakalanmış, Hantavirusların potansiyel rezervuarları olan rodentlerin (özellikle *Apodemus flavicollis*, *Apodemus agrarius*, *Apodemus sylvaticus*, *Microtus guentheri* vs.) dokuları kullanılmıştır. Toplamda 90 hayvandan; 48 tanesi *Apodemus flavicollis*, 17 tanesi *Microtus guentheri*, 18 tanesi *Apodemus agrarius*, 5 tanesi *Apodemus sylvaticus* ve 2 tanesi de *Apodemus iconicus*' tur. Dokular Ağustos 2009 tarihlerinde yakalanan hayvanlardan servikal sub lüksasyon ile sakrifiye edilerek alınmıştır. Toplanan organ örnekleri derhal kriyovialler içinde alikotlanarak kuru buzla dolu kutularda laboratuara taşınmış ve işleninceye dek sıvı azot içerisinde (- 196 °C) saklanmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişken: Kemiricilerde Hantavirüs RNA'sının varlığı

Bağımsız değişken: Alandan toplanan kemirici türleri

Kontrol: Enfekte olmadığı bilinen kemirici örnekleri

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan sarf malzemeleri ve cihazlar

- Çözeltilerin hazırlanmasında 18.2MΩ ddH₂O
- Otoklavlamalar 121° C 1 Atm basınç, 15 dakika süreyle yapıldı.

%75' lik Etanol Çözeltisi

% 100 etanol (AppliChem 9Q009845) 75 mL

Distile su ile 100 mL' ye tamamlandı.

%10' luk Etanol Çözeltisi

% 100 etanol (AppliChem 9Q009845) 10 mL

Distile su ile 100 mL' ye tamamlandı.

2 M HNaO (Sodyum Hidroksit) Stok Solüsyonu

HNaO (MERCK B190662921) 4 gr

Distile su ile 50 ml' ye tamamlandı.

8 mm HNaO (Sodyum Hidroksit) Solüsyonu

2 M HNaO stok solüsyonu 0.2 mL

Distile su ile 50 mL' ye tamamlandı.

%10 Etanolde Çözölmüş 0.1 M Sodyum Sitrat

1 M stok sodyum sitrat çözeltisi 5 mL

%10 etanol ile 50 mL' ye tamamlandı.

0,5M Na₂EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) stok solüsyonu

Na₂EDTA (Sigma E5134) 18,6 g

Distile su ile 80 mL' ye tamamlandı.
pH'ı ayarlamak için 100 mM' lık NaOH kullanıldı.
100 mL' ye tamamlandı ve otoklavlandı.
Oda sıcaklığında saklandı.

Tris-Borik asit-EDTA (TBE 5X)

Trizma base (Sigma T1503)	54 g
Borik asit (Sigma B6768)	27,5 g
0,5M Na ₂ EDTA	20 mL

Distile su ile 1000 mL' ye tamamlandı.
Otoklavlandı, oda sıcaklığında saklandı.

Tris-EDTA (TE 1X) pH=8

Tris-HCL (Sigma T5941)	1,576 g
0,5M Na ₂ EDTA	2 mL

Bi-distile su ile 1000 mL' ye tamamlandı.
Otoklavlandı, oda sıcaklığında saklandı.

50x Tris Asetik EDTA- 1000mL

Tris (Sigma T8524)	0,2 M (242gr)
0,5M Na ₂ EDTA, pH 8,0	100 mL
Asetik asit (Merck 100056)	57,1mL

Distile su ile son hacim 1000 mL' ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Etidyum bromit solüsyonu (10 mg/mL)

Etidyum bromit (Sigma E8751)	1g
------------------------------	----

Distile su 100 mL

Alüminyum folyo ile kaplandı, oda sıcaklığında saklandı.

Distile su cihazı: Şimşek Labortechnik SS200

Jel görüntüleme cihazı: VILBER LOURMAT 0519563

Santrifüj cihazı: Heraeus Labofuge 400R

Yatay jel elektroforez cihazı: Thermo Owl Separation System Inc. EC300XL2

PCR Isı Döngü Cihazı: Techne TC-412, Techne TC-3000

Vorteks cihazı: IKA NC 28405

Soğuk-Sıcak İnkübatör Cihazı: MS Major Science MC-01N

Çeker Ocak: Köttermann SystemLabor Typ-2-453-GAND

Sınıf-II Mikrobiyolojik Güvenlik Kabini: B-Bilser TS EN 12469

Kullanılan hazır kitleler

TriPure Isolation Reagent (200 mL)	(Roche 1-667-165)
Taq DNA Polimeraz (rekombinant) (5 u/µL)	(Thermo Scientific #EP0402)
Ribolock RNaz İnhibitörü (20 u/µL)	(Thermo Scientific #R1321)
M-MuLV Reverse Transcriptase (20 u/µL)	(Thermo Scientific #EP0352)
Random Hexamer Primer (0.2 µg/µL)	(Thermo Scientific #S0142)
GeneRuler 50 bp DNA Ladder (0.5 µg/µL)	(Thermo Scientific #SM0371)
GeneRuler 1 kb DNA Ladder (0.1 µg/µL)	(Thermo Scientific #SM0312)

3.6.2. Rodent Dokularından RNA İzolasyonu

Çalışmada, dokulardan RNA izolasyonu, TriPure izolasyon reaktifi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyon, TriPure izolasyon reaktifi (Roche 1-667-165) üretici yönergelerine göre gerçekleştirilmiştir. İzolasyon, reaktifin toksik olması sebebiyle “Köttermann SystemLabor Typ-2-453-GAND” çeker ocakta gerçekleştirilmiştir.

1. Yaklaşık 50 mg doku, bistüri ile kesilip, yine bistüri yardımıyla çok küçük parçalara ayrıldı ve polipropilen santrifüj tüpüne eklendi.
2. Üzerine 1 mL TriPure izolasyon reaktifi eklendi, tüpün ağzı kapatıldı ve tüp nazikçe ters düz edilerek homojenize edildi.
3. Vorteksleme işlemi ile doku iyice eritildi.
4. Partiküllerin çökmesi amacıyla 4 °C’ de 12000 x g’ de 5 dakika santrifüjlendi.
5. Yeni bir polipropilen santrifüj tüpüne süpernatant aktarıldı ve oda sıcaklığında beş dakika bekletildi.
6. Süpernatantın üzerine 0.2 mL kloroform eklendi, tüpün kapağı kapatıldı ve 15 saniye nazikçe ters düz edildi.
7. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
8. Santrifüj tüpleri 4 °C’ de 12000 x g’ de 15 dakika santrifüjlendi. Bu aşamada faz ayrımı gerçekleştirilmiş oldu.
9. En üstte oluşan renksiz sulu faz yeni bir polipropilen santrifüj tüpüne aktarıldı. Kalan ara faz ve alt kırmızı organik faz DNA izolasyonu yapmak için saklandı.
10. Renksiz sulu faz üzerine 0.5 mL izopropanol eklendi, santrifüj tüpünün kapağı kapatıldı ve nazikçe birkaç kere ters düz edildi.
11. RNA çökeltilerinin oluşması amacıyla örnek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
12. 12000 x g’ de 4 °C’ de 10 dakika santrifüjlendi.
13. Süpernatant atıldı.
14. Santrifüj tüpüne % 75 etanolden 1 mL eklendi.
15. Vorteks ile RNA pelleti yıkandı.
16. 7500 x g’ de 4 °C’ de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
17. Etanolün uçması için, oda sıcaklığında, çeker ocak içerisinde, tüplerin ağzı açık yarım saat bekletildi. Çözülebilirliğinin yüksek olması için RNA pelletinin tamamen kurumamasına dikkat edildi.

18. 40 µL ilk defa açılmış “*RNase-free*” injeksiyonluk su ilave edildi ve nazikçe tüpe vurularak RNA’ nın çözülmesi sağlandı.

19. Tüpler cDNA sentezi gerçekleştirilinceye kadar -70 °C dondurucuda saklandı.

3.6.3. cDNA Sentezi

Hantavirus, bir RNA virusu olduğu için öncelikle cDNA sentezi yapıldı. Sentez M-MuLV *Reverse Transcriptase* (20 u/µL) (Thermo Scientific #EP0352) enzim kiti prosedürüne göre yapıldı.

1. RNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve -70 °C dondurucuda saklanan örnekler eritildi ve vortekslendi.
2. Örnekler zamanlı ısıtıcıda (hot-plate) 60 °C’ de 15 dakika RNA’ lar çözünsün diye inkübe edildi.
3. Çözünen RNA’ dan, 10 µL kalıp RNA, 200 µL’ lik PZR tüpüne kondu.
4. 1 µL 10 pmol *Random Hexamer* primeri eklendi.
5. Tüp, ısı döngü cihazında (Techne TC-412) 65°C’ da 5 dakika inkübe edildi ve ardından buz üstüne alınarak soğutuldu.

6. 5x M-MuLV Reaksiyon Tamponu	4 µL
RiboLock <i>RNase</i> İnhibitör	1 µL (20 u/µL)
10 mM dNTP Karışımı	2 µL
M-MuLV <i>Reverse Transcriptase</i> Enzim	2 µL (20 u/µL)

Buz üstüne alınarak soğutulan tüplere yukarıdaki karışım eklendi.

7. 60 dakika 37 °C’ de 1 döngü
5 dakika 25 °C’ de 1 döngü
5 dakika 70 °C’ de 1 döngü
4 °C’ de son saklama

Yukarıdaki programa göre ısı döngü cihazı (Techne TC-412) programlandı ve PZT tepkimesi başlatıldı.

8. Sentezlenen CDNA yuvalanmış PZT tepkimesi uygulanmak üzere -20 °C’ de saklandı.

3.6.4. Dobrava, Saaremaa ve Puumala Hantavirus Taraması İçin Öncül Tasarımı

Hantaviruslar; L (large), M (medium) ve S (small) olarak adlandırılan üç segmentli genomları negatif-iplikli olan RNA viruslarıdır (Plyusnin, A., 1996). S segment, üç segment

içinde en çok korunmuş segment olmasından ötürü (Elliott, R., 1990), öncül tasarımında S segment kullanıldı.

İç içe PZT işlemi uygulanacağı için iç ve dış öncül olmak üzere 2 farklı öncül tasarlandı.

Öncül tasarımı için, *Virus Sequence Database* (http://kcdc.labkm.net/vsd/database/gene_search_1.jsp?orgId=1&reset=1)' den Dobrava, Saaremaa ve Puumala Hantavirus S segment için var olan tüm sekanslar bulundu ve PubMed' den (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) indirildi. Özellikle Trakya yöresine yakın bölgelerin sekansları daha çok dikkate alındı. Tam sekanslar ve kısmi sekanslar, Dobrava, Saaremaa ve Puumala için ayrı ayrı, baz uzunluklarına göre, MEGA 5.05 sürümü ile hizalandı.

Tüm sekanslarda en çok korunmuş bölge baz alınarak dış ileri öncül ve dış geri öncül belirlendi. Belirlenen öncüller PerlPrimer v1.1.20 programı ile kontrol edildi.

3.6.4.1. Dobrava Virus Taraması İçin Öncül Tasarımı

Dobrava virusu için, S segmentte 75. ve 1630. nükleotitler arasında kalan 1556 bp bölgeyi çoğaltacak dış öncüller tasarlandı.

İç öncüller ise, aynı segmentte 380. ve 1010. nükleotitler arasında kalan 631 bp bölgeyi çoğaltacak şekilde tasarlandı ve PerlPrimer v1.1.20 programı ile kontrol edildi.

Primerler

Dobrava Dış İleri Öncül

F: 5' - CAT GAG GGC CAA CTA GTG- 3'

Dobrava Dış Geri Öncül

R: 5' - GAG GTA GTA GTT ATT GAG GTA GTG- 3'

Dobrava İç İleri Öncül

F: 5' - AAC YGC TGA CTG GCT **R**AG- 3'

Dobrava İç Geri Öncül

R: 5' - CAT GCC TGC AAT **R**AA CAG- 3'

Koyu olan bazlar dejenere olarak tasarlandı. Y: C/T, R: A/G.

3.6.4.2. Saaremaa Virus Taraması İçin Öncül Tasarımı

Saaremaa virusu için, S segmentte 35. ve 1644. nükleotitler arasında kalan 1610 bp bölgeyi çoğaltacak dış öncüller tasarlandı.

İç öncüller ise, aynı segmentte 429. ve 906. nükleotitler arasında kalan 478 bp bölgeyi çoğaltacak şekilde tasarlandı ve PerlPrimer v1.1.20 programı ile kontrol edildi.

Primerler

Saaremaa Dış İleri Öncül

F: 5'- AAT GGC AAC ACT AGA GGA- 3'

Saaremaa Dış Geri Öncül

R: 5'-GGA AGC AAA TCA ATG AGG T-3'

Saaremaa İç İleri Öncül

F: 5'-CCA ATA CTC CTR AAG GCT C-3'

Saaremaa İç Geri Öncül

R: 5'-CAT CTA TTG CRT GTT TCC TC-3'

Koyu olan bazlar dejenere olarak tasarlandı. R: A/G.

3.6.4.3. Puumala Virus Taraması İçin Öncül Tasarımı

Puumala virus için, S segmentte 191. ve 1182. nükleotitler arasında kalan 992 bp bölgeyi çoğaltacak dış öncüller tasarlandı.

İç öncüller ise, aynı segmentte 355. ve 1051. nükleotitler arasında kalan 697 bp bölgeyi çoğaltacak şekilde tasarlandı ve PerlPrimer v1.1.20 programı ile kontrol edildi.

Primerler

Puumala Dış İleri Öncül

F: 5'-CAG TGT CAG CAT TGG AGG-3'

Puumala Dış Geri Öncül

R: 5'-AAG CTG TAT TCC CAT TGA CTG-3'

Puumala İç İleri Öncül

F: 5'-AAT GCY ATT GAY ATA GAR GA-3'

Puumala İç Geri Öncül

R: 5'-GAA GAA AGC ACC TAG CTC-3'

Koyu olan bazlar dejenere olarak tasarlandı. Y: C/T, R: A/G.

3.6.5. Liyofilize Dobrava, Saaremaa Ve Puumala Virus Öncüllerinin Sulandırılması

Liyofilize haldeki öncüllerin sulandırılması amacıyla 1X Tris-EDTA (1X TE) kullanıldı. Öncüllerin liyofilize halde bulunduğu tüplere, belirtilen miktarlarda 1X TE eklendi. Öncüllerin her birinden 100 µM stok olarak hazırlandı. Her bir tüp 1 gece 4 °C' de bekletildi ve daha sonra 100 µL olacak şekilde alikotlanarak kullanılmak üzere -20 °C' ye kaldırıldı.

3.6.6. Dobrava, Saaremaa ve Puumala Virus İçin İ İçe Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) Tasarımı

3.6.6.1. Dobrava Virusu İçin İ İçe Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) Tasarımı

Bu bir tarama çalışması olduğu için, polimeraz zincir tepkimesinin daha etkin olabilmesi, böylece hassasiyetin arttırılması amacıyla yuvalanmış ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi uygulandı. Bu amaçla PZT' nin spesifikliği ve hassasiyeti olabildiğince arttırılarak, en küçük miktardaki DNA' nın dahi tespit edilebilmesi sağlandı. Optimizasyon alışmasında 1. PZT üzerinden gidilerek, yuvalanmış PZT hassasiyeti daha fazla arttırılmaya çalışıldı. Tüm tepkimeler 25 L olarak çalışıldı. Optimizasyon çalışmalarında kullanılan pozitif kontrol mililitrede 10^5 virion içermektedir. Denemelerde (+) kontrol olarak, kesin Dobrava virus olduğu bilinen örnek kullanıldı. (-) kontrol olarak ise su kullanıldı.

3.6.6.1.1. MgCl₂ Optimizasyonu

MgCl₂ optimizasyonu için, 0.5 - 1 - 1.5 - 2 - 2.5 mM konsantrasyonlarda MgCl₂ denendi. Optimizasyon çalışmasında (+) ve (-) kontrol olarak 1.5 mM MgCl₂ kullanıldı.

Tablo 3. MgCl₂ optimizasyonu tepkime karışımı konsantrasyon değerleri

Tepkime Bileşenleri	1. Tüp (0.5 mM MgCl ₂)	2. Tüp (1 mM MgCl ₂)	3. Tüp (1.5 mM MgCl ₂)	4. Tüp (2 mM MgCl ₂)	5. Tüp (2.5 mM MgCl ₂)	(+) Kontrol (1.5 mM MgCl ₂)	(-) Kontrol (1.5 mM MgCl ₂)
Deiyonize su	17.75 µL	17.25 µL	16.75 µL	16.25 µL	15.75 µL	16.75 µL	16.75 µL
10X Taq Tamponu (MgSO ₄ 'sız)	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	0.5 µL	1 µL	1.5 µL	2 µL	2.5 µL	1.5 µL	1.5 µL
dNTP (10 mM)	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
Dış ileri öncül (100 µM)	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
Dış geri öncül (100 µM)	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
Taq DNA Polimeraz (5u/µL)	0.25 µL	0.25 µL	0.25 µL	0.25 µL	0.25 µL	0.25 µL	0.25 µL
Pozitif örnek cDNA	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL deiyonize su
Toplam Hacim	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL

Yukarıdaki tabloya göre karışım hazırlandı. Bu tabloya göre 200 µM dNTP, 1.25 U Taq DNA polimeraz ve her biri 50 pmol öncül kullanılmış oldu. Aşağıdaki tepkime koşullarında polimeraz zincir tepkimesi başlatıldı.

Ön denatürasyon; 95 °C' de 5 dakika

35 döngü;

95 °C' de 35 saniye

53 °C' de 40 saniye

72 °C' de 90 saniye

Son Uzama; 72 °C' de 5 dakika

Saklama; 4 °C' de ∞

3.6.6.1.2. cDNA Konsantrasyon Optimizasyonu

Polimeraz zincir tepkimesinin duyarlılığını ölçmek amacıyla cDNA konsantrasyon optimizasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla 2 mM MgCl₂ konsantrasyonunda 1/1.000, 1/2.000, 1/4.000, 1/8.000, 1/10.000, 1/100.000 ve 1/1.000.000 kalıp konsantrasyonu denendi.

Tablo 4. cDNA seyreltme değerleri

Kaynak ('den)	Kalıp (µL)	İnjesiyonluk Su (µL)	Son Konsantrasyon
Kalıp cDNA	1 µL	9 µL	1/10
1/10	1 µL	9 µL	1/100
1/100	1 µL	9 µL	1/1.000
1/1.000	5 µL	5 µL	1/2.000
1/2.000	5 µL	5 µL	1/4.000
1/4.000	5 µL	5 µL	1/8.000
1/1.000	1 µL	9 µL	1/10.000
1/10.000	1 µL	9 µL	1/100.000
1/100.000	1 µL	9 µL	1/1.000.000

Yukarıdaki konsantrasyonlar hazırlandıktan sonra aşağıdaki karışım ile tepkimeye koşullarına göre polimeraz zincir tepkimesi başlatıldı.

Tablo 5. cDNA konsantrasyon optimizasyonu için kullanılan tepkime karışımı

Deiyonize su	16.25 µL
10X Taq Tamponu (MgSO ₄ 'sız)	2.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL
dNTP (10 mM)	0.5 µL
Dış ileri öncül (100 µM)	0.5 µL
Dış geri öncül (100 µM)	0.5 µL
Taq DNA Polimeraz (5u/µL)	0.25 µL
Pozitif örnek cDNA	2.5 µL
Toplam Hacim	25 µL

Ön denatürasyon; 95 °C' de 5 dakika

35 döngü;

95 °C' de 35 saniye

53 °C' de 40 saniye

72 °C' de 90 saniye

Son Uzama; 72 °C' de 5 dakika

Saklama; 4 °C' de ∞

3.6.6.1.3. DMSO (Dimetil Sülfoksit, (CH₃)₂SO) Konsantrasyonu Optimizasyonu

Optimizasyon çalışması sırasında, zaman zaman öncül dimerlerinin oluştuğu gözlemlendi. Bunun engellenmesi amacıyla %2, %5 ve %10 konsantrasyonlarda DMSO kullanıldı.

Tablo 6. DMSO konsantrasyon optimizasyonu tepkime karışımı değerleri

Tepkime Bileşenleri	1. Tüp (%2 DMSO)	2. Tüp (%5 DMSO)	3. Tüp (%10 DMSO)	(-) Kontrol (%2 DMSO)
Deiyonize su	15.75 µL	15 µL	13.75 µL	15.75 µL
10X Taq Tamponu (MgSO ₄ 'sız)	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
dNTP (10 mM)	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
Dış ileri öncül (100 µM)	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
Dış geri öncül (100 µM)	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
DMSO (% 100)	0.5 µL	1.25 µL	2.5 µL	0.5 µL
Taq DNA Polimeraz (5u/µL)	0.25 µL	0.25 µL	0.25 µL	0.25 µL
Pozitif örnek cDNA (1/100.000)	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL
Toplam Hacim	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL

Ön denatürasyon; 95 °C' de 5 dakika

35 döngü;

95 °C' de 35 saniye

53 °C' de 40 saniye

72 °C' de 90 saniye

Son Uzama; 72 °C' de 5 dakika

Saklama; 4 °C' de ∞

3.6.6.1.4. Öncül Konsantrasyonu ve T_m Optimizasyonu

Öncül optimizasyon çalışması için 1 µM (25 pmol) ve 2 µM (50 pmol) konsantrasyonlarında öncüller denendi. Ayrıca T_m açısından da 53 °C ve 57 °C denendi. T_m sıcaklıklarının kararına <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/> sitesinden öncüller ve tepkime karışımı konsantrasyonları girilerek karar verildi. Çıkan T_m sıcaklıklarının 5 °C altındaki sıcaklık olan 57 °C, T_m sıcaklığı olarak seçildi. Çalışmada kalıp olarak ise, duyarlılığı iyice ölçebilmek adına 1/1.000.000 seyreltmede cDNA kullanılmıştır.

Tablo 7. Öncül konsantrasyon optimizasyonu tepkime karışımı

Tepkime Bileşenleri	1. Tüp (25 pmol öncül)	2. Tüp (50 pmol öncül)	(-) Kontrol (50 pmol öncül)
Deiyonize su	16.25 µL	15.75 µL	15.75 µL
10X Taq Tamponu (MgSO ₄ 'sız)	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL	2 µL	2 µL
dNTP (10 mM)	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
Dış ileri öncül (100 µM)	0.25 µL	0.5 µL	0.5 µL
Dış geri öncül (100 µM)	0.25 µL	0.5 µL	0.5 µL
DMSO (% 100)	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
Taq DNA Polimeraz (5u/µL)	0.25 µL	0.25 µL	0.25 µL
Pozitif örnek cDNA (1/1.000.000)	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL
Toplam Hacim	25 µL	25 µL	25 µL

Yukarıdaki tabloya göre karışımlar hazırlandı ve aşağıdaki tepkime koşullarında polimeraz zincir tepkimesi başlatıldı.

- Ön denatürasyon; 95 °C’ de 5 dakika

35 döngü;

95 °C’ de 35 saniye

53 °C’ de 40 saniye

72 °C’ de 90 saniye

Son Uzama; 72 °C’ de 5 dakika

Saklama; 4 °C’ de ∞

- Ön denatürasyon; 95 °C’ de 5 dakika

35 döngü;

95 °C’ de 35 saniye

57 °C’ de 40 saniye

72 °C’ de 90 saniye

Son Uzama; 72 °C’ de 5 dakika

Saklama; 4 °C’ de ∞

3.6.6.1.5. Dobrava İç İçe 2. PZT, Ürün Konsantrasyon Denemesi

1. PZT sonucu oluşan ürün, 2. PZT uygulanmadan önce, seri dilüsyonlara uğratıldı. 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 ve 1/1.000.000 seyreltilen 1. PZT ürünü, 2. PZT’ ye tabi tutuldu. Böylece, 2. PZT reaksiyonunun duyarlılığı ölçüldü.

Tablo 8. 2. PZT için kullanılan 1. PZT ürün konsantrasyon değerleri

Kaynak (‘den)	Kalıp (µL)	İnjesiyonluk Su (µL)	Son Konsantrasyon
1. PZT Ürünü	1 µL	9 µL	1/10
1/10	1 µL	9 µL	1/100
1/100	1 µL	9 µL	1/1.000
1/1.000	1 µL	9 µL	1/10.000
1/10.000	1 µL	9 µL	1/100.000
1/100.000	1 µL	9 µL	1/1.000.000

Yukarıdaki konsantrasyonlarda 1. PZT ürünleri aşağıdaki tepkime karışımı ve tepkime koşullarında 2. polimeraz zincir tepkimesine tabi tutuldu.

Tablo 9. Dobrava 2. PZT tepkime karışımı

Deiyonize su	16.75 µL
10X Taq Tamponu (MgSO ₄ 'sız)	2.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL
dNTP (10 mM)	0.5 µL
Dış ileri öncül (100 µM)	0.25 µL
Dış geri öncül (100 µM)	0.25 µL
Taq DNA Polimeraz (5u/µL)	0.25 µL
1. PZT Ürünü	2.5 µL
Toplam Hacim	25 µL

- Ön denatürasyon; 95 °C' de 4 dakika

10 döngü;

95 °C' de 30 saniye

58 °C' de 30 saniye

72 °C' de 1 dakika

10 döngü;

95 °C' de 30 saniye

56 °C' de 30 saniye

72 °C' de 1 dakika

15 döngü;

95 °C' de 30 saniye

54 °C' de 30 saniye

72 °C' de 1 dakika

Son Uzama; 72 °C' de 5 dakika

Saklama; 4 °C' de ∞

3.6.6.1.6. Dobrava Virus İç İçe 1. PZT ve 2. PZT Tepkime Karışımı ve Tepkime Koşulları

Tablo 10. Dobrava 1. PZT tepkime karışımı

Deiyonize su	16.25 µL
10X Taq Tamponu (MgSO ₄ 'sız)	2.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL
dNTP (10 mM)	0.5 µL
Dış ileri öncül (100 µM)	0.25 µL
Dış geri öncül (100 µM)	0.25 µL
DMSO (%100)	0.5 µL
Taq DNA Polimeraz (5u/µL)	0.25 µL
cDNA	2.5 µL
Toplam Hacim	25 µL

1. PZT için tepkime koşulları;

Ön denatürasyon; 95 °C' de 5 dakika
35 döngü;
95 °C' de 35 saniye
57 °C' de 40 saniye
72 °C' de 90 saniye
Son Uzama; 72 °C' de 5 dakika
Saklama; 4 °C' de ∞

Dobrava 2. PZT için Tablo 9' de verilen tepkime karışımı kullanıldı. Dobrava 2. PZT için tepkime koşulları aşağıda verilmiştir.

2. PZT için, iki öncül arasındaki T_m sıcaklıklarında fark olduğundan ötürü T_m sıcaklığı kademeli azalan PZT (*touch-down* PZT) yapılması uygun görüldü. T_m sıcaklıkları yine, tepkime karışımı konsantrasyonları girilerek <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/> adresinden hesaplandı.

Ön denatürasyon; 95 °C' de 4 dakika
10 döngü;
95 °C' de 30 saniye
58 °C' de 30 saniye

72 °C' de 1 dakika
10 döngü;
95 °C' de 30 saniye
56 °C' de 30 saniye
72 °C' de 1 dakika
15 döngü;
95 °C' de 30 saniye
54 °C' de 30 saniye
72 °C' de 1 dakika
Son Uzama; 72 °C' de 5 dakika
Saklama; 4 °C' de ∞

3.6.6.2. Saaremaa Virus İçin İç İçe Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) Tasarımı

Saaremaa virus tepkime karışımı konsantrasyonları için, Dobrava virus için belirlenen konsantrasyonlar aynen uygulandı.

Saaremaa virus İç İçe Polimeraz Zincir Tepkimesi için T_m ise, <http://eu.idtdna.com/analyser/Applications/OligoAnalyzer/> sitesinde, tepkime karışımı konsantrasyonları ve öncüller tek tek girilerek belirlendi. Tepkime duyarlılığını ve spesifitesini arttırmak amacıyla ise T_m sıcaklığı kademeli azalış gösteren (*touch-down*) PZT seçildi.

3.6.6.2.1. Saaremaa Virus İçin İç İçe 1. PZT Denemesi

Saaremaa virusu için 1. PZT denemesi, Saaremaa pozitif kontrol DNA'sı ile gerçekleştirildi. Bu amaçla, seyreltme yapılmadan, 1/10 ve 1/100 seyreltme yapılarak 1. PZT, aşağıdaki tepkime karışımı ve tepkime koşulları ile uygulandı.

Tablo 11. Saaremaa Virus 1. PZT tepkime karışımı

Deiyonize su	16.75 µL
10X Taq Tamponu (MgSO ₄ 'sız)	2.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL
dNTP (10 mM)	0.5 µL
Dış ileri öncül (100 µM)	0.25 µL
Dış geri öncül (100 µM)	0.25 µL
Taq DNA Polimeraz (5u/µL)	0.25 µL
Saaremaa Pozitif Kontrol cDNA	2.5 µL
Toplam Hacim	25 µL

Tablo 12. Saaremaa pozitif kontrol cDNA seyreltme değerleri

Kaynak ('den)	Kalıp (µL)	İnjesiyonluk Su (µL)	Son Konsantrasyon
Saaremaa Pozitif Kontrol DNA	1 µL	9 µL	1/10
1/10	1 µL	9 µL	1/100

- Ön denatürasyon; 95 °C' de 5 dakika

10 döngü;

95 °C' de 40 saniye

58 °C' de 45 saniye

72 °C' de 2 dakika

10 döngü;

95 °C' de 40 saniye

56 °C' de 45 saniye

72 °C' de 2 dakika

15 döngü;

95 °C' de 40 saniye

54 °C' de 45 saniye

72 °C' de 2 dakika

Son Uzama; 72 °C' de 5 dakika

Saklama; 4 °C' de ∞

3.6.6.2.2. Saaremaa Virus İçin İç İçe 2. PZT Denemesi

Saaremaa virus için 2. PZT denemesi, Saaremaa 1. PZT ürünü ile gerçekleştirildi. Bu amaçla, 1/10 seyreltme yapılarak 1. PZT' si gerçekleştirilen 1. PZT ürünü, 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 ve 1/1.000.000 seyreltme yapılarak 2. PZT, aşağıdaki tepkime karışımı ve tepkime koşulları ile uygulandı.

Tablo 13. Saaremaa virus 2. PZT tepkime karışımı

Deiyonize su	16.75 µL
10X Taq Tamponu (MgSO ₄ 'sız)	2.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL
dNTP (10 mM)	0.5 µL
Dış ileri öncül (100 µM)	0.25 µL
Dış geri öncül (100 µM)	0.25 µL
Taq DNA Polimeraz (5u/µL)	0.25 µL
Saaremaa 1. PZT Ürünü	2.5 µL
Toplam Hacim	25 µL

Tablo 14. Saaremaa 2. PZT için kullanılacak 1. PZT ürün seyreltme değerleri

Kaynak ('den)	Kalıp (µL)	İnjesiyonluk Su (µL)	Son Konsantrasyon
1. PZT Ürünü	1 µL	9 µL	1/10
1/10	1 µL	9 µL	1/100
1/100	1 µL	9 µL	1/1.000
1/1.000	1 µL	9 µL	1/10.000
1/10.000	1 µL	9 µL	1/100.000
1/100.000	1 µL	9 µL	1/1.000.000

- Ön denatürasyon; 95 °C' de 3 dakika

10 döngü;

95 °C' de 30 saniye

58 °C' de 30 saniye

72 °C' de 1 dakika

10 döngü;

95 °C' de 30 saniye

56 °C' de 30 saniye

72 °C' de 1 dakika
15 döngü;
95 °C' de 30 saniye
54 °C' de 30 saniye
72 °C' de 1 dakika
Son Uzama; 72 °C' de 5 dakika
Saklama; 4 °C' de ∞

3.6.6.3. Puumala Virus İçin İç İçe Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) Tasarımı

Puumala virus tepkime karışımı konsantrasyonları için, Dobrava virus için belirlenen konsantrasyonlar aynen uygulandı.

Puumala virus İç İçe Polimeraz Zincir Tepkimesi için T_m , <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/> sitesinde, tepkime karışımı konsantrasyonları ve öncüller tek tek girilerek belirlendi. Tepkime duyarlılığını ve spesifitesini arttırmak amacıyla ise T_m sıcaklığı kademeli azalış gösteren (*touch-down*) PZT seçildi.

Puumala virus 1. PZT denemesi için Puumala pozitif kontrol cDNA' sı kullanıldı. Pozitif kontrol; seyreltilmemiş, 1/10 ve 1/100 seyreltme yapılarak, aşağıdaki tepkime karışımı ve tepkime koşulları ile denendi.

Tablo 15. Puumala Virus 1. PZT tepkime karışımı

Deiyonize su	16.75 µL
10X Taq Tamponu (MgSO ₄ 'sız)	2.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL
dNTP (10 mM)	0.5 µL
Dış ileri öncül (100 µM)	0.25 µL
Dış geri öncül (100 µM)	0.25 µL
Taq DNA Polimeraz (5u/µL)	0.25 µL
Puumala Pozitif Kontrol cDNA	2.5 µL
Toplam Hacim	25 µL

- Ön denatürasyon; 95 °C’ de 5 dakika

10 döngü;

95 °C’ de 35 saniye

58 °C’ de 40 saniye

72 °C’ de 1 dakika

10 döngü;

95 °C’ de 35 saniye

56 °C’ de 40 saniye

72 °C’ de 1 dakika

15 döngü;

95 °C’ de 35 saniye

54 °C’ de 40 saniye

72 °C’ de 1 dakika

Son Uzama; 72 °C’ de 5 dakika

Saklama; 4 °C’ de ∞

2. PZT denemesi içinse, 1. PZT’ leri yukarıdaki koşullara göre gerçekleştirilmiş olan ürünler kalıp olarak kullanılarak aşağıdaki tepkime karışımı ve tepkime koşulları denendi.

Tablo 16. Puumala 2. PZT tepkime karışımı

Deiyonize su	16.75 µL
10X Taq Tamponu (MgSO ₄ ’sız)	2.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL
dNTP (10 mM)	0.5 µL
Dış ileri öncül (100 µM)	0.25 µL
Dış geri öncül (100 µM)	0.25 µL
Taq DNA Polimeraz (5u/µL)	0.25 µL
Puumala 1. PZR Ürünü	2.5 µL
Toplam Hacim	25 µL

- Ön denatürasyon; 95 °C’ de 3 dakika

10 döngü;

95 °C’ de 30 saniye

56 °C’ de 30 saniye

72 °C’ de 1 dakika

10 döngü;

95 °C' de 30 saniye

54 °C' de 30 saniye

72 °C' de 1 dakika

15 döngü;

95 °C' de 30 saniye

52 °C' de 30 saniye

72 °C' de 1 dakika

Son Uzama; 72 °C' de 5 dakika

Saklama; 4 °C' de ∞

Puumala öncül denemesi sırasında, Puumala iç öncül olarak tasarlanan ileri ve geri öncüller çalışmadı. Bu sebeple de dış öncül yuvalanmış PZT' de hem 1. PZT hem de 2. PZT için kullanılarak deneme tekrarlandı. 1. PZT koşulları aynen uygulanırken, 2. PZT için aşağıdaki tepkime koşulları kullanıldı.

Ön denatürasyon; 95 °C' de 5 dakika

10 döngü;

95 °C' de 35 saniye

55 °C' de 40 saniye

72 °C' de 1 dakika

10 döngü;

95 °C' de 35 saniye

53 °C' de 40 saniye

72 °C' de 1 dakika

15 döngü;

95 °C' de 35 saniye

51 °C' de 40 saniye

72 °C' de 1 dakika

Son Uzama; 72 °C' de 5 dakika

Saklama; 4 °C' de ∞

İç öncül T_m koşulları değiştirilerek, 1. PZT ve 2. PZT denemesi tekrarlandı. Yeni tepkime koşulları aşağıdaki gibi ayarlanarak tepkime kuruldu.

Ön denatürasyon; 95 °C' de 3 dakika

10 döngü;

95 °C' de 30 saniye

53 °C' de 30 saniye

72 °C' de 1 dakika

10 döngü;

95 °C' de 30 saniye

51 °C' de 30 saniye

72 °C' de 1 dakika

15 döngü;

95 °C' de 30 saniye

49 °C' de 30 saniye

72 °C' de 1 dakika

Son Uzama; 72 °C' de 5 dakika

Saklama; 4 °C' de ∞

3.6.7. Rodent Dokularının Dobrava Virus Varlığı Açısından Taranması

TriPure izolasyon kitiyle RNA izolasyonu yapılan ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiş olan 1-91 arası (48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 ve 56 numaralı dalak dokuları olmadığı için çalışılmadı) rodent dalak dokularında, optimizasyonu yapılan Dobrava virus İç İçe Polimeraz Zincir Tepkimesi ile Dobrava virus varlığı araştırıldı. Eksik olan dalak dokuları, böbrek dokularından ekstrakte edilerek tamamlandı.

Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha' dan gelen ve hantavirus yönünden seropozitif olduğu bilinen cDNA örnekleri, Dobrava virus İç İçe PZT işlemine tabi tutuldu.

Tarama yapılırken Tablo 10 ve Tablo 9' de verilen tepkime karışımları ve aşağıda verilen tepkime koşulları kullanıldı.

1. PZT için tepkime koşulları;

Ön denatürasyon; 95 °C' de 5 dakika

35 döngü;

95 °C' de 35 saniye

57 °C' de 40 saniye

72 °C' de 90 saniye

Son Uzama; 72 °C' de 5 dakika

Saklama; 4 °C' de ∞

2. PZT için tepkime koşulları;

Ön denatürasyon; 95 °C' de 4 dakika

10 döngü;

95 °C' de 30 saniye

58 °C' de 30 saniye

72 °C' de 1 dakika

10 döngü;

95 °C' de 30 saniye

56 °C' de 30 saniye

72 °C' de 1 dakika

15 döngü;

95 °C' de 30 saniye

54 °C' de 30 saniye

72 °C' de 1 dakika

Son Uzama; 72 °C' de 5 dakika

Saklama; 4 °C' de ∞

3.6.8. Rodent Dokularının Saaremaa Virus Varlığı Açısından Taranması

TriPure izolasyon kitiyle RNA izolasyonu yapılan ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiş olan 1-91 arası (48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 ve 56 numaralı dalak dokuları olmadığı için çalışılmadı) rodent dalak dokularında, optimizasyonu yapılan Saaremaa virus İç İçe Polimeraz Zincir Tepkimesi ile Saaremaa virus varlığı araştırıldı. Eksik olan dalak dokuları, böbrek dokularından ekstrakte edilerek tamamlandı.

Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha' dan gelen ve hantavirus yönünden seropozitif olduğu bilinen cDNA örnekleri, Saaremaa virus İç İçe PZT işlemine tabi tutuldu.

Jel görüntüsünde kuyucukta çöküntü görünen 32, 42, 44, 58, 76, 77, 80, 81, 82, 84 numaralı dalak doku cDNA' ları ½ seyreltilip tekrar PZT işlemine tabi tutuldu.

Tarama sırasında 58. doku örneğinde agaroz jel üzerinde doğru bant büyüklüğünde çok silik bir bant gözlemlendi. Bu sebepten 58. akciğer, dalak ve karaciğer doku örnekleri karışım halinde ve 58 numaralı karaciğer dokusu ayrı olarak RNA izolasyon işlemine tabi tutuldu ve Saaremaa PZT işlemine tabi tutuldu.

26, 39, 40, 42, 44, 45, 46, 47, 56, 80, 81, 90 ve 91 numaralı böbrek dokularında Saaremaa virus tarandı.

Tarama yapılırken Tablo 11 ve Tablo 13' de verilen tepkime karışımları ve aşağıda verilen tepkime koşulları kullanıldı.

1. PZT için tepkime koşulları;

Ön denatürasyon; 95 °C' de 5 dakika

10 döngü;

95 °C' de 40 saniye

58 °C' de 45 saniye

72 °C' de 2 dakika

10 döngü;

95 °C' de 40 saniye

56 °C' de 45 saniye

72 °C' de 2 dakika

15 döngü;

95 °C' de 40 saniye

54 °C' de 45 saniye

72 °C' de 2 dakika

Son Uzama; 72 °C' de 5 dakika

Saklama; 4 °C' de ∞

2. PZT için tepkime koşulları;

Ön denatürasyon; 95 °C' de 3 dakika

10 döngü;

95 °C' de 30 saniye

56 °C' de 30 saniye

72 °C' de 1 dakika

10 döngü;

95 °C' de 30 saniye

54 °C' de 30 saniye

72 °C' de 1 dakika

15 döngü;

95 °C' de 30 saniye

52 °C' de 30 saniye

72 °C' de 1 dakika

Son Uzama; 72 °C' de 5 dakika

Saklama; 4 °C' de ∞

3.6.9. Rodent Dokularının Puumala Virus Varlığı Açısından Taranması

TriPure izolasyon kitiyle RNA izolasyonu yapılan ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiş olan 1-91 arası (48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 ve 56 numaralı dalak dokuları olmadığı için çalışılmadı) rodent dalak dokularında, optimizasyonu yapılan Puumala virus İç İçe Polimeraz Zincir Tepkimesi ile Puumala virus varlığı araştırıldı. Eksik olan dalak dokuları, böbrek dokularından ekstrakte edilerek tamamlandı.

Tarama yapılırken Tablo 15 ve Tablo 16' de verilen tepkime karışımları ve aşağıda verilen tepkime koşulları kullanıldı.

1. PZT için tepkime koşulları;

Ön denatürasyon; 95 °C' de 5 dakika

10 döngü;

95 °C' de 35 saniye

58 °C' de 40 saniye

72 °C' de 1 dakika

10 döngü;

95 °C' de 35 saniye

56 °C' de 40 saniye

72 °C' de 1 dakika

15 döngü;

95 °C' de 35 saniye

54 °C' de 40 saniye

72 °C' de 1 dakika

Son Uzama; 72 °C' de 5 dakika

Saklama; 4 °C' de ∞

2. PZT için tepkime koşulları;

Ön denatürasyon; 95 °C' de 5 dakika

10 döngü;
95 °C' de 35 saniye
55 °C' de 40 saniye
72 °C' de 1 dakika
10 döngü;
95 °C' de 35 saniye
53 °C' de 40 saniye
72 °C' de 1 dakika
15 döngü;
95 °C' de 35 saniye
51 °C' de 40 saniye
72 °C' de 1 dakika
Son Uzama; 72 °C' de 5 dakika
Saklama; 4 °C' de ∞

3.6.10. Agaroz Jel Elektrofrez

3.6.10.1. Agaroz Jel Hazırlanması

Agaroz Low EEO (AppliChem – 4L005628)	1 gr. (% 1 agaroz jel için)
Agaroz Low EEO (AppliChem – 4L005628)	1.5 gr. (% 1.5 agaroz jel için)

100 mL 1 X TAE (ya da 1 X TBE) içinde çözünüp, mikrodalgada tamamen çözününceye kadar arada karıştırılarak çözüldü. Tamamen berrak hale gelince 5 µL safewiev (ya da etidyum bromit solüsyonu) ilave edildi. Ilıklaşan karışım, tarakları yerleştirilen elektrofrez tankına döküldü. Jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkarıldı.

Büyük elektrofrez tankı için 200 ml 1 X TAE (ya da 1 X TBE) içinde 1.5 gr. agaroz tartılıp eklendi ve mikrodalgada arada karıştırılarak tamamen berrak hale gelene kadar çözdürüldü. Tarakları yerleştirilen elektrofrez tankına ılıklaşan karışım döküldü, jel donunca taraklar dikkatli bir şekilde çıkarıldı.

3.6.10.2. Elektrofrez Yüklenmesi ve Yürütme

2 µL yükleme boyası ile 10 µL PZT ürünü, bir parça temiz folyoda karıştırılıp, 10 µL karışan örnek alınıp kuyucuğa dikkatli bir şekilde eklendi. Küçük boyutlu elektrofrez tankı

için 100 Volt'ta 55 dakika, büyük elektroforez tankı içinse 140 Volt'ta 50 dakika olarak ayarlanarak yürütüldü.

3.6.10.3. Jel Görüntüsü Alınması

Elektroforezi tamamlanan jel, görüntü almak üzere VILBER LOURMAT 0519563 marka görüntü cihazına yerleştirilip görüntü alınıp kaydedildi.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Tablo 17. Araştırma planı ve takvimi

	İşin Tanımı	2011											2012											2013					
		MART	NISAN	MAYIS	HAZİRAN	TEMMUZ	AĞUSTOS	EYLÜL	EKİM	KASIM	ARALIK	OCAK	ŞUBAT	MART	NISAN	MAYIS	HAZİRAN	TEMMUZ	AĞUSTOS	EYLÜL	EKİM	KASIM	ARALIK	OCAK	ŞUBAT	MART	NISAN		
1	Literatür Taranması	x	x	x	x	X																							
2	Primer Tasarlanması					x	x																						
3	Dokudan RNA Ekstraksiyonu				x	x	X	X	x	x																			
4	Dokudan DNA Ekstraksiyonu						X	x	X	X	X																		
5	Dobrava PZT Optimizasyonu											x	x	X															
6	Saaremaa PZT Optimizasyonu														x	X													
7	Puumala PZT Optimizasyonu																X												
8	Dobrava Virus Taraması														x	X													
9	Saaremaa Virus Taraması															x	X												
10	Puumala Virus Taraması																	x	x										
11	Tezin Yazılması																				x	x	x	x	x	x	x	x	

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırma sonucu elde edilen veriler, bulgular kısmında açıklanmıştır.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırma sırasındaki sınırlılıklara tartışma kısmında değinilmiştir.

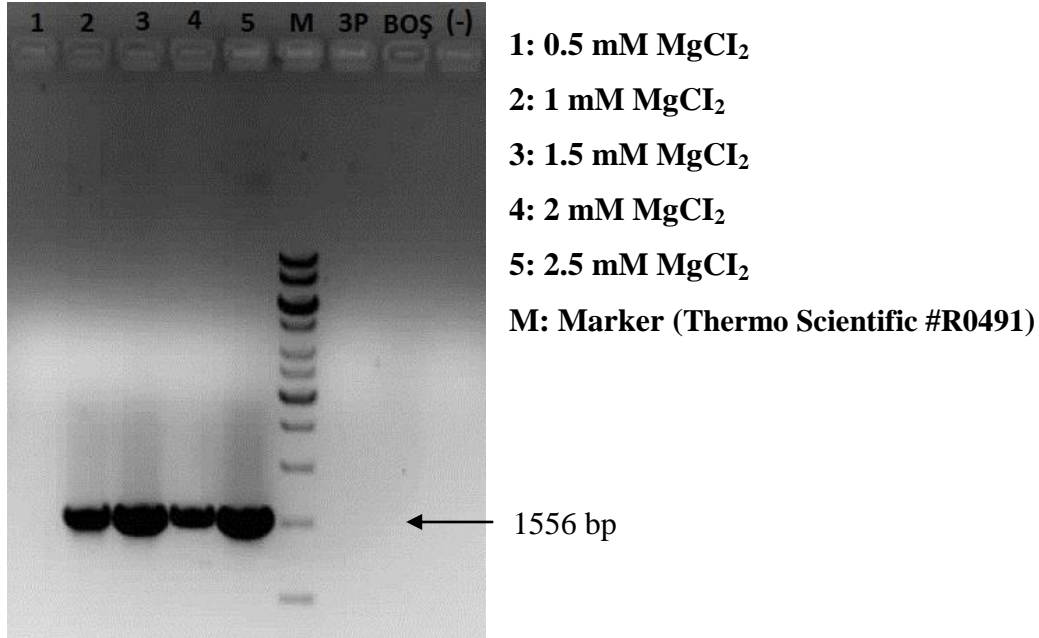
3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Değerlendirme Komisyonu'nun 05.06.2009 ve 22.07.2011 tarihli 41/2009 protokol numaralı kararları, EK-I'de verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Dobrava Virus İç İçe PZT Tasarımı

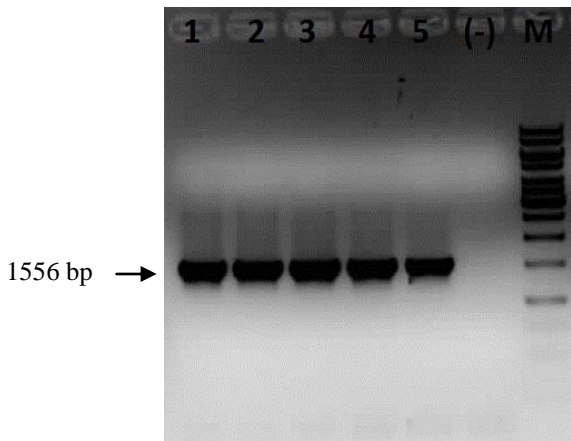
4.1.1. MgCl₂ Optimizasyonu



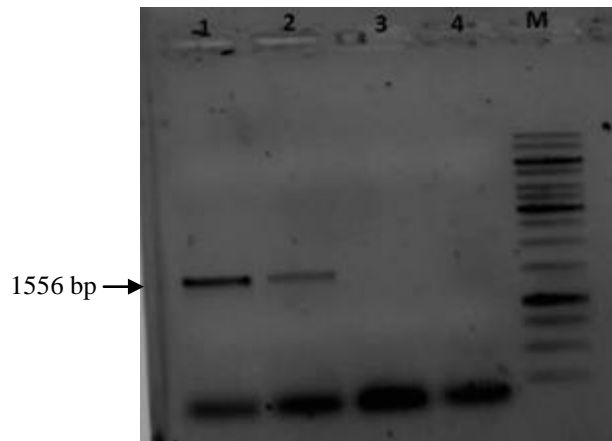
ŞEKİL 5. Dobrava virus MgCl₂ optimizasyon agaroz jel görüntüsü

Ürünler, %1 agaroz jelde, 90 Volt' ta 90 dakika yürütülmüştür. Optimizasyon çalışması sonucu, 2 mM MgCl₂ konsantrasyonu seçilmiştir.

4.1.2. cDNA Konsantrasyon Optimizasyonu



ŞEKİL 6. cDNA konsantrasyon jel görüntüsü (1/1000-1/10.000)



ŞEKİL 7. cDNA konsantrasyon jel görüntüsü (1/10.000-1/1.000.000)

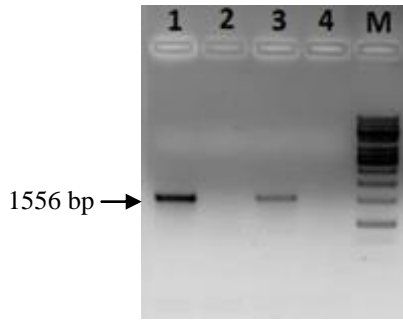
Şekil 6, 1/1.000 ile 1/10.000 arası konsantrasyon ürünlerinin %1 agaroz jel görüntüsüdür. 1: 1/1000, 2: 1/2000, 3: 1/4000, 4: 1/8000, 5: 1/10.000

Şekil 7, 1/10.000 ile 1/1.000.000 arası konsantrasyon ürünlerinin %1 agaroz jel görüntüsüdür. 1: 1/10.000, 2: 1/100.000, 3: 1/1.000.000, 4: (-).

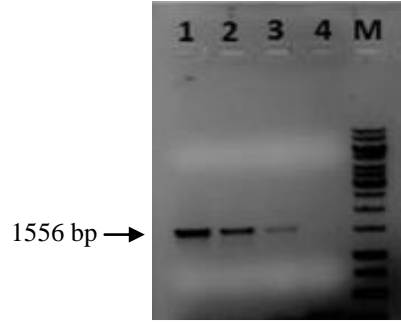
M: Marker (Thermo Scientific #R0491). Ürünler 100 Volt' ta 60 dakika yürütülmüştür.

cDNA konsantrasyon optimizasyonu sonucunda, PZT' nin 1/100.000 seyreltmede cDNA' yı bile tespit edebildiği görülmüştür. Bu da PZT' nin duyarlılığının oldukça yüksek olduğunu gösterir.

4.1.3. DMSO (Dimetil Sülfoksit, (CH₃)₂SO) Konsantrasyonu Optimizasyonu



Şekil 8. %2, %5, %10 DMSO konsantrasyon jel görüntüsü



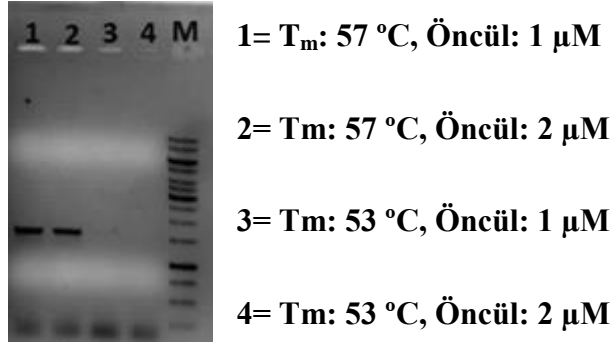
Şekil 9. %2 DMSO konsantrasyon jel görüntüsü

Şekil 8' de 1/100.000 seyreltmede cDNA kullanılmış ve %1 agaroz jelde ürünler yürütülmüştür. Bantlar sırasıyla; 1: %2 DMSO, 2: %10 DMSO, 3: %5 DMSO, 4: (-) göstermektedir. %2 DMSO' da en iyi bant gözleendiği için %2 DMSO sonraki denemeler için seçilmiştir.

Şekil 9' de, değişik konsantrasyonlardaki cDNA kullanılmış, ürünler %1 agaroz jelde yürütülmüş ve 1/1.000.000 seyreltmede dahi bant gözlenmiştir. Bu da, %2 DMSO katkısının, PZT duyarlılığını arttırdığını göstermektedir. Bantlar sırasıyla; 1: 1/100.000, 2: 1/500.000, 3: 1/1.000.000, 4: (-) göstermektedir.

M: Marker (Thermo Scientific #R0491). Ürünler 100 Volt' ta 55 dakika yürütülmüştür.

4.1.4. Öncül Konsantrasyonu ve T_m Optimizasyonu

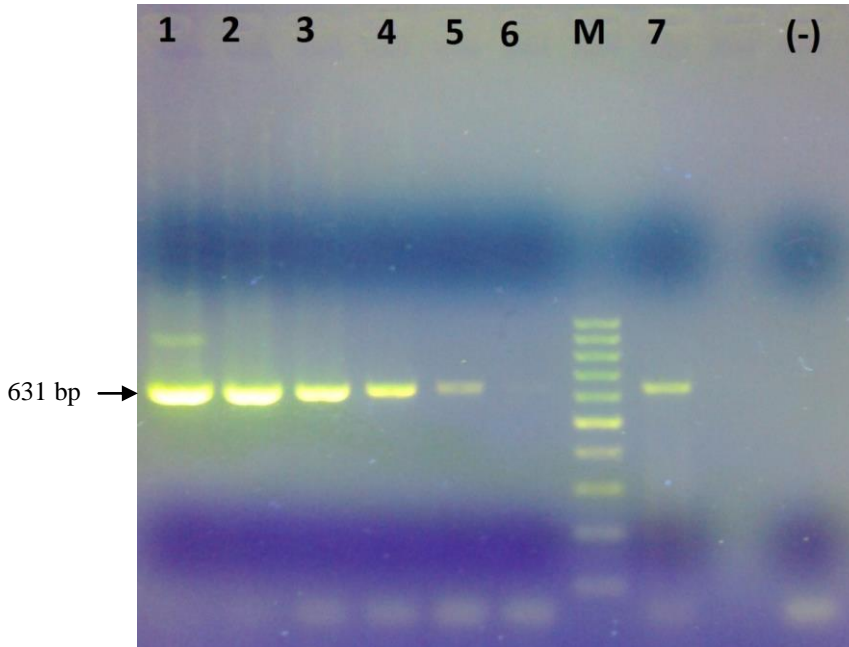


Şekil 10. Öncül ve T_m optimizasyon ürünleri jel görüntüsü

M: Marker (Thermo Scientific #R0491). Ürünler 100 Volt' ta 55 dakika yürütülmüştür.

Çalışma sonucu görülmüştür ki, T_m sıcaklığı olarak 57 °C en uygun sıcaklıktır. Öncül konsantrasyonu olarak ise 1 µM öncül en iyi sonucu vermiştir. Bu yüzden bundan sonraki denemelerde T_m: 57 °C ve 1 µM öncül konsantrasyonu kullanılmıştır.

4.1.5. Dobrava İç İçe 2. PZT, Ürün Konsantrasyon Denemesi



Şekil 11. Dobrava 2. PZT, ürün konsantrasyon denemesi jel görüntüsü

1/500.000 seyreltilmiş cDNA' dan Dobrava 1. PZT' si yapılmış ürünün; 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 ve 1/1.000.000 seyreltmelerde yapılmış 2. PZT ürünleri, %1.5 agaroz jelde, 100 Volt' ta 55 dakika yürütülmüştür.

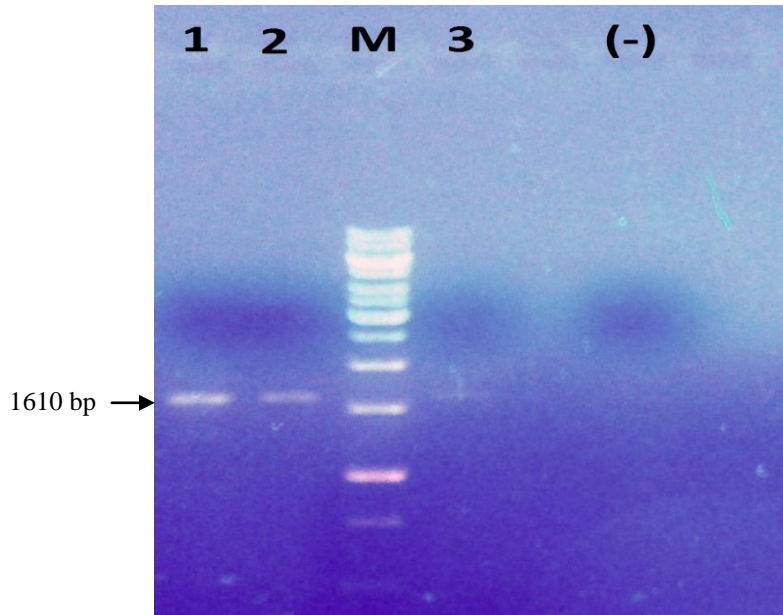
Bantlar sırasıyla; 1: 1/10, 2: 1/100, 3: 1/1.000, 4: 1/10.000, 5: 1/100.000, 6: 1/1.000.000, 7: 1/100.000.

M: Marker (Thermo Scientific #SM0241).

1/1.000.000 seyreltmede bile bant gözlenmesi, 2. PZT' nin duyarlılığının yüksek olduğunu göstermektedir.

4.2. Saaremaa Virus İçin İç İçe PZT Tasarımı

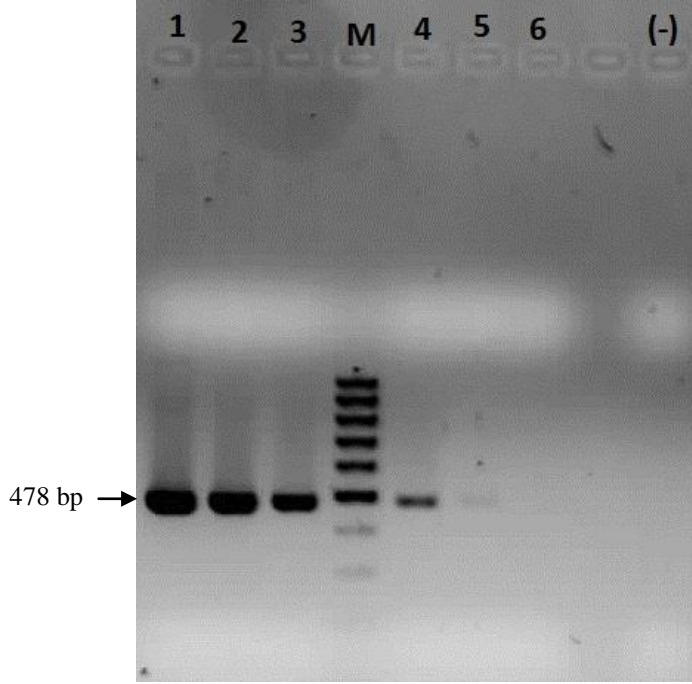
4.2.1. Saaremaa Virus İçin İç İçe 1. PZT Denemesi



Şekil 12. Saaremaa 1. PZT ürün konsantrasyon denemesi jel görüntüsü

Bantlar sırasıyla; 1: Seyreltmesiz, 2: 1/10, 3: 1/100.M: Marker (Thermo Scientific #R0491). Ürünler %1 agaroz jelde, 100 Volt' ta 55 dakika yürütülmüştür.

4.2.2. Saaremaa Virus İçin İç İçe 2. PZT Denemesi



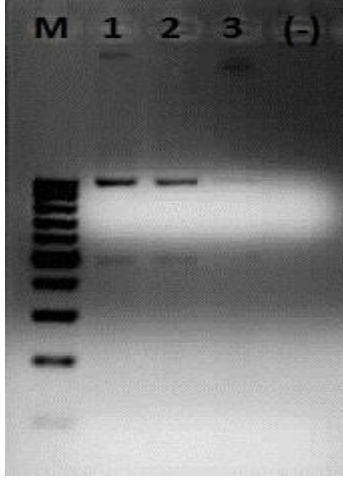
Şekil 13. Saaremaa 2. PZT ürün konsantrasyon denemesi jel görüntüsü

Bantlar sırasıyla; 1: 1/10, 2: 1/100, 3: 1/1.000, 4: 1/10.000, 5: 1/100.000, 6: 1/1.000.000.

1/100.000 seyreltmede bile bant görülmesi, Saaremaa İç İçe PZT' nin duyarlılığının yüksek olduğunu göstermektedir.

M: Marker (Thermo Scientific #SM0241). Ürünler %1.5 agaroz jelde, 100 Volt' ta 55 dakika yürütülmüştür.

4.3. Puumala Virus İç İçe PZT Tasarımı



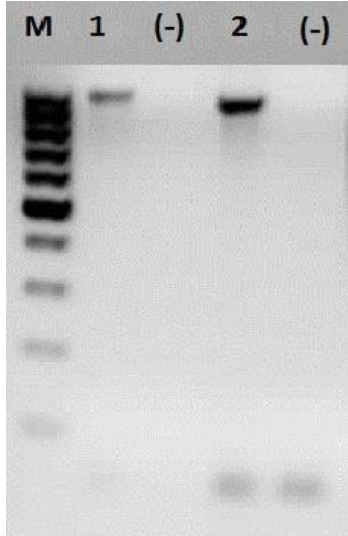
1: Seyreltilmemiş

2: 1/10

3: 1/100

Şekil 14. Puumala 2. PZT ürünleri agaroz jel görüntüsü

1 ve 2. PZT' leri yapılmış, Puumala pozitif kontrol örneklerinin, %1.5 agaroz jelde 100 Volt' ta 55 dakika yürütülmüştür.



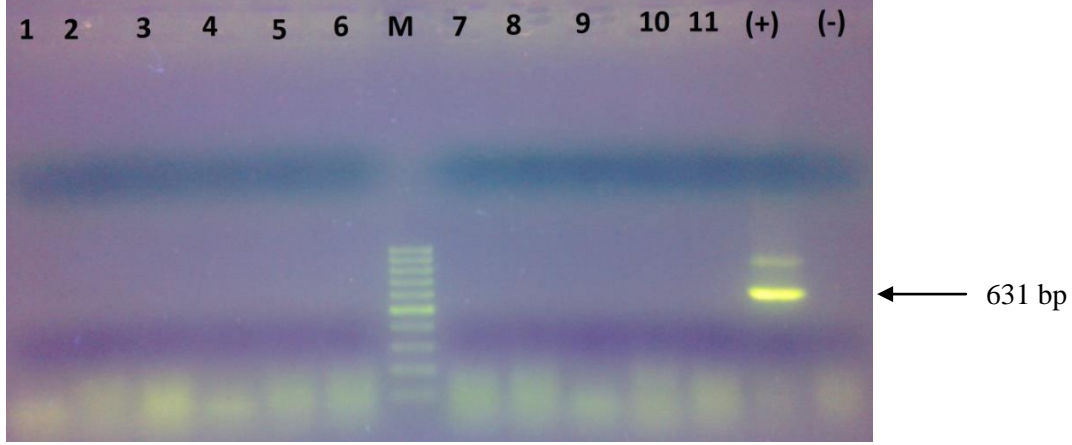
Şekil 15. Puumala 2. PZT optimizasyon ürünleri agaroz jel görüntüsü

1: 1. PZT' si dış öncülle, 2. PZT' si iç öncülle yapıldı. Fakat iç öncül çalışmadığı için 992 bp'da bant gözlemlendi. 2. PZT, iç öncülle ve farklı bir PZT programı (T_m : 53, 51, 49 °C) denenerek gerçekleştirildi.

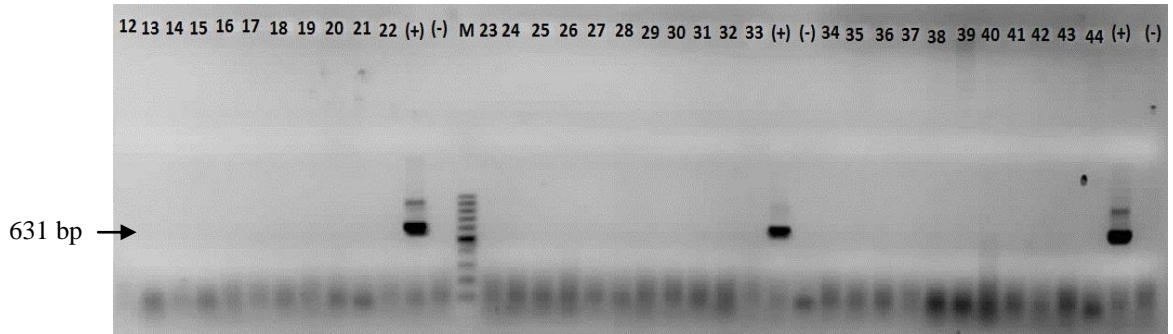
2: 1. PZT'si ve 2. PZT'si dış öncülle yapıldı. Dış öncül, 992 bp' lık bölgeyi çoğaltıyor. Burda da güzel bir şekilde çoğaldığı görüldü. 2 defa 1. PZT yapılmış oldu. T_m : 55, 53, 51 °C.

İç öncül çalışmadığı için Puumala virus açısından tarama çalışmasına dış öncülle yuvalanmış PZT yapılarak devam edildi. Hem 1. Hem de 2. PZT' de aynı öncül kullanıldığı için primer dimerler fazla görüldü. Fakat bu bir tarama çalışması olduğu için buna çok dikkat edilmedi.

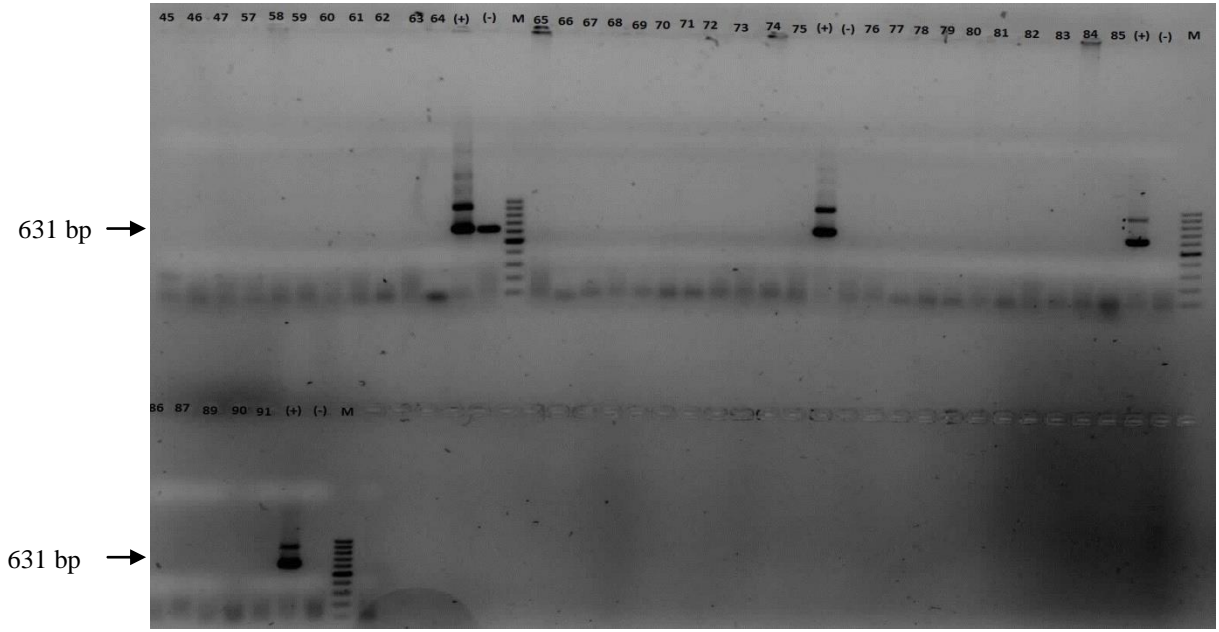
4.4. Rodent Dokularının Dobrava Virus Varlığı Açısından Taranması



Şekil 16. 1-11 arası dalak örneğinin Dobrava virus taraması agaroz jel görüntüsü



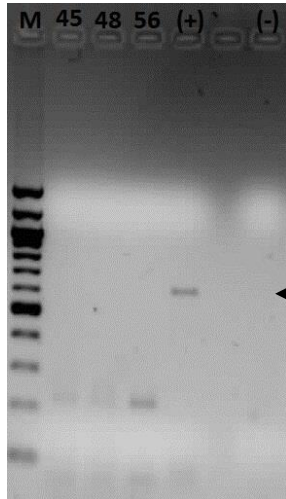
Şekil 17. 12-44 arası dalak örneklerinin Dobrava virus taraması agaroz jel görüntüsü



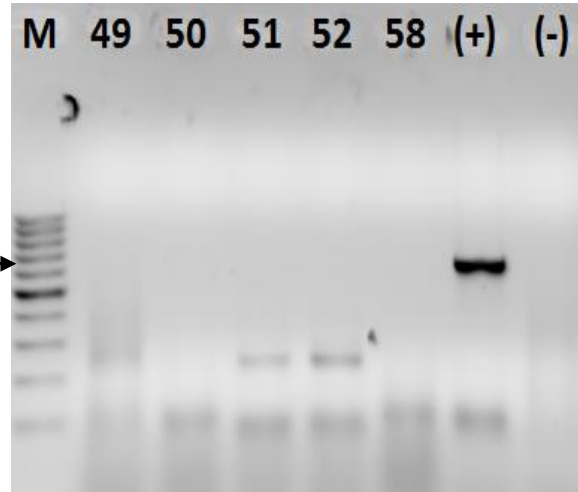
Şekil 18. 44-91 arası dalak örneklerinin Dobrava virus taraması agaroz jel görüntüsü

Ürünler, %1.5 agaroz jelde, 140 Volt' ta 50 dakika yürütülmüştür. Dalak örneklerinde Dobrava virus açısından pozitiflik bulunamamıştır.

M: Marker (Thermo Scientific #SM0241).



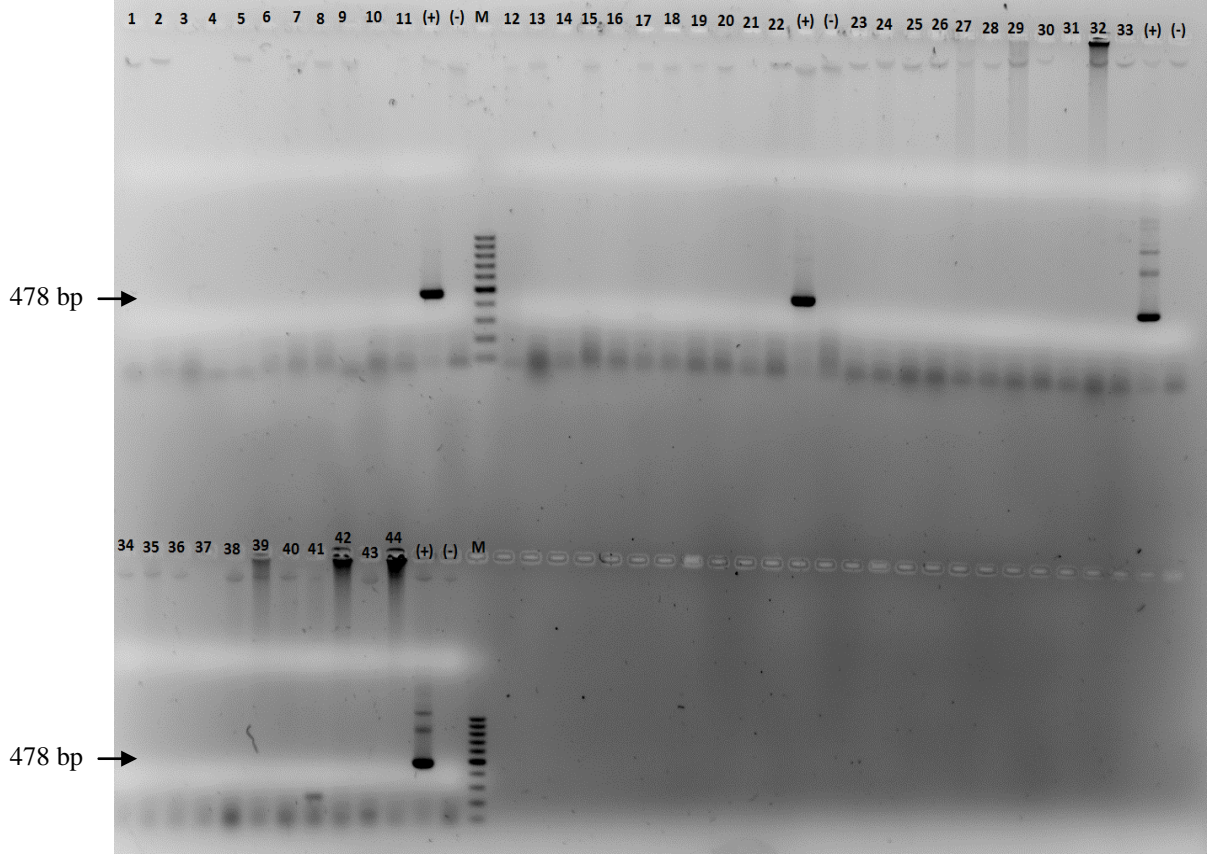
Şekil 19. 44, 48, 56 numaralı böbrek örneklerinin Dobrava virus taraması agaroz jel görüntüsü



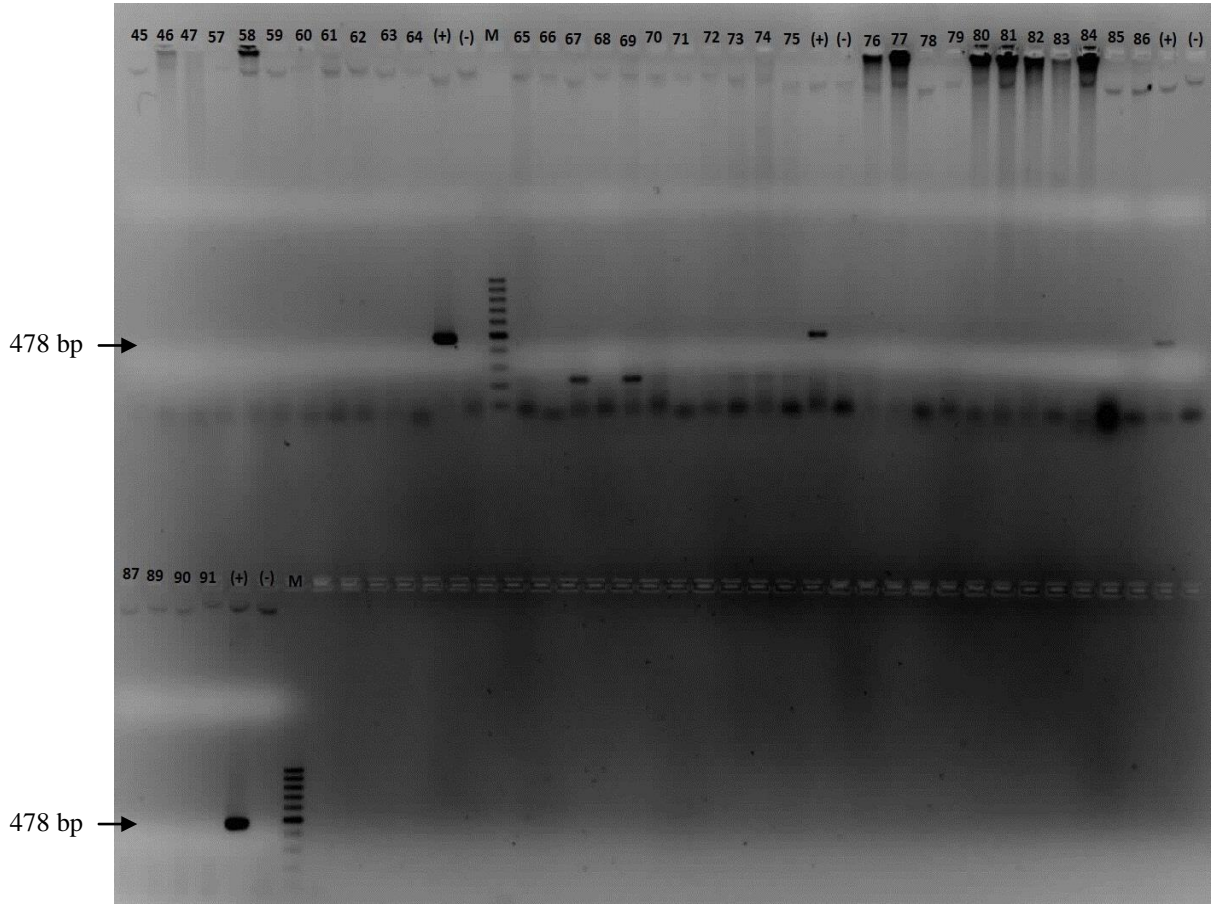
Şekil 20. 49, 50, 51, 52, 58 numaralı böbrek örneklerinin Dobrava virus taraması agaroz jel görüntüsü

Ürünler, %1.5 agaroz jelde, 120 Volt' ta 40 dakika yürütülmüştür. Çalışılan böbrek örneklerinde Dobrava virus açısından pozitiflik bulunamamıştır. M: Marker (Thermo Scientific #SM0241).

4.4. Rodent Dokularının Saaremaa Virus Varlığı Açısından Taranması



Şekil 21. 1-44 arası dalak örneklerinin Saaremaa virus taraması agaroz jel görüntüsü

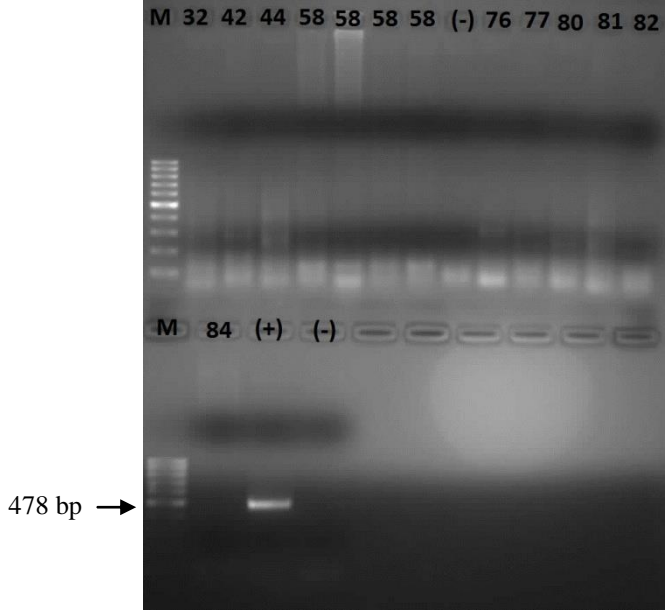


Şekil 22. 45-91 arası dalak örneklerinin Saaremaa virus taraması agaroz jel görüntüsü

Ürünler, %1.5 agaroz jelde, 140 Volt' ta 60 dakika yürütülmüştür. Dalak örneklerinde Saaremaa virus açısından pozitiflik bulunamamıştır.

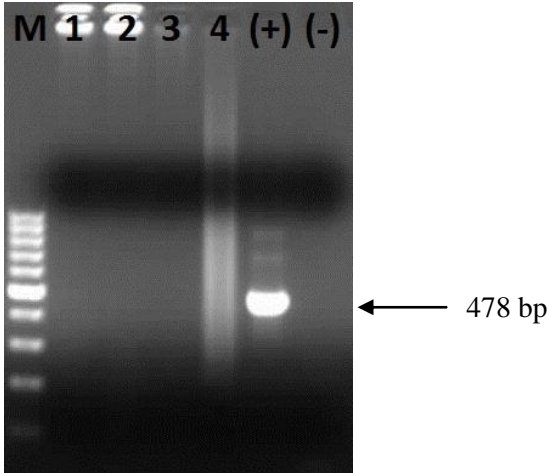
M: Marker (Thermo Scientific #SM0241).

Jel görüntüsünde kuyucukta çöküntü görünen 32, 42, 44, 58, 76, 77, 80, 81, 82, 84 numaralı dalak doku cDNA' ları ½ seyreltilip tekrar PZT işlemine tabi tutuldu. Aşağıda bu ürünlerin jel görüntüsü verilmiştir.



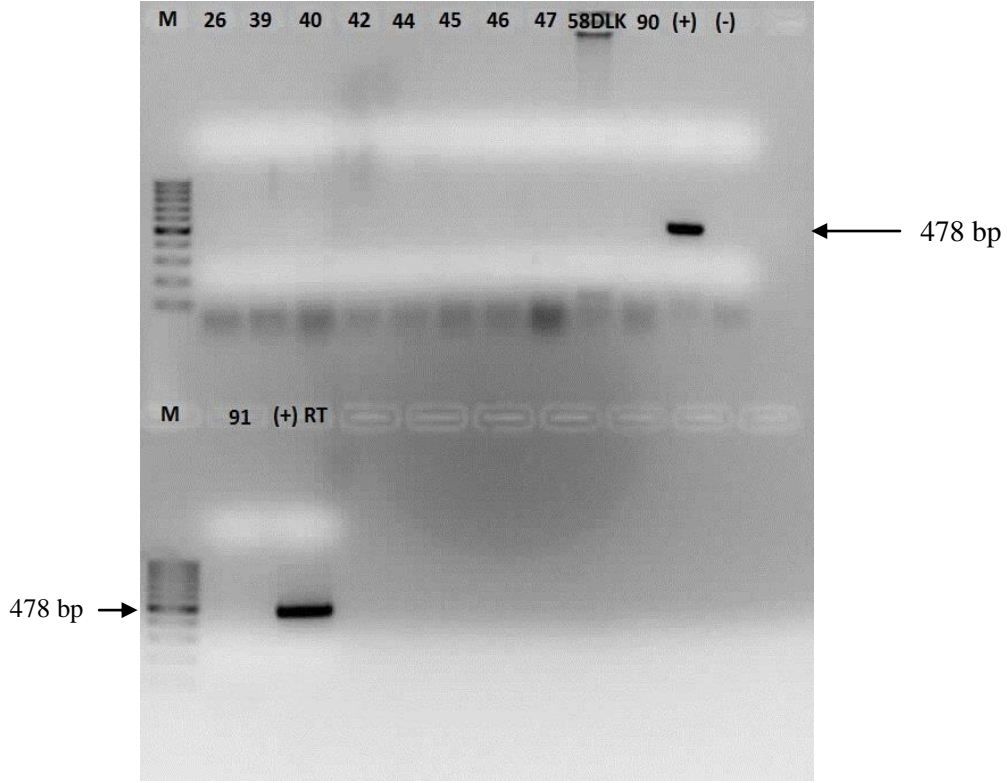
Şekil 23. 32, 42, 44, 58, 76, 77, 80, 81, 82, 84 numaralı dalak örneklerinin Saaremaa virus taraması agaroz jel görüntüsü

Tarama sırasında 58. doku örneğinde agaroz jel üzerinde doğru bant büyüklüğünde çok silik bir bant gözlemlendi. Bu sebepten 58. akciğer, dalak ve karaciğer doku örnekleri karışım halinde (58B) ve 58 numaralı karaciğer dokusu (58K) ayrı olarak RNA izolasyon işlemine tabi tutuldu ve Saaremaa PZT işlemine tabi tutuldu. Aşağıda bu jel görüntüsü verilmiştir.

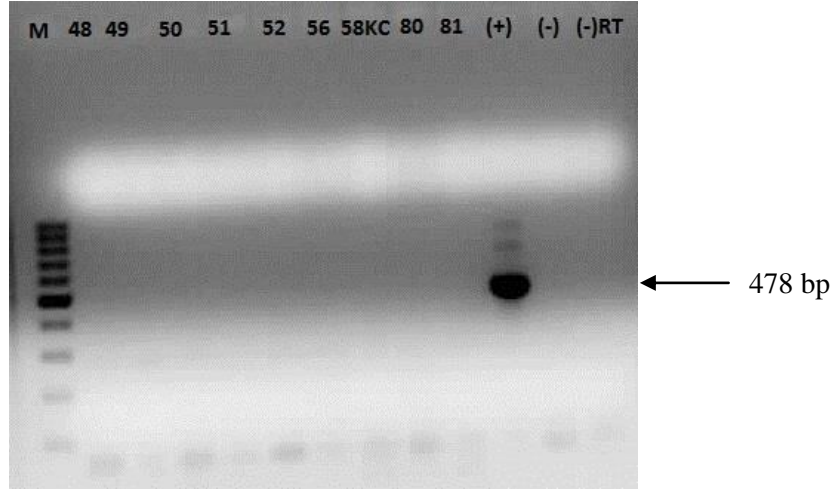


Şekil 24. 58 numaralı *bulk* ve karaciğer örneğinin Saaremaa virus taraması agaroz jel görüntüsü (1-2: 58B), (3-4: 58K)

26, 39, 40, 42, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 56, 80, 81, 90 ve 91 numaralı böbrek dokularında Saaremaa virus tarandı. Agaroz jel görüntüsü aşağıda verilmiştir.



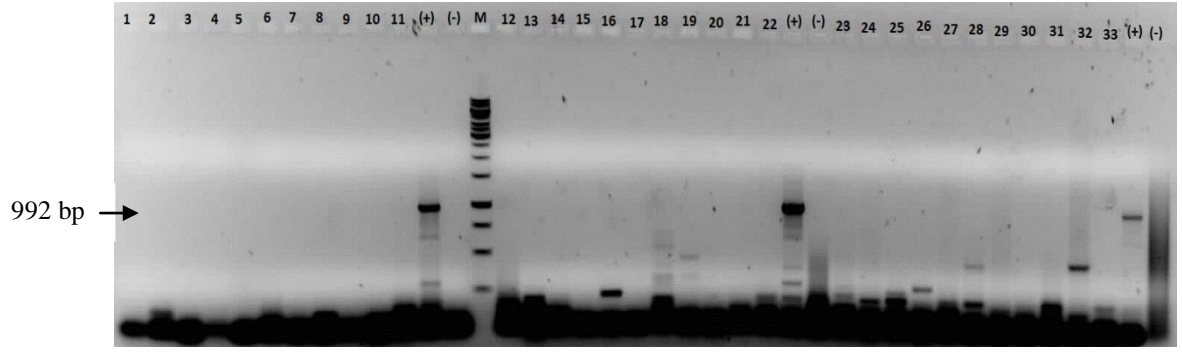
Şekil 25. 26, 39, 40, 42, 44, 45, 46, 47, 90, 91 numaralı böbrek örneklerinin Saaremaa virus taraması agaroz jel görüntüsü



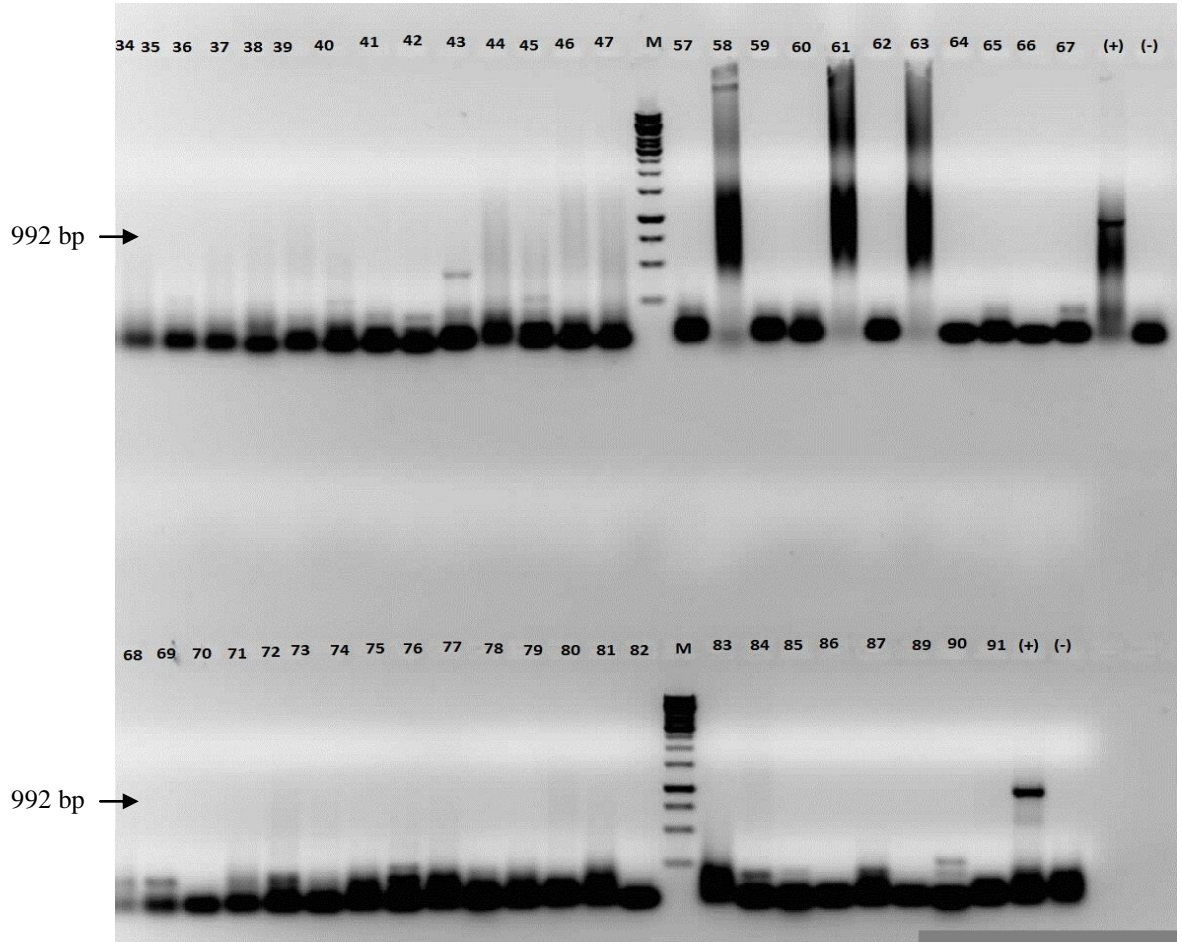
Şekil 26. 48, 49, 50, 51, 52, 56, 80, 81 numaralı böbrek örneklerinin Saaremaa virus taraması agaroz jel görüntüsü

Yapılan tarama çalışması sonucunda hiçbir örnekte Saaremaa pozitif örnek bulunamamıştır.

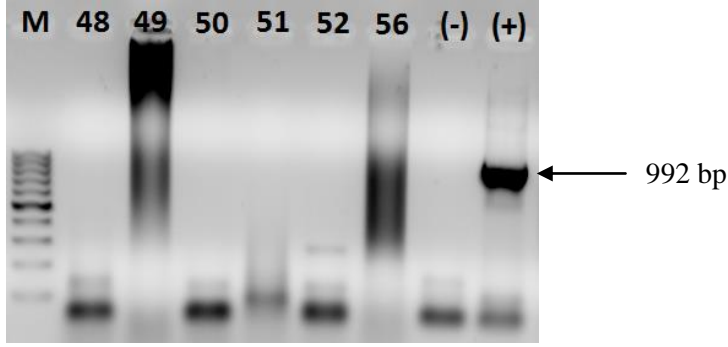
4.5. Rodent Dokularının Puumala Virus Varlığı Açısından Taranması



Şekil 27. 1-33 arası dalak örneklerinin Puumala virus taraması agaroz jel görüntüsü



Şekil 28. 34-91 arası dalak örneklerinin Puumala virus taraması agaroz jel görüntüsü



Şekil 29. 48, 49, 50, 51, 52, 56 numaralı böbrek örneklerinin Puumala virus taraması jel görüntüsü

Tarama sonucu dalak örneklerinde Puumala pozitif sonuç elde edilmemiştir.

M: Marker (Thermo Scientific #R0491). Ürünler %1 agaroz jelde, 140 Volt' ta 50 dakika yürütülmüştür.

4.6. Serolojik Olarak Hantavirus Pozitif Olan Örneklerin Dobrava ve Saaremaa Virus Açısından Taranması



Şekil 30. Serolojik olarak Hantavirus pozitif olan örneklerin Dobrava ve Saaremaa virus taraması agaroz jel görüntüsü

Ürünler %1.5 agaroz jelde, 100 Volt' ta 55 dakika yürütülmüştür.

M: Marker (Thermo Scientific #SM0241).

Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha' dan gelen ve serolojik olarak pozitif olan örneklerde, Dobrava ve Saaremaa İç İçe Ters Transkripsiyon PZT sonucunda herhangi bir pozitiflik bulunamamıştır.

,

5. TARTIŞMA

Çalışmanın temel amacı; klinik olarak önem taşıyan, mortalite ve morbidite oranı yüksek, ciddi bir halk sağlığı sorunu haline gelebilecek olan hantavirus türlerinden Türkiye’de görülme ihtimali yüksek olan Saaremaa, Dobrava ve Puumala viruslarının, bu virusların doğal konukçu olduğu kemiricilerin dokularında gösterilmesidir. Bu amaçla ise, moleküler bir yöntem olan ve bu virüs tanısında literatürlerde en sık karşılaşılan yuvalanmış ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi kullanılmıştır.

Hantaviruslar, doğal konukçuları olan kemirici türlerinde bulunurlar. Bu sebeple çalışmada, uygun yöntemlerle yakalanıp, dokuları alınan kemirici türleri kullanılmıştır. Özellikle Türkiye’deki salgınların Karadeniz bölgesinde daha çok görülmüş olması, salgın açısından potansiyel bir bölge olması ve ormanlık, nemli bir bölge olması da kemirici türlerinin daha yoğun üreyebileceği bir ortamı oluşturmasından ötürü Kırklareli-İğneada bölgesi çalışma için seçilmiştir.

Optimizasyonu gerçekleştirdiğimiz Dobrava, Saaremaa ve Puumala virüs pozitif kontrol suşları, Vero E6 hücre hattından izole edilmiş olup, her bir virüs için hücre kültürü süspansiyonu mililitrede yaklaşık 10^5 Vero E6 hücresi içermektedir. Smajlovic ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, optimizasyon için, yaygın kullanılan hücre hattı olan Vero E6 hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hattı mililitrede yaklaşık 10^3 Vero E6 hücresi içermektedir (82).

Hantaviruslar RNA virusları olduğu ve polimeraz zincir tepkimesi, DNA üzerinden çoğaltma yapabilen bir teknik olmasından ötürü çalışmada ters transkripsiyon basamağı kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda, duyarlılığın artırılması amacıyla iki basamaklı polimeraz zincir tepkimesi kullanılmıştır (83). Bu çalışmada ise, tek basamaklı yapılan polimeraz zincir tepkimesi sonucunda agaroz jel üzerindeki çoğalan DNA’ların verdiği bantlar silik gözlenmiştir. Aynı örneğe ikinci bir polimeraz zincir tepkimesi basamağı uygulanarak iç PZT tekniği ile elde edilen agaroz jel görüntüsünün daha net ve parlak olması, yuvalanmış PZT tekniğinin hantavirusun moleküler tanısında önemini kanıtlamaktadır.

Hantaviruslar, oldukça geniş çeşitliliğe sahip olup, tüm türleri için evrensel kullanılabilir primerlere sahip değildir. Beş Puumala virüs genetik haritasından S ve M segment sekanslarının çoklu dizi analizi, Puumala virusun bilinen hantavirus türleri içerisinde

en çok çeşitliliğe sahip tür olduğu sonucunu desteklemektedir (84). Primer tasarlarken de bu çeşitlilik; Trakya Bölgesi' ne yakın olan bölgelerden GenBank' ten indirilen sekanslarda gözlenmiştir.

Hantavirusları moleküler olarak daha iyi ve daha güvenilir bir şekilde tespit etmek amacıyla, yuvalı ya da yarı-yuvalı öncüller kullanılması yaygın bir durumdur (85). Ayrıca hantaviruslarda bulunan, büyük (L-segment), orta (M-segment) ve küçük (S-segment) segmentlerden en korunmuş segment S segmenti olduğu için, bu segmente göre öncül dizaynı gerçekleştirilmiştir (7). Bu nedenle; Dobrava, Saaremaa ve Puumala için, rodentlerin tarandığı Trakya Bölgesi' ne yakın bölgelerden sekanslar GenBank' ten indirilerek dizilenmiş ve yüksek homoloji gösteren bölgeler öncül olarak seçilmiştir. Dejenere öncüller, öncül bağlanma olasılığını arttırıp, daha fazla hedef çeşitliliği sağladığı için öncül tasarlarken, en az bir nükleotid farklılığı gösteren öncüller için dejenere öncül tasarlanmıştır (86). Önerilen optimal öncül uzunluğu olarak kaynaklarda sıkça 18-24 nükleotid uzunluğu verilmektedir (86). Bu sebepten ötürü öncüller bu aralıkta olacak şekilde tasarlanmıştır. Öncül bağlanmasında öncülün 3' ucu oldukça önemlidir. Eğer 3' ucu hedef sekansa tam uyumlu değilse bağlanma tam olarak gerçekleşmeyebilir, bu da çoğalmayı önler. Bu sebepten ötürü öncül tasarlanmasında 3' ucu tüm kullanılan sekanslarda nükleotid farklılığı göstermemesine dikkat edilmiştir.

PZT optimizasyonunda Mg^{2+} konsantrasyonu olarak 0,5-1-1,5-2 ve 2,5 mM denenmiştir. 0,5 mM konsantrasyon, çoğalma için yetersiz kalmış, diğer konsantrasyonlarda ise görece fark gözlenmemiştir. Yapılan bir çalışmada 1-1,5-2-2,5-3-3,5 ve 4 mM konsantrasyonlarda Mg^{2+} denenmiş ve optimal konsantrasyon olarak 2 ile 2,5 mM arasında fark gözlenmemiştir (82). PZT çalışmalarında Mg^{2+} konsantrasyonu sıklıkla 2 mM olarak önerildiği ve 1-2,5 mM arası konsantrasyonlarda fark gözlenmediği için çalışmalarda 2 mM konsantrasyon kullanılmak üzere seçilmiştir (10).

cDNA konsantrasyon optimizasyonu sonucunda, PZT' nin 1/100.000 seyreltmede cDNA' yı bile tespit edebildiği görülmüştür. Bu da PZT' nin duyarlılığının oldukça yüksek olduğunu gösterir.

Polimeraz zincir tepkimesinde özgülüğü ve ürün verimini arttırmak amacıyla bir takım eklentiler kullanılır. Bu eklentiler arasında %1-10 arası kullanılan DMSO, çalışmamızda verimi arttırıp çoğalan ürün konsantrasyonunu arttırması amacıyla

kullanılmıştır (87). Çalışmamızda %2 DMSO varlığında optimal sonuç alındığı için bu konsantrasyon sonraki çalışmalar için de kullanılmıştır. 1/1.000.000 seyreltmede cDNA varlığında yapılan %2 DMSO konsantrasyonunda dahi bant gözlenmesi, bu konsantrasyonun en optimal konsantrasyon olduğunu göstermektedir.

Öncül konsantrasyonu ve Tm sıcaklığı optimizasyonunda optimum bağlanma sıcaklığı olarak 57 °C, optimum öncül konsantrasyonu olarak ise 1 µM bulunmuştur. Öncül bağlanma bölgesi ve ürün konsantrasyonuna göre değişiklik gösteren Tm sıcaklığı, yapılan farklı sıcaklık denemeleri sonucunda en iyi bant veren sıcaklık olarak seçilmiştir. Optimum öncül konsantrasyonu ise araştırılan yayınlarda denenen öncül konsantrasyonları denenerek bulunmuştur (86).

Ürün konsantrasyon denemesi için, 1. PZT' si yapılan ürünün 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 ve 1/1.000.000 seyreltmelerde yapılan 2. PZT agaroz jel görüntüsü sonucunda 1/1.000.000 seyreltmede bile bant gözlenmesi, 2. PZT' nin duyarlılığının yüksek olduğunu göstermektedir. Smajlovic ve arkadaşlarının yaptığı benzer bir çalışmada, en fazla 1/100 seyreltmede ürün kullanılmış, ona rağmen bizim bulduğumuz gibi kuvvetli bantlar yakalayamamışlardır (82).

Rodent dokularının taranmasında yayınlarda sıklıkla akciğer dokusu kullanılmaktadır (88, 89, 56). Bu çalışmada ise her rodent örneğinin sadece dalak dokularının tam olmasından, akciğer dokularının eksik olmasından ötürü taramada dalak dokusu kullanılmıştır. Pozitif olduğu şüphesi edindiğimiz rodent örneklerinin ise böbrek dokuları da tarama için kullanılmış, fakat böbrek dokularında da pozitif sonuç elde edilememiştir. İleriki çalışmalarda akciğer dokuları da taranacaktır.

Viral RNA oldukça kırılgan bir yapıya sahiptir ve uygun koşullarda muhafaza edilemezse yapısı çok çabuk bozulabilir. Klinik örneklerde veya rodent doku örneklerinde yapılan çoğu çalışmada, ELISA yöntemiyle serolojik olarak pozitif bulunan örneklerin bir kısmı RT-PZT yönteminde negatif bulunmaktadır. Bunun sebebi ise iki şekilde açıklanabilir. Klinik örneklerde, hastaların çok düşük viremilere sahip olması, viral RNA tespitini olanaksız kılmış olabilir. Ya da, viral RNA' nın çok hassas olmasından ötürü, klinik örnek laboratuvara taşınırken uygun koşullarda taşınmamış, bu sebepten de RNA degrades olmuştur. Bu iki olasılık klinik numuneler için geçerlidir. Rodent dokularında ise, rodent virüs tarafından enfekte edilmediği için latent fazda rodentte sürekli kalır. Viremi söz konusu olmadığı için

düşük viremiden ötürü viral RNA' nın tespit edilememesi olasılığı burda geçerli değildir. Bu sebepten dolayı tek bir olasılık vardır ki, o da rodent dokularının uygun koşullarda taşınmamasından ötürü viral RNA' nın degrades olabildiği olasılığıdır. Bu olasılık, hantavirus varlığı açısından taradığım rodent doku örneklerinde hiç pozitif sonuç bulamamamı açıklayabilir.

Yapılan bir çalışmada, 332 Apodemus cinsi rodent western-blot yöntemi ile taranmış ve 20 rodent kuvvetli pozitif veya düşük/şüpheli pozitif bulunmuştur. Bu rodentlere ait akciğer dokuları, moleküler yönden de taranmış ve 20 rodentten sadece altı tanesi (%35) pozitif bulunmuştur (5).

Sanada T. ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, *Mesocricetus auratus* türü laboratuvar hayvan modelini Puumala virüs ile infekte etmişler ve organlarda viral RNA varlığını, kantitatif olarak real-time PCR yöntemiyle izlemişlerdir. İnokulasyondan 8 hafta sonra ise viral yükün en fazla akciğer dokusunda olduğu gözlenmiştir. Bu veri, akciğer dokusunun viral replikasyon için uygun bir bölge olduğunu göstermektedir. Akciğer dokusundan sonra ise; böbrek, dalak ve beyin dokuları da yüksek kopya sayılarında RNA içermektedir. Yapılan başka bir çalışmada, 1 günlük rodentler, Seoul virüs suşuyla inokule edilmiş ve inokulasyondan 3'ten 184 güne kadar akciğer ve böbrek dokularında viral genomun S segmenti nested ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi ile tespit edilebilmiş. Öteki taraftan, 7 haftalık rodentler üzerinde yapılan çalışmada, aynı virüs suşuyla inokule edilmiş 7 haftalık rodentlerde inokulasyondan 3' ten 50 güne kadar viral genom sadece akciğer dokusunda tespit edilebilmiştir (90).

Korva, M. Ve arkadaşlarının yaptığı Dobrava, Puumala ve Saarema viral yükünün dokularda araştırılmasına yönelik bir çalışmada; araziden toplanan toplamda 1081 rodentten (615 *A. flavicollis*, 173 *A. agrarius*, 293 *M. glareolus*) 156 tanesi (89 *A. flavicollis*, 33 *A. agrarius*, 34 *M. glareolus*) en az bir hantavirus antijeni yönünden sero-pozitifdir. Sero-pozitif bulunan rodentler, DOBV ve PUUV varlığı açısından tek-basamaklı gerçek-zamanlı ters-transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi ile viral RNA varlığı için test edilmiştir. 156 örnekten RT-PCR ile hantavirus enfeksiyonu belirlenmiş 14 sero-pozitif rodent (2 yetişkin, 1 juvenil *A. agrarius*, 2 yetişkin, 2 juvenil, 1 immatür *A. flavicollis*, 3 yetişkin, 2 juvenil, 1 immatür *M. glareolus*), ileriki viral yük analizi için seçilmiştir. Toplamda; sidik kesesi hariç test edilen tüm doku örnekleri arasında en yüksek viral yük değeri DOBV tarafından infekte olan *A. flavicollis*' te saptanmıştır. Ayrıca, viral yükteki en yüksek sapma, homojenize edilen

dokularda, 3.33×10^2 ile 2.80×10^{11} kopya/ml aralığındaki değerlerle *A. flavicollis* örneklerinde gözlenmiştir. Sapma en çok dalak ve karaciğer örneklerinde not edilmiştir. Homojenize dokulardaki, PUUV tarafından infekte edilen *M. glareolus* konukçularındaki viral yük 41.6 ile 1.69×10^9 kopya/ml arasında dağılım göstermektedir. En yüksek PUUV viral yükü, bir juvenil hayvanın akciğer dokusunda ölçülmüştür. *M. glareolus* konukçularının örnekleri arasındaki sapma en çok karaciğer örneklerinde not edilmiştir. En düşük viral yük değerleri, homojenize akciğer dokusunda 1.30×10^7 kopya/ml değeri ile SAAV ile infekte olan *A. agrarius* konukçularında saptanmıştır. Homojenize dokudaki 1.28×10^3 kopya/ml ile en düşük SAAV viral yük konsantrasyonu sidik kesesinde ölçülmüştür. DOBV ve PUUV ile karşılaştırıldığında, iç organlar arasındaki SAAV viral yükteki sapma daha düşüktür. Çoğu *A. flavicollis* konukçularında, DOBV için en yüksek viral yük akciğer örneklerinde gösterilmiştir; bunu, kalp ve dalak örnekleri takip etmektedir. Dalak örneklerindeki DOBV viral yükü homojenize dokularda 10^3 ile 10^{11} kopya/ml aralığında değişim göstermekteyken, *A. flavicollis* konukçusunun akciğer ve kalp örneklerinde DOBV viral yükü daha az sapma göstermektedir (homojenize dokuda konsantrasyon 10^4 ile 10^9 kopya/ml aralığında değişim göstermektedir). Tek *M. glareolus* konukçusu içinde, PUUV viral yükü homojenize dokuda 10 ile 10^7 kopya/ml aralığında değişim göstermektedir. En yüksek PUUV konsantrasyonu akciğer örneğinde gösterilmiştir (1.69×10^9 kopya/ml). En tekdüze (uniform) PUUV viral yükü kalp örneklerinde homojenize dokunun 10^5 ile 10^7 kopya/ml aralığında not edilmiştir. *A. agrarius* çalışıldığında, en yüksek SAAV viral yükü böbrek dokularında ölçülmüştür, bunu akciğer ve karaciğer örnekleri takip etmektedir. Homojenize dokuda SAAV viral yükü *A. agrarius* konukçusunda 10^3 ile 10^7 kopya/ml aralığında değişim göstermektedir. Viral yük seviyeleri iki grup arasında karşılaştırıldığı zaman, yeni infekte olmuş rodentlerin (infeksiyondan sonra 1 aydan az), eski infeksiyona göre, test edilmiş iç organlarında hantavirus RNA konsantrasyonu önemli derecede yüksektir. Yani rodentlerin infeksiyon zamanları da viral yük açısından önemlidir. Bu çalışma göstermektedir ki; akciğer, dalak ve böbrek dokuları RNA ekstraksiyonu açısından önerilen dokulardır (91).

Çalışmamızda, Dobrava virüs için 1. PZT tepkimesi optimize edildikten sonra, optimize edilen tepkime karışımı 2. PZT için de kullanılmış, fakat 2. PZT tepkime karışımına DMSO eklentisi yapılmamıştır. Bunun sebebi ise DMSO' nun ikinci PZT tepkimesinde inhibisyona sebep olabileceğidir. Tepkime karışımı aynı şekilde kullanılan prosedürde, 2. PZT için, iki öncül arasındaki Tm sıcaklıklarında fark olduğundan ötürü Tm sıcaklığı kademeli azalan PZT (*touch-down* PZT) yapılması uygun görüldü. Tm sıcaklıkları yine, tepkime

karışımı konsantrasyonları girilerek
<http://eu.idtdna.com/analyser/Applications/OligoAnalyzer/> adresinden hesaplanmıştır.
Saarema ve Puumala virüs PZT tepkimeleri için ise tepkime karışımı, Dobrava virüs için optimize edildiği şekilde kullanılmış ve Dobrava virüs için optimize edilen tepkime karışımının Saarema ve Puumala virüs PZT tepkimelerinde optimal çalıştığı agaroz jel görüntülerinde gözlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hantaviruslar; ilk kez Kore Savaşı sırasında (1950-1953), tozlu siperlerde savaşan askerlerin ölümüyle ortaya çıkmış sonraki patlak ise 1993 yılının ilkbahar ve yazında, New Mexico eyaletinin Four Corners bölgesinde genç ve sağlıklı insanların ölümüne sebep olarak gerçekleşmiştir. Hastalık etmeninin ilk rapor edilmesi ise 1978 yılına kadar beklemiştir. Fakat elbette ki hantaviruslar keşfedilmeden önce de varlardı. Four Corners bölgesindeki Navajo topraklarında 1918 ve 1933 yıllarında kış ılık ve yağışlı geçmiş, bölgedeki yabancı otlar bollaşmış, fare sayısı artmış ve sağlıklı ve genç insanlar arasında açıklanamayan ölümlerin sayısı da artmıştır. 1960' lı yıllara kadar bilinmeyen bir solunum rahatsızlığından ölmüş bulunan hastalardan alınan serumlar yeniden incelendiğinde, hantavirus kaynaklı akciğer hastalığı vakalarının Amerika Birleşik Devletleri' nde on yıllardır nadiren de olsa görüldüğü anlaşıldı. Hantaviruslar, henüz yakın geçmişte tam olarak adlandırılabilmiş, bu sebeple de hantaviruslar üzerinde yapılan araştırmalar tam manasıyla oturmamıştır.

Hantavirusların laboratuvar tanısında sıklıkla serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Serolojik yöntemlerde metotların daha oturmuş olması ve antikör-antijen varlığının tesbit edilmesinin daha güvenilir sonuçlar vermesinden ötürü serolojik yöntemlere güven daha fazladır. Yapılan karşılaştırma çalışmalarında da, serolojik yöntemlerle pozitif çıkan örneklerin birçoğu moleküler yöntemlerle negatif çıkmaktadır.

Hantavirusların moleküler tesbiti için kullandığımız yuvalanmış ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi tamamen her basamağıyla optimize edilmiştir. Bu çalışmada optimize edilen PZT yöntemi, tanısal ve immünolojik ileriki çalışmalarda da kullanılabilir. Dokudan RNA izolasyonu ise izolasyon kitinin üreticisinin yönergelerine göre gerçekleştirilmiştir. Buna rağmen çalışılan hiçbir dokuda pozitifliğe rastlanmamasının bir sebebi, yayınlarda da belirtildiği üzere dokunun uygun yöntemlerle muhafaza edilmemesinden kaynaklanmış olabilir. Zira RNA çok kırılgan bir genetik materyaldir ve çok çabuk bozulabilir. Elbette ki araziden toplanmış ve çalışmada kullanılmış olan tüm kemiricilerin hantavirus yönünden negatif olma ihtimali de bakidir. Hantaviral salgın Türkiye' de de gerçekleşmiş, fakat henüz önemli bir sağlık sorunu haline gelmemiştir.

Araştırılan tüm yayınların gösterdiği üzere, hantavirusların moleküler tanısında genellikle viral yükün daha fazla olmasından ötürü akciğer dokusu kullanılmaktadır. Biz ise çalışmamızda genellikle dalak dokusu, karaciğer ve böbrek dokusu kullandık. Aynı

kemiricilerin akciğer dokularının da kullanılması, pozitif kemirici yakalama ihtimalimizi doğurabilirdi.

7. KAYNAKLAR

1. Bi, Z., Formenty, P, B, H, Roth, C, E. Hantavirus infection: a review and global update. *J. Infect Developing Countries* 2008; 2(1): 3-23.
2. Maftai, I., D., Segall, L., Gatej, R., P., Ceianu, C. ve ark. Hantavirus infection- Hemorrhagic fever with renal syndrome: the first case series reported in Romania and review of the literature. *Int Urol Nephrol* 2011; DOI 10.1007/s11255-011-0013-z
3. Ertek, M., Buzgan, T. An outbreak caused by hantavirus in the black sea region of Turkey, January-May 2009. *Eurosurveillance*, 2009; 14(20): 1-2.
4. Jonsson, C., B., Figueiredo, L., T., M., Vapalahti, O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology and disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2010; 23(2):412-441.
5. Plyusnina, A., Krajinovic, L., C., Margaletic, J., Niemimaa, J., ve ark. Genetic evidence for the presence of two distinct hantaviruses associated with *Apodemus* mice in Croatia and analysis of local strains. *J. Med. Virol.*, 2011; 83:108-114.
6. Sanada, T., Kariwa, H., Nagata, N., Tanikawa, Y., ve ark. Puumala virus infection in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) resembling hantavirus infection in natural rodent hosts. *Virus Research*, 2011; 160: 108-119.
7. Papa, A. Dobrava-Belgrade virus: phylogeny, epidemiology, disease. *Antiviral Research*, 2012; 95: 104-117.
8. Araujo, J., Pereira, A., Nardi, M., S., Henriques, D., A., ve ark. Detection of hantaviruses in Brazilian rodents by SYBR-green based real time RT-PCR. *Arch. Virol.*, 2011; 156: 1269-1274.
9. Plyusnin, A., Vapalahti, O., Vaheri, A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *Journal of General Virology*, 1996; 77: 2677-2687.
10. Johansson, P., Yap, G., Low, H., T., Siew, C., C., ve ark. Molecular characterization of two hantavirus strains from different rattus species in Singapore. *Virology Journal*, 2010; 7: 1-9.
11. Mir, M., A. Hantaviruses. *Clin. Lab. Med.*, 2010; 30: 67-91.
12. Elliott, R., M. Nucleotide sequence analysis of the S RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family Bunyaviridae. *J. Gen. Virol.*, 1989; 173: 426-436.
13. Plyusnin, A., Vapalahti, O., Lankinen, H., Lehvaslaiho, H., ve ark. Tula virus: a newly detected hantavirus carried by European common voles. *Journal of Virology*, 1994; 68: 7833-7838.

14. Yoo, D., Kang, C., Y. Nucleotide sequence of the M segment of the genomic RNA of Hantaan virus 76-118. *Nucleic Acids Research*, 1987; 15: 6299-6300.
15. Chizhikov, V., E., Spiropoulou, C., Morzunov, S., P., Monroe, M., C., ve ark. Complete genetic characterization and analysis of isolation of Sin Nombre virus. *Journal of Virology*, 1995; 69: 8132-8136.
16. Wertz, G., W., Whelan, S., LeGrone, A., Ball, L., A. Extent of terminal complementarity modulates the balance between transcription and replication of vesicular stomatitis virus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1994; 91: 8587-8591.
17. Tiley, L., S., Hagen, M., Matthews, J., T., Kristal, M. Sequence specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequence located at the 5' ends of the viral RNAs. *Journal of Virology*, 1994; 68: 5108-5116.
18. Garcin, D., Lezzi, M., Dobbs, M., Elliott, R., M., ve ark. The 5' ends of hantaan virus (bunyaviridae) RNAs suggest a prime and realign mechanism for the initiation of RNA synthesis. *Journal of Virology*, 1995; 69(9): 5754-5762.
19. Yao, M., Zhang, T., Zhou, T., Zhou, Y., ve ark. Repetitive prime-and-realign mechanism converts short capped RNA leaders into longer ones that may be more suitable for elongation during rice stripe virus transcription initiation. *Journal of General Virology*, 2012; 93: 194-202.
20. Zupang, T., A., Petrovec, M., Furlan, P., Kaps, R., ve ark. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Dolenjska region of Slovenia, a 10-year survey. *CID*, 1999; 28: 860-865.
21. Markotic, A., Nichol, S., T., Kuzman, I., Sanchez, A., J., ve ark. Characteristics of puumala and dobrava infections in Croatia. *Journal of Medical Virology*, 2002; 66: 542-551.
22. Sjölander, K., B., Golovljova, I., Vasilenko, V., Plyusnin, A., ve ark. Serological divergence of dobrava and saaremaa hantaviruses: evidence for two distinct serotypes. *Epidemiol. Infect.*, 2002; 128: 99-103.
23. Scharninghausen, J., J., Meyer, H., Pfeffer, M., Davis, D., S., ve ark. Genetic evidence of dobrava virus in *Apodemus agrarius* in Hungary. *Emerging Infectious Disease*, 1999; 5(3): 468-470.
24. Nemirov, K., Vapalahti, O., Papa, A., Plyusnina, A., ve ark. Genetic characterization of new dobrava hantavirus isolate from Greece. *Journal of Medical Virology*, 2003; 69: 408-416.
25. Asikainen, K., Hanninen, T., Henttonen, H., Niemimaa J., ve ark. Molecular evolution of puumala hantavirus in Fennoscandia: phylogenetic analysis of strains from two recolonization routes, Karelia and Denmark. *Journal of General Virology*, 2000, 81: 2833-2841.
26. Vapalahti, O., Mustonen, J., Lundkavist, A., Henttonen, H., ve ark. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect. Dis.*, 2003; 3: 653-661.
27. Heyman, P., Cochez, C., Korukluoğlu, G., Gözalan, A., ve ark. Bridging continents; hantaviruses of Europe and Asia Minor. *Turk Hij. Den. Biyol. Derg.*, 2011; 68(1): 41-48.

28. Oncul, O., Atalay, Y., Onem, Y., Turhan, V., ve ark. Hantavirus infection in Istanbul, Turkey. *Emerging Infectious Diseases*, 2011; 17(2): 303-304.
29. Kaya, S., Yılmaz, G., Erensoy, Ş., Yağcı, D., ve ark. Doğu karadeniz, Giresun ilinde tespit edilen iki hantavirus enfeksiyonu olgusu. *Mikrobiyol Bul.*, 2010; 44: 479-487.
30. Zaki, S., R., Greer, P., W., Coffield, L., M., Goldsmith, C., S., ve ark. Hantavirus pulmonary syndrome: pathogenesis of an emerging infectious disease. *American Journal of Pathology*, 1995; 146(3): 552-579.
31. Raftery, M., J., Kraus, A., A., Ulrich, R., Krüger, D., H., ve ark. Hantavirus infection of dendritic cells. *J. Virol.*, 2002; 76(21): 10724-10733.
32. Gavrillovskaya, I., N., Brown, E., J., Gingsberg, M., H., Mackow, E., R. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by $\beta 3$ integrins. *J. Virol.*, 1999; 73(5): 3951-3959.
33. Gavrillovskaya, I., N., Shepley, M., Shaw, R., Gingsberg, M., H., ve ark. $\beta 3$ integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 7074-7079.
34. Larson, R., S., Brown, D., C., Ye, C., Hjelle, B. Peptide antagonists that inhibit Sin Nombre virus and Hantaan virus entry through the $\beta 3$ -integrin receptor. *Journal of Virology*, 2005; 79(12): 7319-7326.
35. Mou, D., L., Wang, Y., P., Huang, C., X., Li, G., Y., ve ark. Cellular entry of hantaan virus A9 strain: specific interactions with $\beta 3$ integrins and a novel 70 kDa protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006; 339: 611-617.
36. Song, J., W., Song, K., J., Baek, L., J., Frost, B., ve ark. *In vivo* characterization of the integrin $\beta 3$ as a receptor for Hantaan virus cellular entry. *Experimental and Molecular Medicine*, 2005; 37(2): 121-127.
37. Ogino, M., Yoshimatsu, K., Ebilhara, H., Arikawa, J. *N*-acetylgalactosamine (GalNAc)-specific lectins mediate enhancement of Hantaan virus infection. *Arch Virol*, 1999; 144: 1765-1777.
38. Ravkov, E., V., Nichol, S., T., Compans, R., W. Polarized entry and release in epithelial cells of black creek canal virus, a new world hantavirus. *Journal of Virology*, 1997; 71(2): 1147-1154.
39. Rowe, R., K., Pekosz, A. Bidirectional virus secretion and nonciliated cell tropism following andes virus infection of primary airway epithelial cell cultures. *Journal of Virology*, 2006; 80(3): 1087-1097.
40. Jin, M., Park, J., Lee, S., Park, B., ve ark. Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Virology*, 2002; 294: 60-69.

41. Taylor, S., L., Staheli, N., F., Sastre, A., G., Schmaljohn, C., S. Hantaan virus nucleocapsid protein binds to importin proteins and inhibits tumor necrosis factor alpha induced activation of nuclear factor kappa b. *Journal of Virology*, 2009; 83(3): 1271-1279.
42. Taylor, S., L., Krempel, R., L., Schmaljohn, C., S. Inhibition of tnf- α -induced activation of NF- κ B by hantavirus nucleocapsid proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2009; 1171: 86-93.
43. Ruusala, A., Persson, R., Schmaljohn, C., S., Pettersson, R., F. Coexpression of the membrane glycoproteins G1 and G2 of Hantaan virus is required for targeting to the Golgi complex. *Virology*, 1992;186: 53–64.
44. Spiropoulou, C. F. Hantavirus maturation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2001; 256: 33–46.
45. Overby, A., K., Popov, V., L., Pettersson, R., F., Neve, E., P., A. The cytoplasmic tails of uukuniemi virus (*bunyaviridae*) Gn and Gc glycoproteins are important for intracellular targeting and the budding of virus-like particles. *Journal of Virology*, 2007; 81(20): 11381-11391.
46. Schmaljohn, C. S., Hooper, J., W. 2001. *Bunyaviridae: the viruses and their replication*, 1581–1602. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (ed.), *Fields virology*, 4th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
47. Ramanathan, H. N., Chung, D., H., Plane, S., J., Sztul, E. Dynein-dependent transport of the hantaan virus nucleocapsid protein to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *J. Virol.*, 2007; 81: 8634–8647.
48. Gahmberg, N., Kuismanen, E., Keranen, S., Pettersson, R., F. Uukuniemi virus glycoproteins accumulate in and cause morphological changes of the Golgi complex in the absence of virus maturation. *J. Virol.*, 1986; 57: 899–906.
49. Salanueva, I., J., Novoa, R., R., Cabezas, P., Iglesias, C., L. Polymorphism and structural maturation of bunyamwera virus in Golgi and post-Golgi compartments. *J. Virol.*, 2003; 77: 1368–1381.
50. Ravkov, E., V., Compans, R., W. Hantavirus nucleocapsid protein is expressed as a membrane-associated protein in the perinuclear region. *J. Virol.*, 2001; 75: 1808–1815.
51. Sjölander, K., B., Elgh F., Kallio K., H., Vapalahti, O., ve ark. Evaluation of serological methods for diagnosis of puumala hantavirus infection (nephropathia epidemica). *J. Clin. Microbiol.*, 1997; 35: 3264–3268.
52. Lee, H., W., Lee, P., W., Johnson, K., M. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.*, 1978; 137: 298-308.
53. Mertens, M., Wölfel, R., Ulrich, K., Yoshimatsu, K., ve ark. Seroepidemiological study in a *puumala virus* outbreak area in South-East Germany. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2009; 198: 83-91.

54. Simmons, J., H., Riley, L., K. Hantaviruses: an overview. *Comparative Medicine*, 2002; 52(2): 97-110.
55. http://student.cbccmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab17/dfaby_flash.html (02.04.2013)
56. Zhang, Y., Zhang, H., Dong, X., Yuan, J., ve ark. Hanravirus outbreak associated with laboratory rats in Yunnan, China. *Infection, Genetics and Evolution*, 2010; 10: 638-644.
57. Elgh, F., Lundkvist, A., Alexeyev, O., A., Stenlund, H., ve ark. Serological diagnosis of hantavirus infections by an enzyme-linked immunosorbent assay based on detection of immunoglobulin G and M responses to recombinant nucleocapsid proteins of five viral serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997; 35(5): 1122-1130.
58. Ferrer, J., F., Jonsson, C., B., Esteban, E., Galligan, D., ve ark. High prevalence of hantavirus infection in Indian communities of the Paraguayan and Argentinean Gran Chaco. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* , 1998; 59(3): 438-444.
59. Papa, A., Johnson, A., M., Stockton, P., C., Bowen, M., D., ve ark. Retrospective serological and genetic study of the distribution of hantaviruses in Greece. *Journal of Medical Virology*, 1998; 55: 321-327.
60. Sjölander, K., B., Lundkvist, A. Dobrava virus infection: serological diagnosis and cross-reactions to other hantaviruses. *Journal of Virological Methods*, 1999; 80: 137-143.
61. Bharadwaj, M., Nofchissey, R., Goade, D., Koster, F. ve ark. Humoral immune responses in the hantavirus cardiopulmonary syndrome. *The Journal of Infectious Diseases*, 2000; 182: 43-48.
62. Botten, J., Mirowsky, K., Kusewitt, D., Bharadwaj, M. Experimental infection model for Sin Nombre hantavirus in the deer Mouse (*Peromyscus maniculatus*). *PNAS*, 2000; 97(19): 10578-10583.
63. Hjelle, B., Jenison, S., Martinez, N., T., Herring, B., ve ark. Rapid and specific detection of sin nombre virus antibodies in patients with hantavirus pulmonary syndrome by a strip immunoblot assay suitable for field diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997; 35(3): 600-608.
64. <http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/rdurmaz/UygMolMikr/123.pdf> (10.04.2013)
65. Okumura, M., Yoshimatsu, K., Kumperasart, S., Nakamura, I., ve ark. Development of serological assays for Thottapalayam virus, an insectivore-borne hantavirus. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007; 14(2): 173-181.
66. Heider, H., Ziaja, B., Priemer, C., Lundkvist, A., ve ark. A chemiluminescence detection method of hantaviral antigens in neutralisation assays and inhibitor studies. *Journal of Virological Methods*, 2001; 96: 17-23.
67. Aitichou, M., Saleh, S., S., McElroy, A., K., Schmaljohn, C., ve ark. Identification of dobrava, hantaan, seoul and puumala viruses by one step real time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 2005; 124: 21-26.

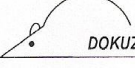
68. Ferres, M., P., Vial, C., Marco, L., Yanez, P., ve ark. Prospective evaluation of household contacts of persons with hantavirus cardiopulmonary syndrome in Chile. *J. Infect. Dis.*, 2007; 195: 1563–1571.
69. Padula, P., Martinez, V., P., Bellomo, C., Maidana, S., ve ark. Pathogenic hantaviruses, northeastern Argentina and eastern Paraguay. *Emerg. Infect. Dis.*, 2007; 13: 1211–1214.
70. Evander, M., Eriksson, I., Pettersson, L., Juto, P., ve ark. Puumala hantavirus viremia diagnosed by real-time reverse transcriptase PCR using samples from patients with hemorrhagic fever and renal syndrome. *J. Clin. Microbiol.*, 2007; 45: 2491–2497.
71. Moreli, M., L., Sousa, R., L., Figueiredo, L., T. Detection of Brazilian hantavirus by reverse transcription polymerase chain reaction amplification of N gene in patients with hantavirus cardiopulmonary syndrome. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2004; 99: 633–638.
72. Raboni, S., M., Borba, L., Hoffmann, F., G., Noronha, L., ve ark. M. L. Evidence of circulation of Laguna Negra-like hantavirus in the Central West of Brazil: case report. *J. Clin. Virol.*, 2009; 45: 153–156.
73. Bardakçı, F., Yenidünya, A., F., Moleküler biyoloji teknikleri I: nükleik asit analiz teknikleri. In: Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karatas, M., Tanyolaç, B., editors. *Moleküler biyoloji, protein sentezi ve yıkımı*. 1. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, 2007, p. 519-553.
74. Klug, W., S., Cummings, M., R. *Genetik kavramlar*, 2. Baskı, Palme Yayıncılık, 2003, p. 515-525.
75. Murray, P., R., Rosenthal, K., S., Pfaller, M., A. *Tıbbi Mikrobiyoloji*, 6. Baskı, BRC Basım, Atlas Kitapçılık, 2010, p. 166-168.
76. <http://www.pcrstation.com/nested-pcr/> (13.03.2013)
77. Don, R., H., Cox, P., T., Wainwright, B., J., Baker, K., ve ark. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*, 1991; 19(14): 4008.
78. Huggins, J., W., Kim, G., Y., Brand, O., M., McKee, K., T. Ribavirin therapy for hantaan virus infection in suckling mice. *The Journal of Infectious Diseases*, 1986; 153(3): 489-497.
79. Stoltz, M., Ahlm, C., Lundkvist, A., Klingström, J. Lambda interferon in serum is decreased in hantavirus-infected patients, and in vitro-established infection is insensitive to treatment with all IFNs and inhibits IFN- γ -induced nitric oxide production. *Journal of Virology*, 2007; 81(16): 8685-8691.
80. Huggins, J., W., Hsiang, C., M., Cosgriff, T., M., Guang, M., Y., ve ark. Prospective, double-blind, concurrent, placebo-controlled clinical trial of intravenous ribavirin therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome. *The Journal of Infectious Diseases*, 1991; 164: 1119-1127.
81. McCaughey, C., Hart, C., A. Hantaviruses. *J. Med. Microbiol.*, 2000; 49: 587-599.

82. Smajlovic L., Davoren J., Heyman P., Cochez C., ve ark. Development and optimization of a PCR assay for detection of Dobrava and Puumala hantaviruses in Bosnia and Herzegovina. *Journal of Virological Methods*, 2012; 187: 37-42.
83. Fatla, A., W., Zajak, V., Knap, J., P., Sroka, J., ve ark. A small-scale survey of hantavirus in mammals from eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2013; 20 (2): 283-286.
84. Lundkvist, A., Wiger, D., Hörling, J., Sjölander, K., B., ve ark. Isolation and characterization of Puumala hantavirus from Norway: evidence for a distinct phylogenetic sublineage. *Journal of General Virology*, 1998; 79: 2603-2614.
85. Moreli, M., L., Sousa, R., L., Figueiredo, L., T., M. Detection of Brazilian Hantavirus by reverse transcription polymerase chain reaction amplification of N gene in patients with Hantavirus cardiopulmonary syndrome. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2004; 99 (6): 633-638.
86. Dieffenbach, C., W., Lowe, T., M., J., Dveksler, G., S. General concepts for PCR primer design. *Genome Research*, 1993; 3: 30-37.
87. Roux, K., H. Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harb Protoc*, 2009; 4 (4): 1-6.
88. Jakab, F., Horvath, G., Ferenczi, E., Sebok, J., ve ark. Detection of dobrava hantaviruses in *Apodemus agrarius* mice in the Transdanubian region of Hungary. *Virus Research*, 2007; 128: 149-152.
89. Suzuki, A., Bisordi, I., Levis, S., Garcia, J., ve ark. Identifying rodent hantaviruses reservoirs, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 2004; 10 (12): 2127-2134.
90. Kariwa, H., Kimura, M., Yoshizumi, S., Arikawa, J., ve ark. Modes of Seoul virus infections: persistency in newborn rats and transiency in adult rats. *Arch Virol.*, 1996; 141: 2327-2338.
91. Korva, M., Duh, D., Saksida, A., Trilar, T., ve ark. The hantaviral load in tissues of naturally infected rodents. *Microbes and Infection*, 2009; 11: 344-351.

8.EKLER

EK-1

Etik Kurul Onayı

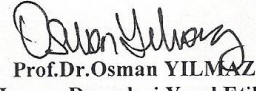
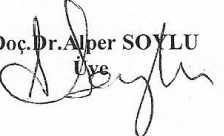
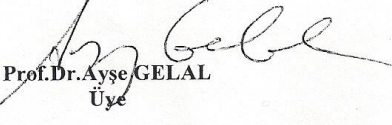
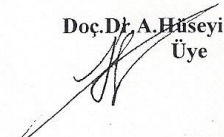
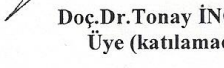
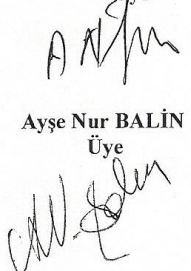
**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**
35340, Inciraltı, İzmir-232 412254
<http://deu.edu.tr/ideneyetik/>

Toplantı No : 13/12/2009
Toplantı Tarihi : 05.06.2009

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

41/2009 Protokol No'lu; Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Doç.Dr.Mehmet Ali ÖKTEM'in sorumlu olduğu "Türkiye batı bölgelerindeki hanta virüs araştırılması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

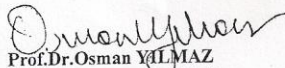
 Prof.Dr.Osman YILMAZ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı	Prof.Dr. Sevil GÖNENC ARDA Başkan Yardımcısı
 Doç.Dr.Alper SOYLU Üye	 Prof.Dr.Ayşe GELAL Üye
Doç.Dr. Hüseyin ASTARCIOĞLU Üye(katılmadı)	Doç.Dr.Turna İLKNUR Üye
Doç.Dr.Abdullah KUMRAL Üye (katılmadı)	 Doç.Dr. A.Hüseyin BASKIN Üye
Doç.Dr.Yücel ARISOY Üye (katılmadı)	 Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ Üye (katılmadı)
Doç.Dr.Ali Necati GÖKMEN Üye	Vtr.Dr.Adnan SERPEN Üye(katılmadı)
 Ayşe Nur BALIN Üye	


Toplantı No : 04/15/2011
Toplantı Tarihi : 22 Temmuz 2011

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na

41/2009 Protokol No'lu; Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Doç.Dr.Mehmet Ali ÖKTEM'in sorumlu olduğu "Türkiye batı bölgelerindeki hanta virüs araştırılması" isimli projede; Alihan BULGURCU, Ceylan POLAT ve Y.Hakan ABACIOĞLU'nun projeye dahil edilmeleri hakkında gönderilen belge incelenerek bilgi edinilmiştir.

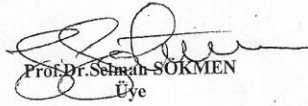
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik
Kurul Başkanı


Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr.Alper SOYLU
Üye (Topl.katılmadı)

Prof.Dr.Ayşe GELAL
Üye (Topl.katılmadı)


Prof.Dr.Selman SÖKMEN
Üye

Prof.Dr.O.Nejat SARIOSMANOĞLU
Üye

Prof.Dr.Abdullah KUMRAL
Üye (Topl.katılmadı)

Prof.Dr.Hüseyin BASKIN
Üye

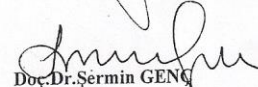
Doç.Dr.Turna İLKNUR
Üye (Topl.katılmadı)

Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK
Üye

Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ
Üye (Topl.katılmadı)

Vtr.Hekim Adnan SERPEN
Üye

Ayşe Nur BALİN
Üye(Topl.katılmadı)


Doç.Dr.Şermin GENÇ
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

EK-2

ÖZGEÇMİŞ

ALİHAN BULĞURCU

TC Kimlik No / Pasaport No:	11237335162
Doğum Yılı:	1988
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. 35340 Narlıdere/İzmir
Telefon :	0505 889 64 68
e-posta :	alihanbulgurcu@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Mikrobiyoloji	Yüksek Lisans	2013
Türkiye	Ege Üniversitesi	Mühendislik Fakültesi	Biyomühendislik	Lisans	2010

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Ege Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı	Stajyer	06.2008- 05.2009
Ege Üniversitesi	Türkiye	İzmir	CARLO ERBA İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.	Stajyer	06.2009- 08.2009

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Mikrobiyoloji, Viroloji

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
<input type="checkbox"/>	Biyomühendislik Bölümü, Bölüm 2.liği Ödülü	Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi	2010

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayımlanan makaleler

--

Diğer dergilerde yayımlanan makaleler

