VETERİNER HEKİMLİĞİ

GENEL VİROLOJİ AKIL NOTLARI

PROF. DR. AHMET KÜRŞAT AZKUR

- Genel Viroloji Kaynaklarının **Özetleri**
- Akılda Kalmayı **Kolaylaştıran Format**
- Kolay Öğrenmeyi Sağlayan **Tablolar**
- Öğrenmeyi Kolaylaştıran **Görseller**
- Uyarıcı **Dikkat Kutuları**

BİLİNMESİ GEREKENLER ÖZETLENDİ



GÜNEŞ TIP KİTABEVLERİ

Veteriner Hekimliği

Genel Viroloji



Akıl Notları

Referans Kaynaklar Sizin İçin Özetlendi !

Editör

Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Klinik Öncesi Bilimler Bölümü

Viroloji Anabilim Dalı

GÜNEŞ TIP KİTABEVLERİ

VETERİNER HEKİMLİĞİ
GENEL VİROLOJİ AKIL NOTLARI

Copyright © 2025

Bu Kitabın her türlü yayın hakkı **Güneş Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.**'ne aittir.
Yazılı olarak izin alınmadan ve kaynak gösterilmeden kısmen veya tamamen kopya edilemez;
fotokopi, teksir, baskı ve diğer yollarla çoğaltılamaz.

ISBN 978-625-6065-63-5

Seri Editörü: Prof. Dr. Ender Yarsan

Genel Yayın Yönetmeni: Murat Yılmaz
Genel Yayın Yönetmeni Yardımcısı: Polat Yılmaz
Yayın Danışmanı ve Tıbbi Koordinatör: Dr. Ufuk Akçıl
Yayıına Hazırlama: Güneş Dizgi-Grafik Tasarım Birimi
Baskı: Ankara Özgür Matbaacılık Basım Yay. Dağ. San. Tic. A.Ş.
Saray Mahallesi 205 Cadde No: 4/2 Kahramankazan / Ankara
Telefon: 0507 923 90 99
Sertifika No: 46821

UYARI

Medikal bilgiler sürekli değişmekte ve yenilenmektedir. Standart güvenlik uygulamaları dikkate alınmalı, yeni araştırmalar ve klinik tecrübeler ışığında tedavilerde ve ilaç uygulamalarındaki değişikliklerin gerekli olabileceği bilinmelidir. Okuyuculara ilaçlar hakkında üretici firma tarafından sağlanan ilaca ait en son ürün bilgilerini, dozaj ve uygulama şekillerini ve kontraendikasyonları kontrol etmeleri tavsiye edilir. Her hasta için en iyi tedavi şeklini ve en doğru ilaçları ve dozlarını belirlemek uygulamayı yapan hekimin sorumluluğundadır. Yayıncı ve editörler bu yayından dolayı meydana gelebilecek hastaya ve ekipmanlara ait herhangi bir zarar veya hasardan sorumlu değildir. Bölümlerin içerik ve bilimsel sorumluluğu yazarlarına aittir.

GENEL DAĞITIM

GÜNEŞ TIP KİTABEVLERİ

ANKARA
M. Rauf İnan Sokak No: 3
06410 Sıhhiye / Ankara
Tel: (0312) 431 14 85 • 435 11 91-92
Faks: (0312) 435 84 23

İSTANBUL
Gazeteciler Sitesi Sağlam Fikir Sokak
No: 7 / 2 Esentepe / İstanbul
Tel: (0212) 356 87 43

KADIKÖY
Rasimpaşa Mah. İskele Sokak
No: 4 / A Kadıköy / İstanbul
Tel: (0216) 546 03 47

www.guneskitabevi.com
info@guneskitabevi.com

ÖNSÖZ

"Oku" emriyle başlayarak âlemleri anlamak ve bunun için kullanılan mürekkep, kalem, yazı ve kitap; bir kültürü medeniyete dönüştürür. Gerçek aydınlanma, bilginin ışığında yürüyüp onu kabul edenler için mümkündür. Akıl, bilgi ve tecrübe görünmeyeni görünür kılar ve böylece çıplak gözle görülmeyen mikro âlemin temsilcilerinden virüsleri anlamak için yazılan bu kitap, aynı zamanda varoluşun dinamiklerini de anlatmaktadır.

Virüsler, doğa kurallarının birçok istisnasını bünyesinde barındıran, saldırı ustalığında kusursuzlaşmış mikroorganizmalardır. Bir savaşçı gibi saldırır, bir ajan gibi hücre içine sızar ve zamanı geldiğinde en stratejik hamleyi yapar. Kendi varlıklarını sürdürebilmek için konak hücrenin sistemlerini ele geçirir. Virüsler kimi zaman hücrenin ve konağın savunma sistemini sabote eder, kimi zaman sessizce bekleyerek en zayıf anı kollar, kimi zaman ise ani bir darbeyle istila ve yıkım sürecini başlatır. Her mücadelenin temel stratejisi, düşmanı ve kendini tanımaktan geçer; bu yüzden virüs ile konak arasındaki savaşı derinlemesine idrak etmek zorundayız. Zira zafer, ancak düşmanı en ince ayrıntısına kadar bilmekle mümkündür. Virüsleri tanımadan, onlara karşı yapılan savaş kazanılamaz, çünkü en sağlam savunma, bilinmeyeni ve sırları ortaya çıkarmakla elde edilir. Tüm canlı hücrelerin içinde var olmaya mahkûm, mikro âlemin üyeleri olan virüsler, yalnızca hastalık yapan etkenler değil, aynı zamanda gen terapisi ve vektör aşıları gibi alanlarda fayda sağlayan unsurlardır. Bilim, onları anlamanın sadece hastalık mekanizmalarını öğrenmekle kalmayıp, şifa kaynağı olarak da kullanılabileceğini göstermiştir.

Veteriner viroloji, hayvan sağlığının korunması ve zoonotik hastalıkların kontrolü açısından giderek daha büyük bir önem kazanmaktadır. Virüs kaynaklı hastalıklar, evcil hayvanlarımızı tehdit eden, hayvan refahını olumsuz etkileyen, hayvancılık sektöründe ciddi ekonomik kayıplara yol açan ve aynı zamanda insan sağlığını tehdit eden zoonotik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Özellikle COVID-19 salgını, yeni ve yeniden ortaya çıkan viral enfeksiyonların küresel sağlık üzerindeki etkisini açıkça gözler önüne sermiştir. Bu kitap, veteriner hekimlik, tıp, diş hekimliği, eczacılık, biyoloji ve biyoteknoloji alanlarında eğitim gören öğrenciler ile araştırmacı ve uzmanlara viroloji konusunda sağlam bir bilimsel temel kazandırmayı amaçlamaktadır.

Bu eser, temel kavramlardan ileri düzey tekniklere uzanan içeriğiyle, viral taksonomi, virüs-hücre etkileşimi, virülens, konakçı direnci, antiviraller ve immünite gibi konuları ele alırken, epidemiyolojik dinamikleri viroloji açısından değerlendirmektedir. Virolojide kullanılan laboratuvar uygulamalarına da yer veren bu eser, teoriyi pratiğe dökmek isteyen araştırmacılar için bir kılavuz niteliğindedir. Bilimin sürekli değişen doğası gereği, veteriner viroloji de her geçen gün keşiflere sahne olmaktadır. Güncel literatürler ışığında hazırlanan bu kitabın, akademik dünyaya değerli bir katkı sunacağına inanmaktayım. Bu kitap, veteriner viroloji alanında hem lisans hem de lisansüstü öğrenciler için de kapsamlı bir rehber olması için, yoğun çaba ve tecrübe ile hazırlandı. Bu eserin hazırlanmasında mesleki bilgi birikimlerini ve emeklerini ortaya koyan tüm yazarlara içtenlikle teşekkür ediyorum.

Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR

TEŞEKKÜR

Bu kitabın hazırlanması için öneride bulunan Veteriner Hekimliği Akıl Notları Serisi Editörü, değerli bilim insanı Prof. Dr. Ender YARSAN hocam'a; başta Zafer ÇERİ ve Dilek DOĞANAY olmak üzere yayım sürecinde emeği geçen Güneş Tıp Kitabevleri ailesinin tüm çalışanlarına; eşim Prof. Dr. Dilek AZKUR'a ve kızlarım Elif ile İnci Meryem'e gönülden teşekkür ederim. Hayatım boyunca beni hep destekleyen annem Zübeyde AZKUR ile babam Fahri AZKUR'a; eğitim hayatım boyunca üzerimizde hakkı olan tüm öğretmenlerime, hocalarıma; doktora tez danışmanlarım Prof. Dr. Yusuf BOLAT ile Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ'a şükranlarımı sunarım.

Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR

YAZARLAR

Doç. Dr. Hasan Abaylı
Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Klinik Öncesi Bilimler Bölümü
Viroloji Anabilim Dalı

Dr. Öğr. Üyesi Emel Aksoy
Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Klinik Öncesi Bilimler Bölümü
Viroloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ahmet Kürşat Azkur
Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Klinik Öncesi Bilimler Bölümü
Viroloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Hakan Bulut
Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
Veteriner Fakültesi Klinik Öncesi Bilimler Bölümü
Viroloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Dilek Muz
Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Klinik Öncesi Bilimler Bölümü
Viroloji Anabilim Dalı

Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Sözdutmaz
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Klinik Öncesi Bilimler Bölümü
Viroloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Şükrü Tonbak
Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Klinik Öncesi Bilimler Bölümü
Viroloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Turhan Turan
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Klinik Öncesi Bilimler Bölümü
Viroloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

Önsöz iii
Yazarlar vii

BÖLÜM 1. VETERİNER VİROLOJİYE İLK BAKIŞ 1
Prof. Dr. Ahmet Kürşat Azkur

BÖLÜM 2. VİRAL TAKSONOMİ 19
Dr. Öğr. Üyesi Emel Aksoy, Prof. Dr. Ahmet Kürşat Azkur

BÖLÜM 3. VİRÜSLERİN ÇOĞALMA MEKANİZMALARI 63
Prof. Dr. Hakan Bulut

BÖLÜM 4. ANTİVİRALLER VE İNTERFERONLAR 79
Prof. Dr. Şükrü Tonbak

BÖLÜM 5. VİRAL EVRİM 101
Doç. Dr. Turhan Turan

BÖLÜM 6. VİRÜS İLE HÜCRE ETKİLEŞİMİ 123
Dr. Öğr. Üyesi Emel Aksoy

BÖLÜM 7. ENFEKSİYONUN SEYRİ: VİRÜSLERİN VÜCUTTAKİ YOLCULUĞU 135
Doç. Dr. Hasan Abaylı

BÖLÜM 8. VİRAL ENFEKSİYONLARIN DOKU VE ORGAN HASARLARI 153
Doç. Dr. Turhan Turan

BÖLÜM 9. VİRAL ENFEKSİYONLARIN ŞİDDETİNİ BELİRLEYEN MEKANİZMALAR: VİRÜLENS VE KONAKÇI DİRENCİ 165
Prof. Dr. Ahmet Kürşat Azkur

BÖLÜM 10. VİRÜSLER VE KALICI ENFEKSİYONLAR 179
Doç. Dr. Hasan Abaylı

BÖLÜM 11. VİRAL ONKOGENEZ 195
Dr. Öğr. Üyesi Emel Aksoy

BÖLÜM 12. VİRAL HASTALIKLARDA BAĞIŞIKLIK 229
Prof. Dr. Dilek Muz, Prof. Dr. Ahmet Kürşat Azkur

BÖLÜM 13. VİRAL AŞILAR 267
Prof. Dr. Şükrü Tonbak, Prof. Dr. Ahmet Kürşat Azkur, Dr. Öğr. Üyesi Emel Aksoy

BÖLÜM 14. VİRAL EPİDEMİYOLOJİ 295
Prof. Dr. Dilek Muz, Prof. Dr. Hakan Bulut

BÖLÜM 15. LABORATUVARDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR 327
Prof. Dr. Ahmet Kürşat Azkur, Dr. Öğr. Üyesi Emel Aksoy

BÖLÜM 16. HÜCRE KÜLTÜRÜ VE İNOKULASYON 343
Dr. Öğr. Üyesi Emel Aksoy, Prof. Dr. Ahmet Kürşat Azkur

BÖLÜM 17. VİRÜSLERİN ÜRETİLMESİNDE *İN VİVO* SİSTEMLER 363
Doç. Dr. Turhan Turan

BÖLÜM 18. VİRAL TİTRASYON ve NÖTRALİZASYON DENEYLERİ 375
Prof. Dr. Hakan Bulut

BÖLÜM 19. HEMAGLÜTİNASYON, HEMAGLÜTİNASYON İNHİBİSYON TESTİ VE HEMADSORBSİYON TESTİ 389
Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Sözdutmaz

BÖLÜM 20. AGAR JEL İMMÜNODİFÜZYON VE KOMPLEMENT FİKZASYON 397
Dr. Öğr. Üyesi Emel Aksoy

BÖLÜM 21. ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay 403
Dr. Öğr. Üyesi Dr. İbrahim Sözdutmaz

BÖLÜM 22. İMMÜNOFLORESAN VE İMMÜNOPEROKSİDAZ TESTİ 413
Doç. Dr. Hasan Abaylı

BÖLÜM 23. SODYUM DODESİL SÜLFAT POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZ -WESTERN-SOUTHERN-NORTHERN BLOTLAMA 425
Prof. Dr. Dilek Muz

BÖLÜM 24. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU VE REAL TİME PZR 443
Prof. Dr. Ahmet Kürşat Azkur, Dr. Öğr. Üyesi Emel Aksoy

BÖLÜM 25. SEKANSLAMA (DİZİ ANALİZİ) VE METAGENOMİK ANALİZ 455
Prof. Dr. Dilek Muz

BÖLÜM 26. GEN KLONLAMASI 469
Prof. Dr. Şükrü Tonbak

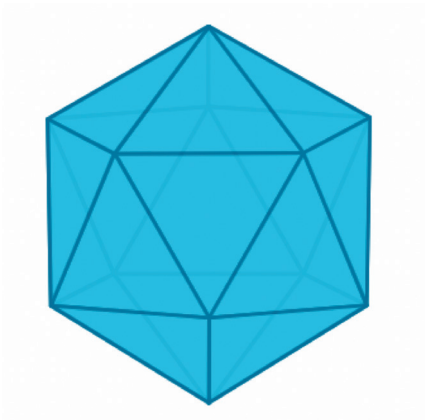
BÖLÜM 27. MONOKLONAL ANTİKOR TEKNOLOJİSİ 483
Prof. Dr. Hakan Bulut

BÖLÜM 28. HIZLI TANI TESTLERİ 491
Prof. Dr. Dilek Muz

2. **Matriks (Matrix-M):** Virüslerin zarfı ile nükleokapsidi arasında yer alan yapısal bir proteindir. Matriks (M) proteini, virüsün yapısal bütünlüğünü sağlamak ve virüsün konak hücre içinde nasıl bir araya geleceğini düzenlemek için önemlidir.
3. **Kapsid (Capsid- Kapsid):** Virüsün genetik materyalini çevreleyen protein kılıftır. Kapsid, virüsün hem yapısal bütünlüğünü sağlar hem de virüsün çevresel faktörlere karşı korunmasına yardımcı olur. Ayrıca, kapsidin yapısı virüsün konak hücreye girmesini de etkiler.
4. **Nükleokapsid (NP):** Virüsün genetik materyalini (DNA veya RNA) saran yapıdan oluşur. Nükleokapsid, virüsün yapısal ve katalitik proteinlerini içerir. Genetik materyalin korunmasını ve virüsün replikasyon **sürecinde gerekli olan proteinlerin üretimini sağlar.**
5. **Genom:** Virüsün genetik materyalini temsil eder ve viral genleri içerir. Genom, virüsün enfeksiyonunu başlatmak ve çoğalmak için gerekli bilgileri taşır. Virüslerin genetik materyali, DNA veya RNA biçiminde olabilir ve tek veya çift sarmallı yapı içerebilir.

4. VİRAL YAPI BAŞLICA NELERDEN OLUŞUR?

- Bir virüsün oluşumu, doğal mühendisliğin dikkate değer bir başarısıdır. Protein alt birimlerinin ve diğer bileşenlerin (yaklaşık 60-10.000) yoğun hücresel ortamdan bir araya gelerek, biyolojik olarak anlamlı zaman ölçeklerinde düzenli, tam ve tekrarlanabilir yapılar oluşturması sağlanır. Virüsler, insan, hayvan, bitki, bakteri, parazit gibi birçok canlıyı enfekte edebilir.
- **Virüsler boyut ve karmaşıklık açısından büyük farklılıklar gösterir; 826 nükleotidlik genomu tek bir proteini kodlayan 16 nm boyutundaki uydu panicum mozaik virüsünden mikrometre boyutlarındaki pandoravirus'a kadar uzanır. Pandoravirus'un 2.5 megabaz büyüklüğündeki genomu, bazı bakteriyel genomlardan daha büyüktür ve 2,556 olası proteini kodlar.**
  - **İkosahedron** 12 köşe, 30 kenar, ve hepsi eşkenar üçgenden meydana gelen 20 yüzeye sahiptir. Kenarlarından geçen iki, yüzeylerinden geçen üç ve köşelerinden geçen beş eksen etrafında ikosahedron rotasyonal simetriye sahiptir (Şekil 1).



Şekil 1. İkosahedron yapısı. BioRender uygulaması kullanılarak yapılmıştır (https://BioRender.com)

ÖRNEK 2:

Realm - Alem	*Riboviria*
Kingdom - Krallık	*Orthornavirae*
Phylum - Şube	*Pisuviricota*
Subphylum - Alt şube	-
Class - Sınıf	*Pisoniviricetes*
Order - Takım	*Picornavirales*
Family - Aile	*Picornaviridae*
Subfamily - Alt aile	*Caphthovirinae*
Genus - Cins	*Aphthovirus*
Species - Tür	*Aphthovirus vesiculae* (*Foot-and-mouth disease virus)*
Subspecies - Alttür	-
Strains - Suş	O
Variants - Varyant	Manisa 32 0

*Varyantlar veya alt türler aşı geliştirilmesinde veya tanı amaçlı kullanımda önem arz etmektedir.

ÖRNEK 3:

Realm - Alem	*Riboviria*
Kingdom - Krallık	*Orthornavirae*
Phylum - Şube	*Negarnaviricota*
Subphylum - Alt şube	*Haploviricotina*
Class - Sınıf	*Monjiviricetes*
Order - Takım	*Mononegavirales*
Family - Aile	*Paramyxoviridae*
Subfamily - Alt aile	*Orthoparamyxovirinae*
Genus - Cins	*Morbillivirus*
Species - Tür	*Morbillivirus pecoris (Rinderpest)*
Subspecies - Alttür	-
Strains - Suş	Kabete O
Variants - Varyant	-

3.9. *CHİTOVİRALES-POXVİRİDAE*

- Poksvirüsler, "pock" (pustül) teriminden adını alarak, omurgalıların en büyük ve en kompleks virüsleri arasında yer alır. Bu virüslerin virionları, tipik olarak tuğla şeklindedir ve çoğunlukla 300-450 x 170-260 nm boyutlarına sahiptir; ancak, parapoksvirüs cinsi bu boyutların dışında olup, 220-300 x 140-170 nm ölçülerinde ve yumurta biçimindedir. Tüm poksvirüsler, 130-280 kilobaz (kbp) büyüklüğünde çift iplikli DNA'nın tek lineer molekülünü içerir. Poksvirüslerin çoğalma süreci, sitoplazmada gerçekleşir ve bu aşamada, mRNA viriona ait bir transkriptaz tarafından kopyalanır. Bu özellik, poksvirüslerin kendine özgü çoğalma mekanizmalarını ve konak hücrelerdeki etkileşimlerini anlamak için önemlidir. Poksvirüslerin karmaşık yapısı ve çeşitli konak türlerinde oluşturduğu enfeksiyonlar, viroloji alanında derinlemesine araştırmalar yapılmasını gerektiren önemli bir konu oluşturmaktadır. Poxviridae ailesinin Chordopoxvirinae alt ailesi veteriner hekimlik için önemli poksvirüsleri kapsamaktadır. Bu alt aile içinde ise 3 cins ön plana çıkmaktadır: Capripoxvirus, Orthopoxvirus ve Parapoxvirus. Capripoxvirus cinsi içindeki virüsler; koyun ve keçi çiçeği ile kabarcıklı deri hastalığı (sığırların nodüler ekzantemi; lumpy skin disease) etkenleridir. Orthopoxvirus cinsinde insan ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturan sığır çiçeği, maymun çiçeği (M çiçeği), vaccinia virüs, variola virüs gibi önemli etkenler yer almaktadır. Parapoxvirus cinsi ise sığırların papüller stomatitisi, orf (ektima) ve yalancı sığır çiçeği hastalıklarının etkenlerini içerir.
- Poxviridae, zarflı, tuğla şeklinde veya oval virüslerden oluşan bir ailedir. Genom, kovalent olarak kapalı uçlara sahip doğrusal bir çift sarmallı DNA (dsDNA) molekülüdür (128-375 kbp). Bu aile, böcekleri enfekte virüsleri içeren Entomopoxvirinae alt ailesi ve memeliler, kuşlar, sürüngenler ve balıklarda enfeksiyon oluşturan Chordopoxvirinae alt ailesini içerir. Poksvirüsler, insanlar da dahil olmak üzere çeşitli hayvanlarda önemli patojenlerdir ve genellikle lezyonlar, deri nodülleri veya yaygın döküntülerle sonuçlanır. Enfeksiyonlar ölümcül olabilir. Poksvirüs genomu, kovalent olarak kapalı uçları olan doğrusal bir dsDNA molekülünden (128-375 kbp) oluşur; terminal saç tokası (hairpin) yapıları, ters tamamlayıcı dizilerden (inverted complementary sequences) oluşan iki izomerik, kusurlu eşlenmiş (imperfectly paired) 'flip-flop' DNA formlarını oluşturur. Genomlar genellikle 128'den fazla gen kodlar. Tüm türlerde korunan yaklaşık 49 gen, genomun transkripsiyonu ve replikasyonu için gerekli olan proteinleri kodlar. Türlere özgü genler ise, enfeksiyon sırasında konağın bağışıklık tepkisini alt ederek veya hücreye özgü büyüme faktörleri sağlayarak, konaklarında bir çoğalma avantajı sağlayan proteinleri kodlar.

Alem: Varidnaviria
Krallık: Bamfordvirae
Şube: Nucleocytoviricota
Sınıf: Pokkesviricetes
Takım: Chitovirales
Aile: Poxviridae
Alt aile: Chordopoxvirinae
Alt aile: Entomopoxvirinae

Alem: Riboviria
Krallık: Orthornavirae
Şube: Duplornaviricota
Sınıf: Resentoviricetes
Takım: Reovirales
Aile: Sedoreoviridae

Cins: Orbivirus
Tür: Orbivirus alphaequi (Afrika at vebası)
Tür: Orbivirus caerulinguage (Mavi dil)
Tür: Orbivirus ruminantium (Epizootik hemorajik hastalık)

Cins: Rotavirus
Tür: Rotavirus alphagastroenteritidis (Rotavirüs A)
Tür: Rotavirus betagastroenteritidis (Rotavirüs B)

4.15.2. REOVİRALES- SPINAREOVİRİDAE

- Spinareovirüs virionları ikosahedral şekildedir. Protein kapsidi, 50–85 nanometre çapında 1–3 konsantrik kapsid protein katmanı şeklinde organize olmuştur. Spinareoviridae ailesinin üyeleri, alt viral parçacığın 12 ikosahedral tepe noktasında dikenler veya kuleler bulundururken, Sedoreoviridae ailesinin üyeleri neredeyse küresel veya 'pürüzsüz' bir görünüme sahiptir. Spinareovirüsler, toplamda 23–29 kilobaz uzunluğunda 9–12 segmentten oluşan lineer çift iplikli RNA içerir; bireysel segmentlerin uzunluğu 0,5 ile 4,8 kilobaz arasında değişir. Her çift ipliğin pozitif anlamlı iplikleri, 5'-terminal tip 1 kap yapısı ile modifiye edilmiştir ancak 3'-poly(A) kuyrukları yoktur. Viral RNA'lar genellikle monositroniktir ve nispeten kısa 5'- ve 3'-kodlamayan bölgeler içerir, ancak bazı segmentlerde ikinci veya üçüncü işlevsel açık okuma çerçevesi bulunabilir.
- Spinareovirüsler, geniş bir konak aralığına sahip olup, hayvanları, mantarları ve bitkileri enfekte ederler. Bazıları, insanlar (örneğin, Colorado kenesi ateşi virüsü), çiftlik hayvanları (örneğin, kuş ortoreovirüsleri), balıklar (örneğin, aquareovirüsler) ve bitkiler için önemli patojenik potansiyele sahiptir. *Spinareoviridae* ailesinde *Aquareovirus* cinsi balıklar için ve *Orthoreovirus* cinsi kanatlılar için önemlidir. *Coltivirus* cinsi ise insanlarda Colorado kenesi ateşi etkenini barındırır.

Alem: Riboviria
Krallık: Orthornavirae
Şube: Duplornaviricota
Sınıf: Resentoviricetes
Takım: Reovirales
Aile: Spinareoviridae
Cins: Aquareovirus (Balık reovirüsleri)

Cins: Coltivirus
Tür: *Coltivirus dermacentoris* (Colorado kenesi ateşi virüsü)

Cins: Orthoreovirus
Tür: *Orthoreovirus avis* (Avian orthoreovirus)

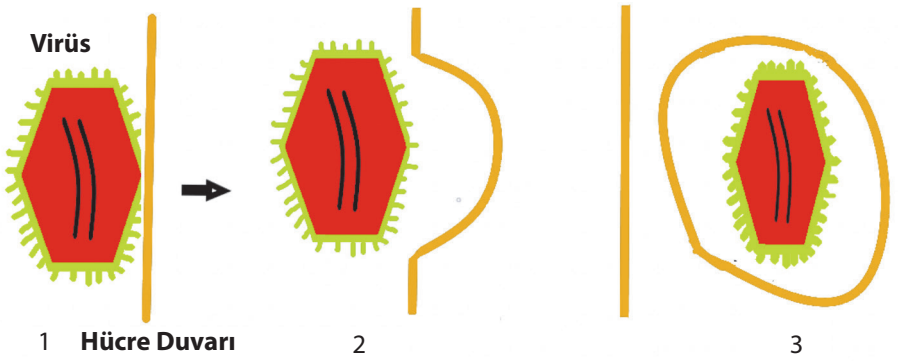
Tablo 2. Virüs ailelerinin genel olarak yapı ve genom özellikleri.						
Retroviridae	ssRNA-RT	2 BENZER DOĞRUSAL SEGMENTLİ	2,4–13,3	EVET	KÜRESEL	80–100 nm çapında
Rhabdoviridae	ssRNA(-)	1–2 DOĞRUSAL SEGMENTLİ	9,8–16,2	EVET VEYA HAYIR	MERMİ ŞEKLİNDE/ ÇUBUKSU VEYA İPLİKSİ	45–100 nm çapında, 100–430 nm uzunluğunda veya değişikliği
Sedoreoviridae	dsRNA	10–12 DOĞRUSAL SEGMENTLİ	17,8–25,8	HAYIR	İKOSAHEDRAL	60–100 nm çapında
Spinareoviridae	dsRNA	9–12 DOĞRUSAL SEGMENTLİ	22,4–29,4	HAYIR	İKOSAHEDRAL	60–85 nm çapında
Tobaniviridae	ssRNA(+)	1 DOĞRUSAL SEGMENTLİ	20,2–36,2	EVET	PLEOMORFİK, ÇOĞUNLUKLA KÜRESEL	120–140 nm çapında
Togaviridae	ssRNA(+)	1 DOĞRUSAL SEGMENTLİ	11,2–12,1	EVET	KÜRESEL	65–70 nm çapında

kb/kbp; Kilobaz/kilobaz çifti
pleomorphic; Pleomorfik terimi Türkçe'de **"çok şekilli"** veya **"şekil değiştirebilen"**. Mikroorganizmalar, hücreler veya virüsler için kullanıldığında, **farklı morfolojik formlarda bulunabilme yeteneğini** ifade eder.
Filamentous; Filamentous Türkçe'de **"flamentöz"** veya **"ipliksi"**. Mikroorganizmalar, mantarlar, virüsler ve bazı hücresel yapılar için kullanılır ve **uzun, ince, iplik benzeri bir yapıyı** ifade eder.
Bacilliform; Basiliform, basil şekilli veya **çubuk şeklinde** anlamına gelir. Bakteri ve virüs morfolojisinde, **basil (çubuk) şeklinde olan yapıları** tanımlamak için kullanılır.
Lineer (linear): Doğrusal
ds: double-stranded/çift sarmallı
ss: single-stranded/ tek sarmallı
nm: nanometre
İkosahedral; Geometri ve bilimde kullanılan bir terimdir. **İkosahedral (İkosahedron)**, 20 üçgen yüzeye sahip bir çokyüzlüdür. Yunanca *"eikosi" (yirmi)* ve *"hedra" (yüzey)* kelimelerinden türemiştir. Her yüzü eşkenar üçgen olan simetrik bir çokyüzlüdür.

AKIL NOTLARI

2. Penetrasyon

- Penetrasyon, virüs çoğalmasının ikinci adımı olup hücre reseptörlerine tutunan virüsün hedef hücreye giriş aşamasını ifade eder. Hedef hücreye bağlanan virüsler, hücre içerisine genellikle endositoz veya füzyon gibi temel mekanizmalarla alınır. Birçok virüs, klatrin kaplı çukurlarda birikmiş reseptörlere bağlanarak clathrin kaplı veziküller aracılığıyla endositozla alınır. Bu veziküller, sitoplazmada endozomlara taşınır. Vezikül içeriğinin asitleşmesi, viral proteinlerde değişikliklere yol açar ve bazı durumlarda viral zarf ile endozom zarının kaynaşmasına neden olur. Hücre içerisine alınan virüsler, genellikle lizozomal enzimlerle enfeksiyonu başlatır. Bununla birlikte, bazı virüsler enfeksiyon oluşturabilmek için soyunma aşamalarını tamamlar. Paramiksovirüsler gibi füzyon mekanizmasını kullanan virüslerde, viral zarfta bulunan füzyon aktivitesine sahip proteinler, hücrenin plazma membranı ile direkt kaynaşarak viral nükleokapsidin sitoplazmaya salınmasını sağlar.
  - Penetrasyon aşamadasında virüs halen enfektiftir.
  - Penetrasyon başarısında ortam ısısı ve pH'sı ile virüs titresi kritik öneme sahiptir.
  - Reseptörlere tutunan makromoleküllerin hücreye alınması memeli hücrelerinin çoğuda endositozis mekanizmasını ile gerçekleşmektedir. Virüslerin de çoğunluğu enfeksiyonu başlatmak için bu endositozis mekanizmasını kullanılar (Şekil 3).



Şekil 3. Endositoz ile virüsün penetrasyonu

  - Vezikül içeriğinin asitleşmesi viral proteinlerde değişikliğe sebep olur. Bu değişikliklerin bir kısmında viral zarf ile endozom arasında kaynaşma gerçekleşir.
  - Hücreye alınan virüslerin büyük kısmı lizozomal enzimlerle enfeksiyonu başlatırken virüslerin bazıları soyunma safhalarından sonra enfeksiyonu oluşturur.
  - Yapılarında füzyon aktivitesi taşıyan proteinlere sahip paramiksovirüslerin gibi virüslerde kullanılan penetrasyon mekanizması ise füzyondur. Bu mekanizmada viral zarfda bulunan füzyon aktivitesine sahip proteini ile hücrenin plazma membranının direkt olarak kaynaşması (Füzyon) gerçekleşir. Füzyon sonucu viral nükleokapsidin sitoplazma içine salınmasını temin eder (Şekil 4).

İnsanlarda kullanılan topikal antiviral ilaçlar ve veteriner hekimlikteki olası kullanımları

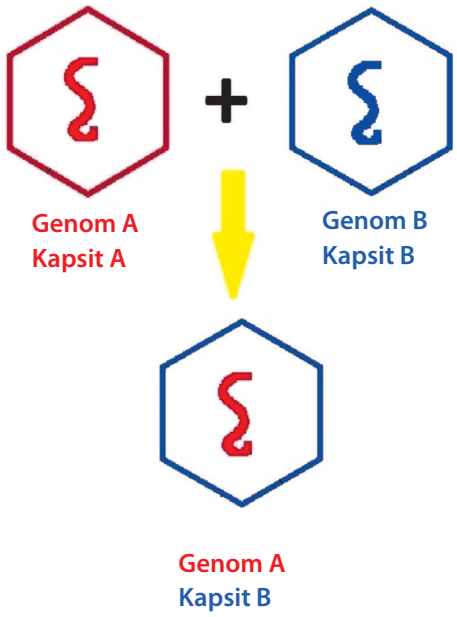
İlaç	İnsanlarda kullanımı	Veteriner Hekimlikte Olası Kullanımları
Asiklovir	Sağlıklı insanlarda genital herpes enfeksiyonlarında	Lokal Herpes enfeksiyonlarında
	Sınırlı olarak, immun sistemi baskılanmış hastalarda mukokutan enfeksiyonlarda	Sığırlarda herpes mamillitis
		Atlarda koital ekzantem
	Herpes zoster (zona) tedavisinde	Kedide rinotrakeit
		Viral keratokonjunktivit
2- Deoksi-D-glikoz	Kabul edilmemiş	Yukarıda bahsedilen lokal herpes enfeksiyonlarda
		Sığırlarda vulvovajinitte
		Keratokonjunktivitte
Fomivirsen	Sitomegalavirüs retinitis (intravitreal)	Sitomegalovirüs
Foskarnet	Genital herpes	2- Deoksi-D-glikoz ile aynıdır
İdoksuridin	Herpes simpleks keratitis	2- Deoksi-D-glikoz ile aynı
		Kedide herpesvirus keratitis
Metisazon	Topik olarak kullanılmamaktadır.	Sığır vaccinia veya sığırlarda yalancı çiçek hastalığında meme başı lezyonlarında
Ribavirin	Influenza ve respiratuar sinsityal virüs enfeksiyonunda aerosol olarak	Kedi hariç lokal herpes enfeksiyonlarında
		Vaccinia meme başı lezyonlarında
Trifluridin	Herpetik keratit	2- Deoksi-D-glikoz ile aynıdır (Felin herpesvirus keratit için tedavi seçeneğidir.)
Vidarabin	Herpes keratit	Lokal sığır herpes ve meme başı lezyonlarında

Tablo 1.Bazı antiviral ilaçların hayvan türlerine ve enfeksiyonlara göre kullanımı.

İlaç	Form	Kullanılan Türler, Doz, Uygulama ve Sıklık	Endikasyon (Hedef Virüsler)	Notlar
Idoksuridin	%0,1 göz damlası veya %0,5 göz merhemi	Kedi, köpek, at: Etkilenen göze 1 damla veya ¼ inç şerit, ilk 48 saat her 2-3 saatte bir, ardından her 4-6 saatte bir, klinik belirtilerin düzelmesinden 1 hafta sonrasına kadar.	Göz herpes virüsü (FHV-1, CHV-1, EHV-2)	ABD'de ticari olarak mevcut değil, gıda hayvanlarında kullanım onaylı değil.
Trifluridin	%1 göz damlası	Kedi, köpek: Etkilenen göze 1 damla, ilk 2 gün her 2 saatte bir, ardından 3-8 kez günlük, belirtilerin düzelmesinden 1 hafta sonrasına kadar. Maksimum 3 hafta kullanım.	Göz herpes virüsü (FHV-1, CHV-1)	Glokomu olan hastalarda dikkatli kullanılmalı, kedilerde göz tahrişine neden olabilir.
Vidarabin	%3 göz merhemi	Kedi, köpek: 0,4-1 cm'lik şerit, her 5-6 saatte bir, belirtilerin düzelmesinden 1 hafta sonrasına kadar.	Göz herpes virüsü (FHV-1)	ABD'de ticari olarak mevcut değil.
Sidofovir	%0,5 göz damlası (75 mg/mL enjeksiyondan hazırlanır)	Kedi: Etkilenen göze 1 damla, her 12 saatte bir, 5 gün boyunca.	Göz herpes virüsü (FHV-1)	Teratojenik olabilir, hamile hayvanlarda dikkatli kullanılmalı.

Devamı >

- Zarsız virüsler arasında fenotipik karışım transkapsidasyon (kapsit değişimi) olarak adlandırılır (Şekil 5.6).
- Örneğin; poliovirüs nükleik asidi, koksakivirüs kapsidine alınabilir veya adenovirüs tip 7 genomu, adenovirüs tip 2 kapsidi içinde yer alabilir. Kapsitte bulunan viral ligandlar, hücre tropizmini değiştirebilir.



Şekil 5.6. Transkapsidasyon

VİRAL GENOM HARİTALAMASI VE VİRAL EVRİM

- Günümüzde, viral DNA veya RNA'nın tam dizisi doğru bir şekilde belirlenebilmektedir. Bu süreç, viral genomun karakterizasyonunda kullanılan enzimatik kesim yöntemleriyle elde edilen oligonükleotidlerin haritalanması ile yapılır. Bu teknikler, büyük genomlu virüsler için hala önemli ve kullanışlıdır. Viral genom haritalaması, virüslerin genetik yapısını anlamada temel bir araçtır ve evrimsel süreçlerin izlenmesine olanak sağlar.
- Viral DNA veya RNA'nın dizisinin belirlenmesi, virüslerin genetik çeşitliliğini ve farklı suşlarını tanımlamak için önemlidir. Oligonükleotid haritalama ve restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (RFLP) gibi yöntemler, virüslerin evrimsel olarak nasıl değiştiğini ve genetik özelliklerin evrimsel baskılar sonucu nasıl ortaya çıktığını gösterir. Bu analizler, virüslerin evrimsel stratejilerini ve geçirdikleri genetik değişiklikleri anlamamıza yardımcı olur.

Reseptöre dayalı olmayan ve mitokondri bazlı olarak gelişen bu yolakta intraselüler sinyaller etkilidir. Bu yolakta hücresel hasarlara bağlı olarak mitokondri zarlarının geçirgenliğinin artması sonucu aktive olur. Şiddetli hücresel hasar, anti-apoptotik (örneğin, Bcl-2) ve pro-apoptotik (örneğin, Bax) moleküller arasındaki hassas dengeyi bozar ve bu durum, mitokondriden sitokrom c gibi proteinlerin sitozole sızmasına neden olur. Bu proteinler, hücresel kaspazları aktive ederek apoptoz sürecini başlatır.

Tablo 2. Bazı pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein örnekleri

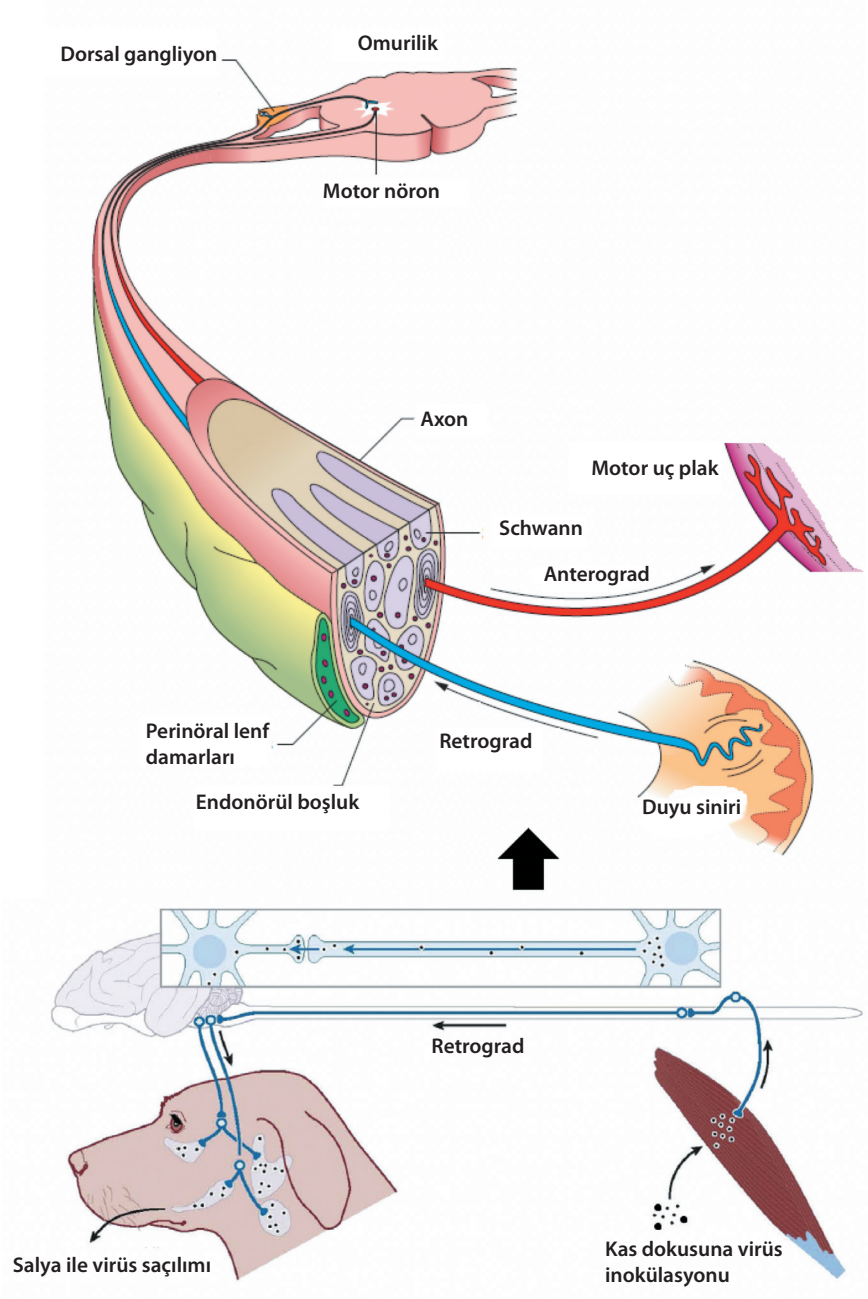
Pro-apoptotik	Anti-apoptotik
Bax	Bcl-2
Bak	Bcl-XL
Bad	Bcl-W
Bid	Bfl-1
Puma	Mcl-1

2. **Dış (Ekstrinsik, ölüm reseptör) Yolak:** Dış yolak, hücrenin transmembran reseptörlerine ligandlarının bağlanması ile apoptozise uğramasıdır. Bu yolakta tümör nekrozis faktör reseptör (TNFR) süper ailesinin üyesi olan "ölüm reseptörleri" etkilidir. Örneğin, TNF veya Fas ligandlarının hücre reseptörlerine bağlanması apoptozu başlatabilir. Aynı şekilde, virüsle enfekte hücreleri antijenlere özgü bir şekilde tanıyan sitotoksik T lenfositleri, Fas reseptörüne bağlanarak ölüm bölgesini (death domain) aktive edebilir ve kaspaz yolaklarını tetikleyerek enfekte hücreyi ortadan kaldırabilir.

4.1. Virüslerin Apoptozis ile İlişkisi

Virüslerin kodladıkları bazı moleküller (miRNA, protein gibi), enfekte hücrede apoptozisi engellemekte veya tetiklemektedir. Bunun yanı sıra aynı virüse ait bazı genler apoptozisi engellerken bazı genleri ise apoptozisi tetikleyebilmektedir. Örneğin; adenovirüsler kodladıkları E1B-19K, E1B-55K, E3-14.7K, E3-10.4/14.5K proteinleri ile apoptozisi inhibe ederlerken, adenovirüs E1A proteini ise hücre hatlarında apoptozisi indüklemektedir.

- **Apoptozisin Engellenmesi:** Konakçı hücrenin erken ölümünü engellemek ve yeni virüslerin oluşmasını sağlamak veya persiste enfeksiyon oluşumunu kolaylaştırmak için virüsler apoptozisi bloke ederler. Replikasyon süreleri daha uzun olan virüsler için apoptozis zararlı bir mekanizmadır. Çünkü apoptozis, viral replikasyon tamamlanmadan veya maksimum yavru virüsler oluşturulmadan virüslerle enfekte bu hücrelerin ölümüne neden olmaktadır. Bu nedenle bazı virüsler, apoptozisle sonuçlanacak yolakları çeşitli mekanizmalarla etkileyerek apoptozisi engellerler. Bu inhibisyon için genel olarak bazı mekanizmaları kullanırlar:
  - Kaspaz aktivitesinin bloke edilmesi
  - Ölüm reseptörlerinin (Fas, TNFR gibi) açıklanmasının, aktivasyonunun ve sinyalizasyonunun engellenmesi
  - Virüsler tarafından anti-apoptotik protein homologlarının kodlanması
  - Pro-apoptotik p53 proteinine etki eden viral proteinler üretilmesi
- **Apoptozisin İndüklenmesi:** Viral enfeksiyonlarda hücrede artan virüs sayısı ile apoptozis indüklenebilmektedir, bu sayede yangısal olaylar gelişmeksizin komşu hücrelere virüsün



Şekil 4. Isırılma sonrası Kuduz (Rabies) virüsünün kaslarda başlayan primer enfeksiyonu, nöron içinde yönlendirilmiş taşıma (retrograd ve anterograd) ve salya ile viral saçılımı.

Norkin LC. Modes of Virus Infection and Disease. Virology: Molecular Biology and Pathogenesis. Washington DC: ASM Press; 2009. 50-79.
MacLachlan NJ., Dubovi EJ, eds. 5 th ed. Fenner's Veterinary Virology. London, Academic Press; 2016. p. 47-78.

ona duyarlılığı belirler. Virüs ve konak, adaptasyon için faydalı mutasyonlar geliştiren bir evrimsel yarış içindedir. **GWAS** (Genomik Genetik Bağlantı Çalışması- Genome-Wide Association Studies), bir organizmanın genetik yapısındaki varyasyonlarla belirli hastalıklar veya özellikler arasındaki bağlantıları inceleyen bir araştırma yöntemidir. GWAS ve yüksek verimli dizileme teknolojileri, enfeksiyona duyarlılığı veya direnci belirleyen genetik faktörleri keşfetmekte önemli rol oynar.

KONAKÇI DİRENCİNİN GENETİK BELİRYECİLERİ

İmmun Tepki Genleri

- Kemokin ve sitokin tepkileri, viral enfeksiyonlara karşı koruyucu yanıtların düzenlenmesinde hayati bir öneme sahiptir. Bu son derece güçlü moleküllerin sıkı bir şekilde düzenlenmesi, morbidite ve mortaliteyi önlemek için gereklidir.
- IFN-I ve IFN-III temel antiviral sitokinlerdir; Bazı virüsler interferonların gecikmiş ve/veya aşırı üretilmesini, kontrolsüz yangı ve doku iyileşmesinin bozulmasıyla sonuçlanan bir dizi olayı tetikler. Bu bağlamda, belirli genetik arka planlarda IFN-I reseptör eksikliği, influenza virüsü ve SARS-CoV-1 enfeksiyonları sonrasında morbiditeyi ve doku harabiyetini azaltır.
- Sığır lökoz virüsü (BLV), Kuzey Amerika'daki süt sığırı sürülerinde sıkça görülen enzootik bovin lökozisin (lökozis) etkenidir. BLV enfeksiyonu, sürekli lenfositoz ve tümörlere yol açabilir ve üretim, bağışıklık ve doğurganlıkta azalmayla ilişkilidir. Tedavi ya da aşı bulunmaması nedeniyle, yönetim ve sürüden çıkarma yoluyla lökozis yaygınlığını azaltma çabaları henüz başarılı olmamıştır. Genetik seleksiyon, süt sığırlarında lökozise karşı direncin kalıcı olarak artırılmasına katkıda bulunacağı düşünülmüştür. GWAS kullanılarak lökozis direnci için belirlenen aday genlerin, 23. kromozomda yer aldığı ve bazılarının majör histokompatibilite kompleksi (MHC) içinde bulunduğu tespit edilmiştir. Bu da, lökozis direncinin genetik seleksiyon programlarına dahil edilmesi potansiyelini ortaya koymakla birlikte aynı MHC mutasyonlarının lökoz hastalığına duyarlığı etkilediğini göstermiştir. BLV, ABD'deki sığır işletmelerinin %78'inin ve sığırların %38'inin BLV'ye seropozitif olduğunu tahmin etmektedir. Süt sığırları üzerinde yapılan çalışmalar, bovin lökosit antijeni (BoLA) DRB3 geninin belirli allelleriyle ilişkili proviral yük kullanılarak hastalık direnci veya duyarlılığı tespit etmiştir. Bovine lösemi virüsü (BLV), bağışıklık sistemindeki genetik çeşitlilik, bazı hastalıklara karşı daha iyi bir koruma sağlayabilir. BLV'ye karşı bağışıklıkta önemli bir gen olan BoLA-DRB3'ün heterozigot (farklı iki gen aleline sahip) olan sığırlarda, hastalığa karşı bir avantaj sağladığı rapor edilmiştir.

Virüslere Duyarlılık/Dayanıklığı Etkileyen Diğer Genler ve Faktörler

- Bovine viral diarrhea virus (BVDV), dünya genelinde sığırların sağlığını ve refahını olumsuz etkileyen en önemli virüslerden biridir. CRISPR aracılığıyla homolojiye dayalı onarım ve somatik hücre nükleer transfer yöntemleri kullanılarak, BVDV'nin CD46 bağlanma bölgesinde altı amino asit değişikliği bulunan bir buzağı üretilmiştir. Bu buzağı, viral enfeksiyonun olmamasıyla ölçülen şekilde enfeksiyona karşı önemli ölçüde direnç göstermiştir. CD46 genindeki hedefli değişikliklerin, BVDV'ye bağlı hastalıkların azaltılmasında etkili olabileceği ilk kez kanıtlanmıştır. Bu yaklaşım, hayvan refahını artırma, sığır üretiminin sürdürülebilirliğini sağlama ve antibiyotik kullanımını azaltma potansiyeline sahiptir.

aşırı miktarda hormon salgılayarak çeşitli vücut sistemlerinin işlevlerinde sorunlara neden olmasıdır.

TEMEL ONKOLOJİK TANIMLAR

- **Adenom:** Mide, bağırsak veya kolon gibi epitel bezlerinden kaynaklanan iyi huylu bir tümör.
- **Adenokarsinom:** Organ ya da bezlerde genellikle mukokada oluşan karsinom türüdür. Yumuşak doku boyunca kolayca yayılabilir.
- **Skuamöz Hücreli Karsinom:** Skuamöz epitelde başlar ve vücudun birçok bölgesinde görülebilir.
- **Benign:** Çevresindeki dokulara ilerlemeyen, bulunduğu yerde lokalize kalan ve çevre dokuyu istila etmeyen anormal hücre çoğalması sonucu oluşan bir büyümedir. (İyi huylu tümör)
- **Kanser:** Hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla ortaya çıkan hastalık.
- **Karsinogenez:** Kanserin geliştiği çok aşamalı süreç.
- **Karsinom:** Epitel dokusundan kaynaklanan kanser türü.
- **Endotelyom:** Endotel hücrelerinden kaynaklanan kanser.
- **Fibropapillom:** Bağ dokusu hücrelerinden oluşan katı bir tümör.
- **Hepatoselüler karsinom:** Karaciğer hücrelerinden kaynaklanan bir kanser türü.
- **Lösemi:** Lökosit kökenli kanserdir ve kan hücrelerinin üretildiği kemik iliğinde gelişir. Genellikle olgunlaşmamış beyaz kan hücrelerinin aşırı üretimi ile ilişkilidir. (Kan kanseri)
- **Lenfoma:** Lenfatik sisteme ait damarlar, düğümler, dalak, bademcik ve timus gibi doku ve organlarda gelişen lökosit kökenli kanserlerdir.
- **Malign:** Yerel olarak invaziv olan ve vücudun diğer bölgelerine de yayılabilen (metastaz yapan), ilerleyici ve ölümcül doğada olan tümörlerdir. (Kötü huylu tümör)
- **Metastaz:** Birincil tümörden uzak bölgelerde oluşan ikincil malign büyümeler.
- **Miyelom:** Kemik iliğindeki plazma hücrelerinde başlayan kanserdir.
- **Neoplazm:** Anormal yeni büyüme (tümör).
- **Onkojenik:** Tümör oluşturan.
- **Retinoblastom:** Retina hücrelerinden kaynaklanan kanser.
- **Sarkom:** Mezenkimal kökenli bağ doku kanserleridir. Kemik, tendon, kıkırdak, kas ve yağ dokuda oluşabilir.
- **Tümör:** İltihaptan kaynaklanmayan anormal doku büyümesinin genel tanımıdır; iyi huylu veya kötü huylu olabilir.

2. HÜCRE TRANSFORMASYONU VE ONKOGENEZİN TEMELLERİ

- Kanser, kontrolsüz hücre bölünmesi ile gelişen bir hastalıklar kompleksidir ve nedenleri arasında kalıtsal mutasyonlar, çevresel kanserojenlere maruz kalma veya virüsler dahil olmak üzere bazı patojenlerle enfeksiyon bulunabilir. Bazı DNA ve RNA virüs ailesine ait virüsler, insan kanserlerinin %15-20'sine neden olur veya katkıda bulunur.

2.1. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi

- Genomu korumak, hücrenin hayatta kalımını sürdürmek ve mutasyonları önlemek için hayati öneme sahiptir. DNA replikasyonu ve kromozom ayrılması, genom stabilitesi açısından doğal olarak zorluklar barındırır ve hücre, bu iki temel hücre döngüsü olayını sıkı bir şekilde koordine etmek için karmaşık mekanizmalar geliştirmiştir. Bu sayede genetik materyalin doğru bir kopyası nesilden nesile aktarılır. Hücrelerin büyüme ve bölünme kapasitesi, hücrenin aldığı veya ürettiği uyarıcı ve engelleyici sinyalleri entegre eden bir protein grubu tarafından kontrol edilir. DNA sentezi ve kromozom çoğaltılması, bir önceki hücre bölünmesi tamamlanmadıkça ve hücre dışı ve içi ortamlar uygun olmadıkça başlatıl-

- Bunun yanı sıra insanlarda da Epstein-Barr virüsü (EBV) ve Kaposi sarkoma ilişkili herpesvirüsü (KSHV), çeşitli kanserlere neden olabilir. EBV, özellikle Burkitt lenfoma gibi tümörlerde bulunur ve hücre çoğalmasını teşvik eden, apoptozu engelleyen ve genomik kararsızlık oluşturan proteinler üretir. KSHV, B hücrelerini ve endotelyal hücreleri enfekte ederek Kaposi sarkomu ve diğer tümörlere yol açar. Her iki virüs de hücre döngüsü, apoptoz ve hücre hayatta kalma süreçlerini etkileyerek kanser gelişimini destekler. Epstein-Barr virüsü (EBV) ve Kaposi sarkoma ilişkili herpesvirüs (KSHV) ile ilgili genetik özelliklerin ve proteinlerin onkogenetik etkilerini özetleyen açıklayıcı bir tablo bulunmaktadır:

Tablo. Onkojenik herpesvirüslerin önemli genleri ve fonksiyonları

Virüs	Viral Protein/Gen	İşlev ve Onkogenetik Etkiler
Epstein-Barr Virüsü (EBV)	**EBNA1**	Hücre çoğalırken viral genom replikasyonu sağlar, apoptozu inhibe eder, ROS üretir, hücre hayatta kalmasını artırır, B-hücre neoplazisini tetikler.
	EBNA2	Hücresel ve viral genleri aktive eder, c-Myc ve MYC genlerini düzenler, T-hücre tümörlerinin gelişimine katkı sağlar.
	EBNA-3C	c-Myc stabilizasyonu sağlar, hücre döngüsü kontrol noktalarını modüle eder, p27 ve Rb üzerinde etkiler yaratır.
	LMP1	Apoptozu engeller, hücre proliferasyonunu artırır, inflamasyonu düzenler, anjiyogenik ve metastatik süreçlere katkı sağlar.
	LMP2A	B-hücre reseptörü taklidi yaparak B-hücrelerinin çoğalmasını sağlar, apoptoz ve hücre döngüsü düzenlemesi üzerine etkiler yapar.
	EBERs	PI3K/Akt sinyal yolunu aktive eder, tümör baskılayıcı PKR'yi ve hücre döngüsü inhibitörleri p21 ve p27'yi baskılar, G1/S geçişini teşvik eder.
Kaposi Sarkoma İlişkili Herpesvirüs (KSHV)	**K Siklin**	G1/S geçişini başlatır, DNA replikasyonunu aktif eder, apoptozisi inhibe eder, hücrelerin çok çekirdekli hale gelmesine neden olur, onkogenezde önemli bir rol oynar.
	LANA	KSHV'nin epizomlarını kopyalar, p53, p73 ve pRB'yi antagonize eder, hücre hayatta kalmasını destekler, epigenetik düzenleme ve bağışıklık yanıtlarını modüle eder.
	vCYC	Hücre döngüsüne müdahale eder, S fazına geçişi destekler, yaşlanma yanıtını (OIS) indükler, latent hücrelerin çoğalmasını sağlar.
	vFLIP	NF-κB aktivasyonu sağlar, anti-apoptotik etkiler gösterir, IL6 ekspresyonunu artırır, lenfoma oluşumuna katkıda bulunur.
	vGPCR	Anjiyogenezi artırır, VEGF ve anjiyopoietin ekspresyonunu artırarak KS gelişimine katkı sağlar, PI3K/Akt/mTOR yolunu aktive eder.

Devamı >

- BLV ile enfekte hayvanların klinik ilerleyişinde yer alan önemli bir faktör, bağışıklık yanıtını belirlemede kritik bir rol oynayan sığır lökosit antijeni (bovine leukocyte antigen; BoLA) sistemidir. Çeşitli çalışmalar, sığırlarda işlevsel olarak önemli ve en polimorfik BoLA sınıf II lokusu olan BoLA-DRB3'teki genetik varyasyonların, lenfoma ve kalıcı lenfositoz dahil olmak üzere çok çeşitli enfeksiyon hastalıklarına karşı direnç ve duyarlılığı etkilediğini ve BLV proviral yükünü etkilediğini göstermiştir. BLV ile enfekte B-lenfositlerin monoklonal genişlemesine duyarlılık, BoLA sistemi içindeki belirli alleller ile ilişkili bulunmuştur.

Tablo. BLV proteinleri ve işlevleri

Protein	*İşlev*
Tax	Viral ekspresyonun transkripsiyonel aktivasyonu Onkojenik potansiyel NF-kappa B (NF-κB) yolunun aktivasyonu
Rex	Viral mRNA'ların nükleer ihracı
G4	Yüksek viral yükün korunması Onkojenik potansiyel
R3	Yüksek viral yükün korunması

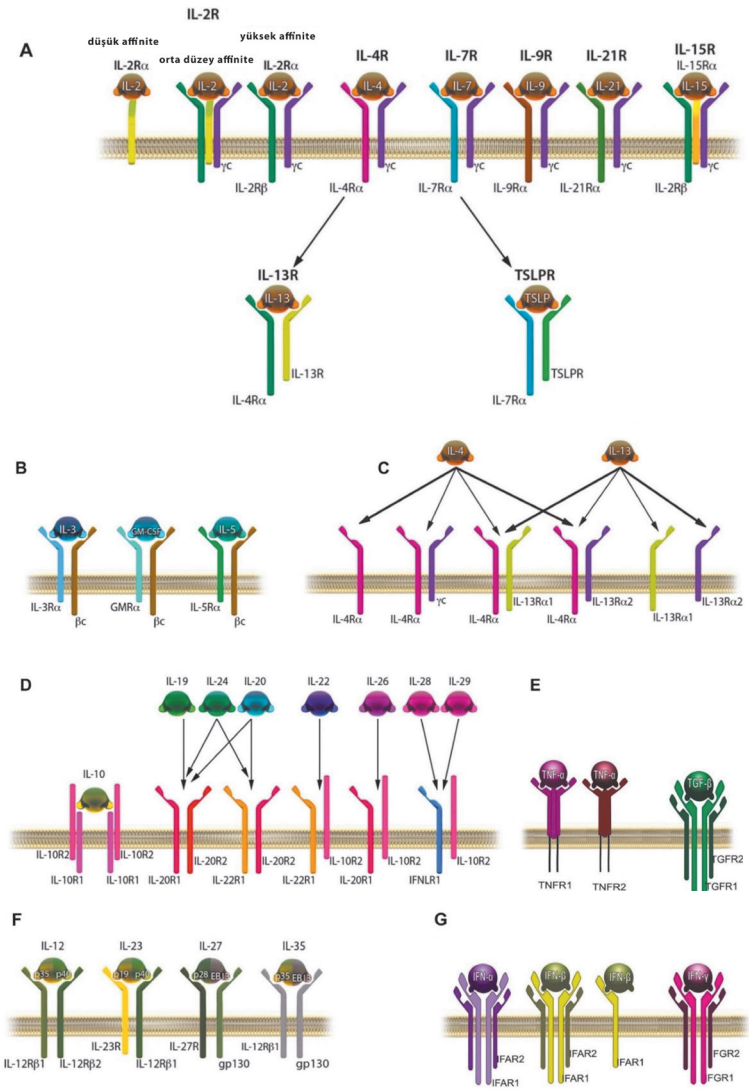
6.2.8. Primat T-lenfotropik virüsleri

- Primat T-hücre lenfotropik virüsü 1 ve 2 (Human T-cell lymphotropic virüs; HTLV-1 ve -2) Retroviridae ailesinde insanlarda tümör oluşturan virüslerdir. HTLV-1'e ait proteinler ve bunların onkogenezdeki rolleri Tablo'da özetlenmiştir.

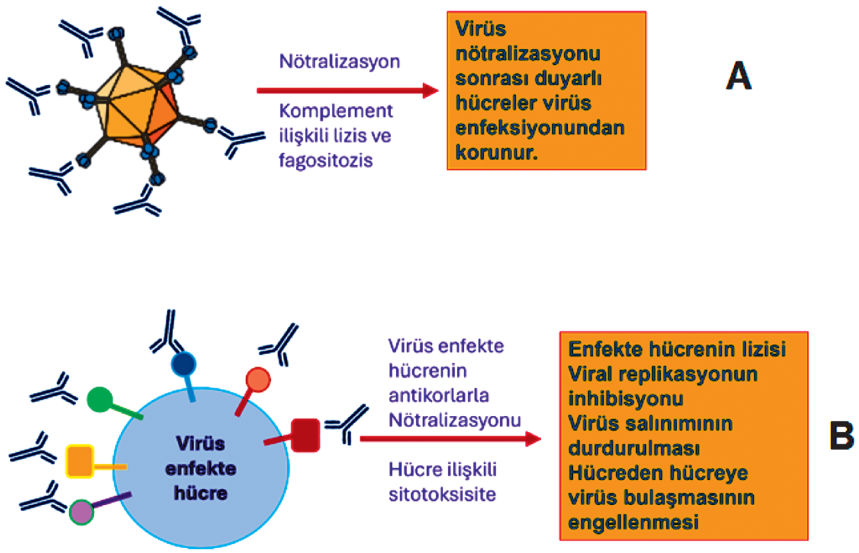
Tablo. HTLV-1 proteinleri ve işlevleri

Protein	İşlev
Tax	Viral ekspresyonun transkripsiyonel aktivasyonu Onkojenik potansiyel DNA hasarı, hücresel yaşlanma ve apoptozun indüksiyonu Birçok hücresel proteinin doğrudan bağlanma yoluyla işlevsel düzenlenmesi
HBZ	HTLV-1 transkripsiyonunun inhibisyonu NF-kappa B (NF-κB) klasik yolunun baskılanması TGF-β sinyallemesinin artırılması Onkojenik potansiyel
Rex	Viral mRNA'ların nükleer ihracı
p12I	Viral enfektivitenin korunması Aktive edilmiş T-hücrelerin nükleer faktörü (NFAT) yolunun aktivasyonu
p13II	Viral replikasyonun baskılanması Farnesil pirofosfat sentetaz ile etkileşim Ras aracılı apoptozun aktivasyonu
p30II	Viral replikasyonun baskılanması p300 ile bağlanma yoluyla gen transkripsiyonunun düzenlenmesi Myc dönüştürme potansiyelinin artırılması

Doğal Öldürücü (Natural Killer, NK) Hücreleri	• NK hücreleri, enfekte olmuş hücrelere bağlanarak hedef hücrenin zarını bozan perforin ve hücreyi öldüren granzim enzimlerini salgılar. Bu, hedef hücrenin zarını delinmesine ve hücrenin ölmesine yol açar. • NK hücreleri doğrudan enfekte hücreyi öldürdükten sonra, bağışıklık sistemi hücreleri, özellikle makrofajlar ve dendritik hücreler, hücresel döküntüleri temizler. • NK hücreleri, virüs enfeksiyonlarının kontrol edilmesinde önemli rol oynar, çünkü virüsleri enfekte eden hücreleri doğrudan öldürür. Bu şekilde virüsün yayılmasını da engeller. • NK hücreleri aynı zamanda sitokinler (özellikle IFN-γ) ve interferon salgılar. İmmün regülasyonda da görevlidir.
İnterferon	• İnterferonlar, virüs enfekte hücrelerden salgılanan proteinlerdir ve antiviral yanıtı sağlarlar. • Çift iplikli RNA (dsRNA) virüsleri, bağışıklık sisteminde interferon (IFN) yanıtını güçlü şekilde tetikleyen viral patojenler arasındadır. • İnterferonlar, enfekte olmayan hücrelerin virüs reseptörlerine bağlanarak virüsün hücreye girişini engeller, antiviral protein üretir ve apoptoz yolaklarını aktive eder. (İnterferonların ilgili mekanizmaları için ayrıca bölüm 4'e bakınız.)
PRR-PAMP bağlantısı	• PRR (Pattern Recognition Receptors-Motif Tanıyan Reseptörler), vücutta bulunan ve hücre yüzeyinde bulunan özel proteinlerdir. Bu reseptörler, virüslerin ve diğer mikroorganizmaların yüzeyinde bulunan özel molekülleri, yani PAMP'ları (Patojen İlişkili Moleküler Motifler) tanır. Bir virüs vücuda girdiğinde, bu PAMP'lar PRR'ler tarafından tanınır ve bu tanıma, hücrede antiviral yanıtı başlatan içsel bir sinyalizasyonu tetikler. • PRR ailesinden bazı önemli reseptörler şunlardır: Toll benzeri reseptörler (TLR'ler): PAMP'ları tanıyan ve bağışıklık yanıtını başlatan en önemli reseptörlerden biridir. • Retinoik asit ile indüklenebilir gen I (RIG-I) benzeri reseptörler (RLR'ler): Bu reseptörler, viral enfeksiyonlarda aktif olan diğer PRR'lardır. • PAMP'lar farklı yapılar içerebilir; proteinler, lipitler veya karbonhidratlardan oluşabilir. Virüsler, özellikle viral PAMP'lar, bağışıklık sisteminin hücrelerinde bulunan tip-I interferonlar (IFN-α ve IFN-β) salınımını tetikleyerek, enfeksiyonun yayılmasını engellemeye çalışır. Bu şekilde bağışıklık yanıtı başlar ve vücut, enfeksiyona karşı savunma yapar.



Şekil 5. Sitokin Reseptörleri: A: IL-2 ailesinin reseptörleri: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 ve IL-21'den oluşur. Bu reseptörler, ortak sitokin reseptör γ zincirini (CD132, γc) içerir. IL-13R, IL-4 ile IL-4Rα alt birimini paylaşırken, TSLPR ise IL-7R alt birimini IL-7 ile paylaşır. B : IL-3, IL-5 ve GM-CSF reseptörleri, benzersiz bir α zinciri ve ortak β zincirinden (βc, CD131) oluşan heterodimerlerdir. C : IL-4 ve IL-13 reseptörleri, IL-4Rα (CD124) ve γc olmak üzere iki reseptör zincirinden oluşur. IL-4 ve IL-13, IL-4Rα ve IL-13Rα1 zincirlerinden oluşan IL-4R kompleksine bağlanır. IL-13R, IL-13Rα1 ve IL-13Rα2 olmak üzere iki alt birim içerir. Sinyal iletimi, IL-4Rα ve IL-13Rα'dan oluşan tip II IL-4R kompleksi aracılığıyla gerçekleşir. D : İntron-ekzon yapılarındaki benzerlikler, korunmuş ikincil protein yapıları ve benzer reseptör türlerine dayanarak, şu sitokinler IL-10 ailesi üyeleri olarak sınıflandırılmıştır: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 ve IL-29. Bu sitokinler, ortak reseptör alt birimlerini paylaşır. E : TNF-α, TNFRI ve TNFR2'ye, TGF-β ise TGF-βR1 ve TGF-βR2 heterodimer reseptörüne bağlanır. F : IL-12R, IL-12Rβ1 ve IL-12Rβ3 olmak üzere iki alt birimden oluşur. IL-23R ile IL-12Rβ1'in oluşturduğu heterodimer, IL-23'e bağlanır. IL-12Rβ2, IL-27R'nin gp130 alt birimiyle yapısal benzerlik gösterir. G : IFN-α ve IFN-β, IFNAR1 ve IFNAR2 heterodimer reseptörüne bağlanır. Ayrıca, IFN-β IFNAR1'e, IFN-γ ise IFN-γR1 ve IFN-γR2 heterodimerine bağlanarak etki gösterir (Akdis M ve ark 2016).



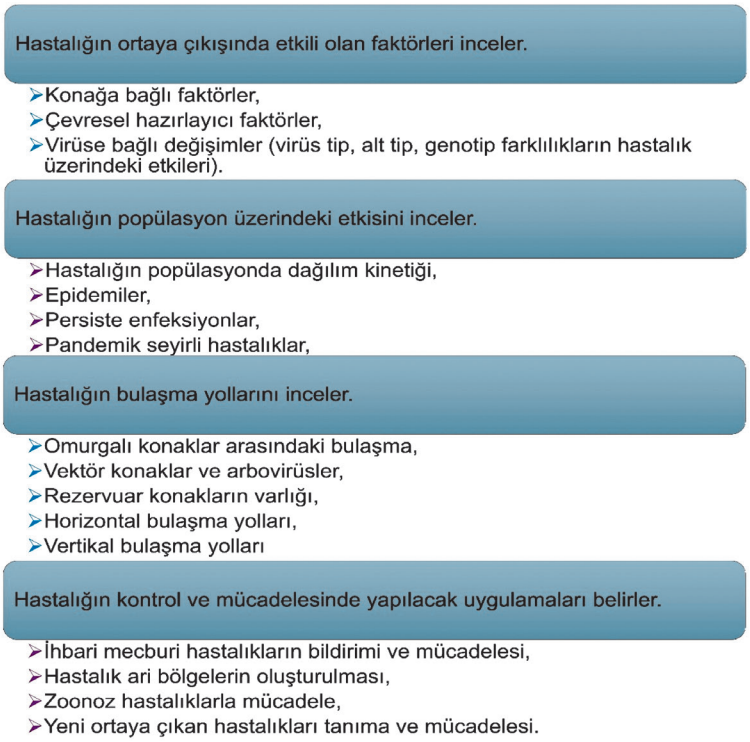
Şekil 10. Vücut sıvılarında serbest dolaşan virüsler, zarf (zar) veya kapsid proteinlerindeki epitoplar aracılığıyla nötralizan antikorlar tarafından tanınarak etkisiz hale getirilir. Virüs antijenik determinantlarının çeşitliliği, nötralizan antikor yanıtının etkinliğiyle doğrudan ilişkilidir. Bu süreç, virüslerin duyarlı hücrelere girişini engelleyerek enfeksiyon yayılımını azaltır.

A) Serbest haldeki virionlar antikor ile birleşmesi komplement sistemini aktive eder. Komplement antijen antikor komplkesine bağlanır ve Antijen+antikor+komplement kompleksi oluşur.

B) Virüs enfekte hücrelerin yüzeyindeki antijenik determinantlara spesifik antikorların bağlanması da komplement sistemini de aktive eder. Antikor-antijen kompleksi oluştuktan sonra klasik komplement yolu tetiklenir. Virüsle enfekte hücrelerin yüzeyinde viral proteinlerin sunulması, nötralizan antikorların antikor bağımlı hücresel sitotoksisite (ADCC) veya komplement aracılı sitotoksisiteyi tetiklemesini sağlar. Antikorlar hedef enfekte hücrenin yüzeyinde sergilenen viral antijenlere (antijenik determinantlara) bağlanır ve hücre yüzeyini kaplar. Yüzeylerine antikorlar bağlanan enfekte hücreler, NK hücreleri, sitotoksik T hücreleri tarafından tanınır ve antikorun Fc bölgesine bağlanır. Virüsle enfekte hücreler sitotoksik etkiyle lize edilir ve apoptozis ile hücre ortadan kaldırılır.

11. PRİMER ENFEKSİYON VE SEKONDER ENFEKSİYONLARDA İMMÜNİTE

- Bir organizma virüsle ilk kez karşılaştığında, oluşturulan primer immün yanıt genellikle hız ve etkinlik açısından sınırlıdır ve her zaman tam koruma sağlayamayabilir. Primer enfeksiyon sonrası immün hafızanın (bellek) oluşması, organizmanın aynı patojenle ikinci kez karşılaşmasıyla daha güçlü bir yanıt geliştirmesine olanak tanır. Sekonder immün yanıt, önceden aktif edilmiş hafıza B ve T hücreleri sayesinde daha hızlı ve etkili olup, viral replikasyonu erken aşamada baskılayarak enfeksiyonun kontrol altına alınmasını sağlar.
- Sekonder immün yanıtta, antijenle tekrar karşılaşan bellek B hücreleri, yardımcı T hücrelerinin desteğine gerek duymadan hızla antikor üretir. İzotip değişimi (class switching) ve afinite maturasyonu (affinity maturation) süreçleri primer immün yanıtta gerçekleştiği için sekonder yanıt sırasında tekrarlanmaz. Bu nedenle, sekonder immün yanıt, yüksek afiniteli antikorlarla karakterizedir ve primer yanıta kıyasla daha kısa sürede en yüksek seviyeye



Şekil 1. Viral epidemiyoloji içerisinde başlıca araştırma alanları ve konuları.

- **Seroepidemiyoloji:** Serolojik veriler kullanılarak epidemiyolojik ölçümlerin belirlenmesi temeline dayanır. Özellikle viral hastalıkların yaygınlığının ölçülmesi, kontrol ve eradikasyon programlarının uygulama ve izlenmesinde, aşı programların uygulanmasında, bağışıklığının değerlendirilmesinde kullanışlıdır.
- **Moleküler epidemiyoloji:** Epidemiyolojik verilerin elde edilmesinde moleküler biyolojik yöntemlerin kullanılması esasına dayanır. Viral hastalıklara neden olan virüslerin tanımlanması, kökeni, genetik değişimleri, evrimleşme sürecinin takip edilmesinde sıklıkla tercih edilir.

HASTALIK KAVRAMI VE VİRAL HASTALIKLAR

- **Hastalık;** "organizmanın fizyolojik ve biyokimyasal normal işleyişindeki meydana gelen bozukluk ve aksaması, doku ve organlarda fizyolojik görevlerinin bozulması sonrası ortaya çıkan patolojik durumdur.
- **Prognoz;** bir hastalığın olası seyridir. Hastalığın gidişatında bireyin mevcut tedavi protokolleri sonrası kadar iyi durumda olacağını da ifade eder.
- **Profilaksi;** hastalığın kötü sonucunu önlemek amacıyla yapılan tedavi veya özellikle hastalığı önlemek için tasarlanmış protokolüdür.
- **Vaka:** Hastalık belirtisi gösteren, hastalık bildirimi yapılmış olan birey.
- **Temaslı Birey:** Enfekte bir kişi, hayvan veya çevreyle, o enfeksiyonu edinme olasılığına yol açan bir epidemiyolojik ilişkisi olmuş kişidir.

MORBİDİTE:

- **MORBİDİTE:** Hastalığın popülasyon içerisindeki görülme oranını ifade eder. Diğer bir ifadeyle hastalığın yayılım yüzdesini tanımlar.

- Popülasyonda enfeksiyon belirtileri gösteren enfekte bireylerin sayısını gösterir.

Formülü:

Morbidite Oranı:

$$\frac{\text{Bir popülasyondaki hasta hayvanların sayısı}}{\text{Popülasyonda bulunan riskteki toplam hayvan sayısı}}$$

Viral hastalıkların popülasyondaki yayılımını etkileyen pek çok faktör vardır.

- Virüsle konağın karşılaşma riski
- Virüsle karşılaşacak duyarlı konak sayısı
- Virüsün konağa geçişini kolaylaştıracak veya hızlandıracak faktörler

MORTALİTE:

- **MORBİDİTE:** Hastalığın popülasyon içerisindeki ölüm oranını ifade eder. Diğer ifadeyle ölüm insidansını tanımlar.

- Mortalite oranı, belirli bir zaman diliminde enfekte bireylerdeki ölümlerin tüm popülasyona göre normalize edilmiş yüzdesi olarak ifade edilir.
- Morbidite yüzdesi her zaman mortalite yüzdesinden yüksek olacaktır.

Formülü:

Morbidite Oranı:

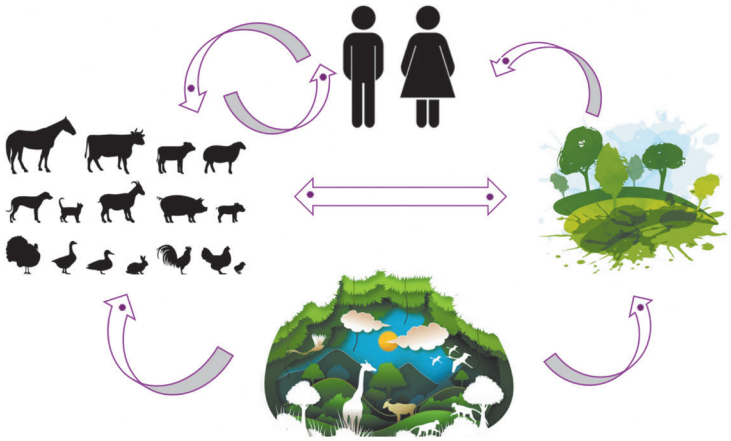
$$\frac{\text{Bir popülasyonda hastalık nedeniyle ölen hayvan sayısı}}{\text{Popülasyonda bulunan riskteki toplam hayvan}}$$

LETALİTE:

- **LELALİTE:** Hastalığa yakalanan vakalardaki gelişen ölüm oranlarını ifade eder. Vaka ölüm oranı olarak da tanımlanır.

VİRÜS-KONAK-ÇEVRE ETKİLEŞİMİ

- Viral enfeksiyonun nerede, ne zaman ve nasıl meydana geleceğini belirleyen üç temel unsur vardır (Şekil 10). Virüs, konak ve çevre faktörlerinin etkileşimi sonucu virüslerin konaklar arasında yayılım hızı değişir ve çevresel yer değişimleri ile sonuçlanabilir. Aynı zamanda bu etkileşim, enfeksiyonun hastalığa yol açıp açmayacağını, ne kadar sürede başlayacağını, nasıl ortaya çıkacağı, ne kadar şiddetli olacağını ve ne kadar süreceğini de etkiler.



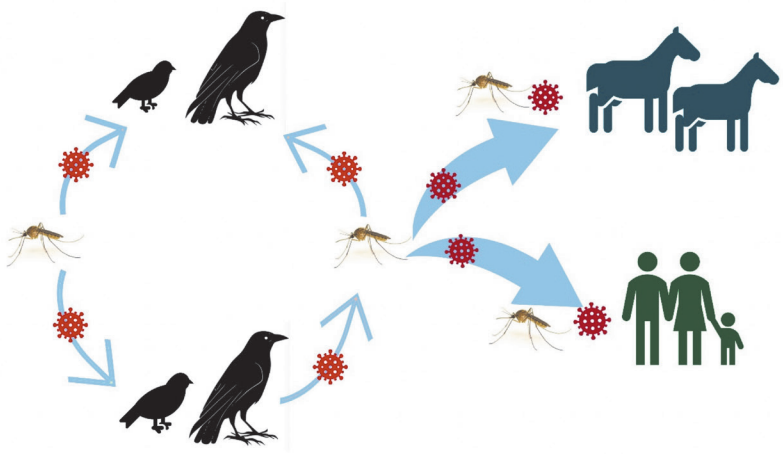
Şekil 10. Virüs konak çevre etkileşimi şematik görünümü.

- Bir enfeksiyonun başlatılabilmesi hastalık belirteçlerinin bir veya birden fazla özelliklerin uygun yapısal ve işlevsel durumda olması gerekir. Hedef duyarlı konakçı sayısı ve bu konaklarda çoğalabilecek miktarda virüs bulunması gerekir.
- Konağın ve çevrenin çeşitli özelliklerine bağlı olarak virüs, klinik olarak ortaya çıkabilen veya çıkamayan bir yanıt ortaya çıkarır. Virüsün konak bağışıklık sisteminde neden olacağı yanıtın derecesine bağlı olarak klinik hastalık şiddeti değişkenlik gösterir, kronikleşme, iyileşme veya ölüm meydana gelebilir.
- Genellikle doğal enfeksiyon sonrası oluşan bağışık yanıt, tekrar enfeksiyona maruz kalındığında ciddi bir hastalığın oluşumunu önler. Hastalığın ortaya çıkışı ve yayılma hızı azalır.
- Virüslerde meydana gelen değişimler tekrar maruz kalma durumunda hastalık şiddetini ve yayılımı etkiler.
- Hastalığın ortaya çıkışında çevresel kaynakların, virüs varlığını sürdürülmesini sağlaması durumunda hastalık varlığı popülasyonda devam eder. Vektör, rezervuar varlığı veya vahşi hayvanlarla temas doğal yollarla virüsün evcil hayvanlara ulaşmasını yol açar.

VİRAL HASTALIKLARDA BULAŞMA

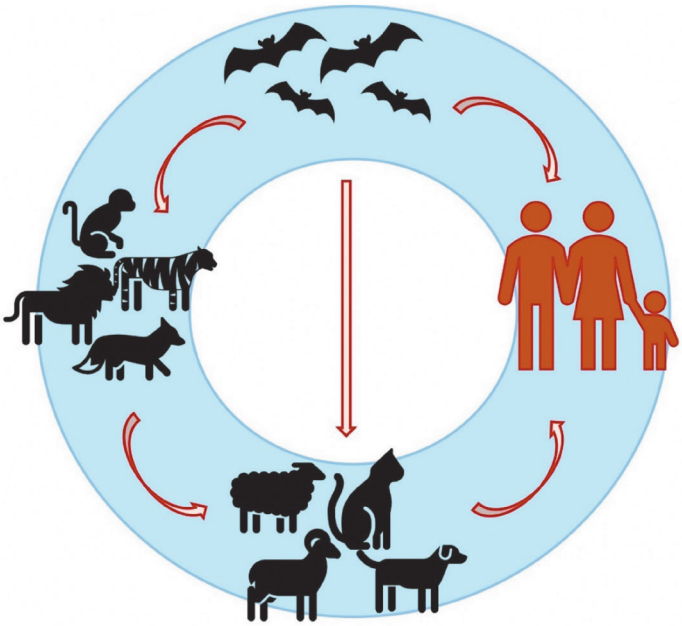
- Virüsler doğada varlığını sürdürebilmesi ancak bir konaktan diğerine, aynı veya farklı türe ait olsun, bulaşabiliyorlarsa mümkündür.
- Viral hastalıkların popülasyonda yayılımlarında konaktan konağa bulaşması etkilidir.
- Bulaşma döngüleri virüsün vücuda girmesini, organizmada çoğalması, saçılması ve ardından başka bir konak vücuduna girmesini gerektirir

- Bazı durumlarda, vektör arthropod türleri, virüsün duyarlı konağı dışında, nadiren veya hiç temasta bulunmadığı kuşlardan, sürüngenlerden ve diğer memelilerden de kan emerler. Bu konaklar virüs için omurgalı rezervuar konak olabilirler.
- Çoğu arbovirüs için evcil hayvanlar ve insanlar birincil bulaşma döngülerine nadiren dahil olurlar, vektör ve rezervuar konaklar arasında doğada devamlılıklarını sürdürürler. İnsan ve evcil hayvanlar tesadüfi konaklar olarak yer alsa da klinik hastalık tablosu bu konaklarda meydana gelir. *Örneğin Batı nil ateşi virüsü* için vektör *Culex spp, Aedes spp*. cinsi sokucu sinekler, rezervuar kuşlar iken virüs duyarlı omurgalı konaklar insan ve atlardır (Şekil 16).

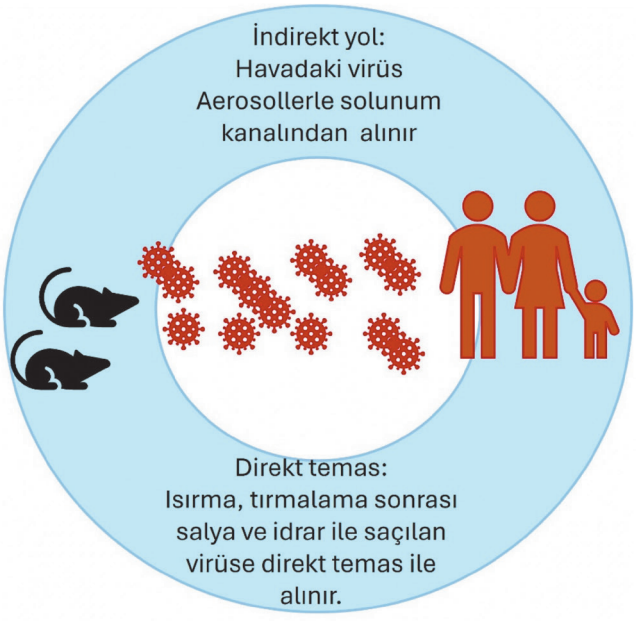


Şekil 16. Batı nil virüsünün bulaşma siklusu.

- Arbovirüsler hayvan sağlığı ve toplum sağlığında epidemilere neden olurlar. Vektör yaşam döngüsüne bağlı olarak mevsimsel olarak vektör üreme dönemlerinde yaygın olarak ortaya çıkan hastalıklar görülür.
- Salgınlar periyodik olarak vektör türlerinin endemik olarak bulunduğu bölgelerde, uygun ilkim koşullarına bağlı olarak her yıl yaygın vakalarla meydana gelir. Arbovirüs salgınlarında vektör türleri, duyarlı omurgalı konakların ve virüsün varlığı etkilidir.
- Vektörlerin aktif olmadığı ılıman iklimlerdeki kış aylarında virüsler varlığını doğada devam ettirir. Bu bilmece virüsün vektördeki çoğalma ve aktarımı ile açıklanabilir. Virüs, transovaryal ve trans-stadial bulaşma ile vektörler arasında aktarılabilir. Transovaryal bulaşma kene kaynaklı flavivirüslerde meydana gelir ve bazı sivrisinek kaynaklı bunyavirüs ve flavivirüslerde de meydana geldiği gösterilmiştir. Her üreme dönemi (ilkbahar, yaz dönemi) ortaya çıkan sivrisineklerin çoğu, transovarial ve transtadial bulaşma sonucu virüs taşır ve virüsün sivrisinek-omurgalı konak-sivrisinek döngüleriyle horizontal bulaşması sonrası miktarı artar.
- İnsanların yaşamsal tercih ve faaliyetleri doğal ekolojiyi etkiler ve dolayısıyla doğal vektör ve arbovirüs yaşam döngülerini değiştirebilir. Bu virüslerin neden olduğu hastalıkların coğrafik yayılmasında veya yaygınlığında değişikliklere neden olabilir.
- İnsanların nüfuslarının artması ve hayvanlarıyla birlikte yaşam alanlarını değiştirmesi; vektör türleri ve yabani hayvanların alanlarına göç etmelerine neden olur. Bu bölgelerde doğadaki virüslere maruz kalabilirler.

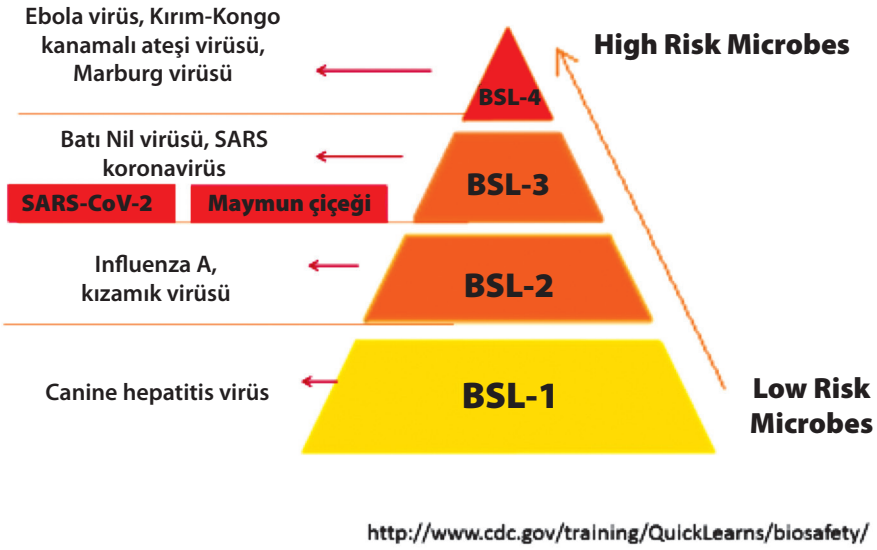


Şekil 17. Kuduz hastalığının doğada varlığının evcil, vahşi hayvanlar ve insanlar arasında bulaşması.



Şekil 18. Rodentlerle saçılan *Hantavirüs* enfeksiyonlarının insanlara bulaş yolları.

- Biyogüvenlik seviyesi, laboratuvar çalışanlarının enfeksiyöz mikrobiyal ajanlara maruz kalmasını engellemek, çevrenin kirlenmesini önlemek ve toplum ile çevreyi korumak amacıyla alınan bir dizi önlemi ifade eder. Mikrobiyolojik risk grupları dikkate alınarak laboratuvarlar dört farklı güvenlik seviyesinde tasarlanmıştır: **BSL-1, BSL-2, BSL-3** ve **BSL-4**. Her bir biyogüvenlik seviyesi, kendine özgü mikroorganizmaları ve biyolojik ajanları kapsar. Bu seviyelerin belirlenmesinde; ilgili biyolojik etkenlerin enfektivitesi, neden oldukları hastalıkların şiddeti, bulaşma yolları ve hızları gibi faktörler dikkate alınır.
- Ülkemizde 15 Haziran 2013 tarihli ve 28678 sayılı "Biyolojik etkenlere maruziyet risklerinin önlenmesi hakkında yönetmelik" ile çalışanların işyerindeki biyolojik etkenlere maruziyetinden kaynaklanan veya kaynaklanabilecek sağlık ve güvenlik risklerinin önlenmesi ve bu risklerden korunmasına dair asgari hükümleri düzenlenmektedir.



1.1. Biyogüvenlik Seviye 1 (Bsl-1) – Temel Laboratuvarlar

- BSL-1 laboratuvarları, insan sağlığına zarar verme potansiyeli olmayan, çevre ve laboratuvar personeli için minimum risk taşıyan biyolojik ajanlarla çalışmak üzere tasarlanmış temel laboratuvarları ifade eder. Bu seviyedeki laboratuvarlar, mikroorganizmalarla güvenli çalışmayı mümkün kılmak amacıyla standart mikrobiyolojik prosedürlerin uygulandığı, düşük risk grubundaki çalışma alanlarıdır. Çalışmalar açık tezgahlar (bench) veya masalar üzerinde gerçekleştirilebilir. Laboratuvarın, ana binadan ayrı olması gerekmez; bu durum, basit kurulumlarla güvenli bir ortam sağlanabileceği anlamına gelir. Kullanılan materyaller, otoklav ile dekontamine edilerek enfeksiyon riski ortadan kaldırılır. Ancak, sağlıklı bireylerde hastalık oluşturma potansiyeline sahip mikroorganizmaların bu seviyede çalışılması uygun değildir. Güvenliğin temel unsurları arasında laboratuvar önlüklerinin, eldivenlerin ve koruyucu gözlüklerin kullanımı yer alır. Eller, çalışma sonrası mutlaka yıkanmalı ve laboratuvarın dinlenme alanlarından ayrı bir yerde konumlanması sağlanmalıdır. Her ne kadar risk düşük olsa da laboratuvar personelinin temel biyogüvenlik kurallarını titizlikle uygulaması zorunludur.

4.2. Kimyasal Yapılarına Göre Dezenfektanlar

- **Fenol ve fenol bileşikleri:** Krezol, lizol, hekzaklorofen.
- **Klor ve klor bileşikleri:** Hipoklorit.
- **İyot ve iyot bileşikleri:** İyodoforlar, povidon iyot.
- **Aldehidler:** Formaldehid, Gluteraldehid.
- **Alkoller:** Etil alkol, isopropil alkol.
- **Kuarterner amonyum bileşikleri:** Benzalkonyum klorür (zefiran).
- **Amonyum komponentleri ve diguanidler:** Klorheksidin, setrimit.
- Hidrojen peroksit
- Etilen oksit

5. STERİLİZASYON

- Sterilizasyon, bir materyalden tüm mikrobiyal yaşam formlarının uzaklaştırılması veya öldürülmesidir. Sterilizasyon fiziksel, kimyasal veya mekanik yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir. Bu bölümde virolojik çalışmalarda en çok tercih edilen sterilizasyon yöntemlerine değinilecektir.

5.1. Otoklav İle Sterilizasyon

- Otoklav yüksek basınç, ısı ve nemle etkisiyle sterilizasyon sağlayan cihazdır. Dikey ve yatay tipte otoklavlar ısıya ve neme dayanıklı tüm malzemelerin ve kimyasalların sterilizasyonu amacıyla yaygın olarak kullanılır. Otoklav, 121°C'de 1.2 atmosfer basıncında, 15 dakika içinde tüm mikroorganizmaları (vejetatatif ve endospor formları dahil) inaktive ederek içindeki tüm sıvı ve katı malzemeyi steril hale getirir.
- Otoklavın sterilizasyon işlemini gözle görünür ve kontrol edilebilir hale getirmek amacıyla çeşitli indikatörler kullanılır. Sterilizasyon işlemlerinde kullanılan kimyasal indikatörler, sterilizasyonun etkinliğini doğrulamak amacıyla çeşitli değişimlere uğrar. Bu amaçla en çok kullanılan indikatör otoklav şeridir (otoklav bandı). Otoklav şeritleri, basınç altında buharla sterilizasyon işlemlerinde kullanılan önemli diğer bir kimyasal indikatörlerdir. Otoklav şeritleri, sterilizasyonun doğrulanmasında kullanılan kimyasal indikatörlerdir ve belirli sıcaklık ile basınç koşullarında renk değişimi gösterir. Genellikle 121°C ile 134°C arasındaki sıcaklıklarda etkinlik gösterir. 121°C için minimum 15 psi (1 atm) basınç gereklidir, 134°C için ise basınç genellikle 30 psi (2 atm) civarındadır. Otoklav şeritlerinde bulunan kükürt bileşikleri, buharın ısıyla birleşmesi sonucu kimyasal reaksiyona girer ve oksijenle tepkimeye girerek koyu renkli (siyah) sülfür bileşikleri oluşturur. Bu renk değişimi, şeridin sterilizasyon koşullarına maruz kaldığını görsel olarak doğrular. 121°C'de sterilizasyon süresi yaklaşık 15-20 dakika, 134°C'de ise 3-5 dakika yeterlidir.

Diğer sterilizasyon indikatörleri:

- Browne tüpleri, basınç altında buhar ya da kuru sıcaklıkta kullanıldığında kırmızıdan yeşile dönüşerek sterilizasyonun tamamlandığını gösterir.
- Steam-Clox kağıtları ise yine basınçlı buhar ortamında kullanılarak mordan yeşile dönüşür.
- Diack tüpleri, otoklav ortamında eriyerek bej renkten kırmızıya döner ve işlemin etkinliğini doğrular.
- Bowie-Dick şeritleri, basınç altında buharla sterilizasyon sırasında açık renkten koyu renge dönüşerek sterilizasyonun başarıyla gerçekleştiğini belirtir.

- Antikoagulanlı tüplere alınan kan örnekleri +4°C'de 1000 devirde 10 dakika süreyle santrifüj edilir.
- Santrifüj sonunda kan 3 tabakaya ayrılır:
- En altta eritrositler
- Ortada lökositler
- Üstte plazma
- Pastör pipeti yardımı ile lökosit tabakası çekilip 2 ml antibiyotikli PBS içerisine alınır ve pipetleme işlemi ile süspanse hale getirilir.
- Süspanse lökositler tekrar santrifüj edilir ve ardından lökosit tabakası tekrar çekilir. Bu işleme lökosit yıkama denir ve toplam 3 kez tekrar edilir.
- Lökosit yıkama işlemi tamamlandıktan sonra inokulum hazırlanmış olur.

1.3. Svab örneklerinden inokulum hazırlanması

- Transport vasatı veya antibiyotikli PBS içerisinde laboratuvara gelen svab örnekleri öncelikle çalkalayıcıda (vorteks) karıştırılır.
- Elde edilen virüslü sıvı materyal +4°C'de 3000 devir/dk hızda 10 dk santrifüj edilir.
- Süpernatant başka bir tüpe alınarak antibiyotik ilavesi yapılır.
- Süpernatant 0.22 veya 0.45 µm porlara sahip olan membran filtrelerinden filtre edilerek inokulum haline getirilmiş olur.

2. HÜCRE KÜLTÜRÜ VE SUBKÜLTÜR

- Hücre kültürü organizmadan alınan dokulardaki hücrelerin bireysel olarak ayrılması ve *in vitro* şartlarda büyütülmesi ve çoğaltılması işlemidir. Bu yöntem, genellikle canlı organizmalardan alınan hücrelerin ihtiyaç duydukları temel besin maddelerini içeren solüsyonlarla ve özel kültür şişeleri kullanılarak hücrenin kökenine ve tipine uygun sıcaklık, pH ve gaz dengesinin sağlandığı ortamlarda büyütülmesiyle gerçekleştirilir. Hücre kültürü, virolojide virüslerin izolasyonu, çoğaltılması, antiviral ve aşı çalışmalarında, antikor üretiminde ve virüslerle ilgili diğer tüm çalışmalarda kullanılmaktadır.

2.1. Hücre kültüründe kullanılan temel malzeme, kimyasal ve cihazlar

2.1.1. Vasat (Medyum)

- Hücrelerin in vitro koşullarda yaşayabilmeleri ve çoğalabilmeleri için gerekli olan besin maddelerini ve optimum koşulları sağlayan bir solüsyondur. En çok kullanılan vasatlar arasında; DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium), MEM (Minimum Essential Medium), RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640), Ham's F-12 gibi vasatlar bulunur.

Vasatların içeriğinde temel besin maddeleri yer alır. Bunlar:

- **Amino asitler:** Hücrelerin protein sentezi için gereklidir (Alanin, aspartik asit, glutamin, arginin, triptofan, vb.)
- **Karbon kaynakları:** Hücrelerin enerji üretimi için genellikle glikoz içerir.
- **Vitaminler:** Hücresel metabolizma ve enzimatik reaksiyonlar için gereklidir (Biyotin, folik asit, niasinamid, tiamin, B12 gibi).

edilmesi gerekir; aksi takdirde tüm çaba ve masraflar boşa gidebilir. Bu ünitelerde herhangi bir sızıntı olmaması için sürekli denetimler yapılır. Ayrıca, hayvanlara verilecek gıda, su ve havanın sterilitesi uzmanlar tarafından kontrol edilir. Hayvanlardan alınan idrar ve dışkı örnekleri steril olmalı, kanlarında antikor bulunmamalıdır.

- GF hayvanlar yalnızca çok önemli hastalıkların incelenmesinde kullanılırken, günlük araştırmalar için SPF hayvanların tercih edilmesi önerilir. GF hayvanların yetiştirilmesi, yüksek maliyetli ve zor bir süreçtir, ancak kritik öneme sahip bilimsel çalışmalarda vazgeçilmezdir.

DENEME HAYVANLARINA VİRUS İNOKULASYON YOLLARI

Deney hayvanlarına virusun uygulanma (inokulasyon) yolları nelerdir?

- Intradermal (Deri içi)
- Dermal scarification (Deriyi çizme)
- Intravenous (Damar içi)
- Intraperitoneal (Periton içi)
- Intranasal (Burun içi, sprey)
- Subconjuctival (Konjuktiva altı)
- Rectal (Rectumdan)
- Subcutan (Deri altı)
- Intramuscular (Kas içi)
- Intracerebral (Beyin içi)
- Intracardiac (Kalp içi)
- Intratracheal (Soluk borusu içi)
- Conjuctival scarification (Konjuktival çizik)
- Peros (Oral, ağızdan)



Resim 1. A- Farede peros uygulama (Gavaj) B- Farede İ/P uygulama
C- Tavşanda kulak venasına İ/V uygulama D- Farede kuyruk venasına İ/V uygulama

2. Chorio-Allantoik Boşluğa (CAB) Ekim:

- Bu yöntem genellikle Newcastle ve İnfluenza virüsleri için kullanılır ve 9-11 günlük embriyolu yumurtalar tercih edilir. İki farklı teknikle uygulanır:

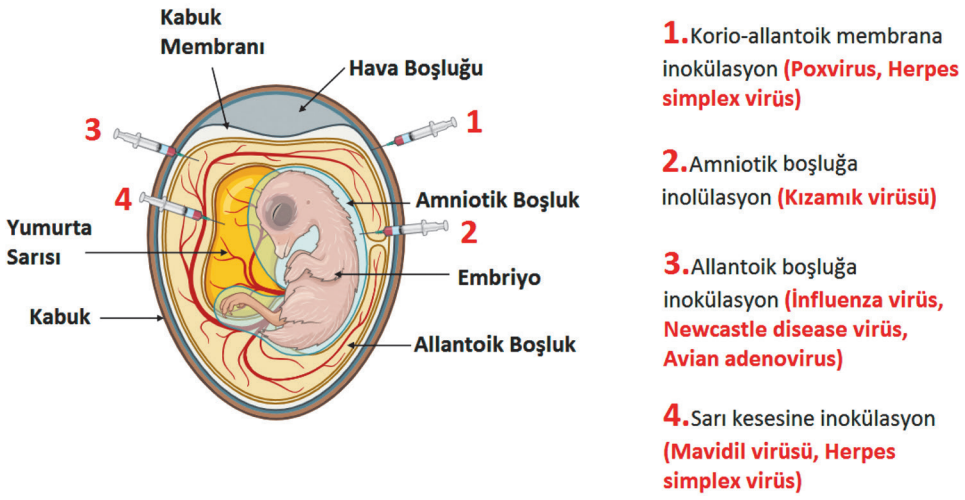
A) Hava Kesesi Tarafından Ekim

1. Karanlık odada, hava kesesi işaretlenen yumurtalar dik konumda ekim alanına getirilir.
2. İşaretlenen bölge tentürdiyotla sterilize edilir.
3. Hava kesesi üzerinden bir delik açılır ve uzun bir iğne ile 25-40° açıyla CAB'a girilerek 0,2-0,3 ml virüs enjekte edilir.
4. Delik parafinle kapatılır ve yumurta inkübatöre kaldırılır.

B) Yan Taraftan Ekim

1. Karanlık odada, hava kesesi ve embriyonun bulunduğu damarların az olduğu yan taraf işaretlenir.
2. Yan taraf tentürdiyotla sterilize edilir ve kısa bir iğne ile dik şekilde CAB'a girilerek virüs verilir.
3. Delik parafinle kapatılır ve yumurta inkübatöre konur.

- Her iki yöntemde de belirli bir süre sonunda embriyo ölmezse, buzdolabında 2-4 saat bekletilerek ölmesi sağlanır. Virüsün üreyip üremediğini anlamak için yumurta kabuğunda pencere açılır. CAM steril bir pensle açılır ve Chorio-Allantoik sıvı bir pipetle tüpe alınır. Bu sıvı, virüs varlığını tespit etmek amacıyla Hemaglütinasyon (HA) testiyle analiz edilir.



Resim 5. ETY'nda virus ekimi için en sık kullanılan bölgeler ve uygulanan virüsler.

3. Amnion Boşluğuna Ekim

- Bu yöntem kabakulak ve Influenza virüslerinin üretiminde sıkça kullanılır. İlk izolasyon çalışmaları için tercih edilen bir tekniktir. Adapte edilmiş virüslerin üretiminde 10-12 günlük, izolasyon amaçlı çalışmalar içinse 12-14 günlük yumurtalar uygundur.
  1. Işık altında, embriyonun bulunduğu bölge ve hava kesesi işaretlenir.
  2. Yumurtalar dik olarak taşıyıcıya yerleştirilir.

2. Reed-Muench Yöntemi

Tablo 3. Reed-Muench Yöntemi ile titrasyon sonucu değerlendirme örneği.

İnokule edilen virüs dilüsyonu	Enfekte sayısı/ inokule sayısı	Enfekte sayısı	Enfekte olmayan sayısı	Toplam enfekte sayısı↑	Toplam enfekte olmayan sayısı↓	Enfekte yüzdesi
10^{-1}	4/4	4	0	31	0	100
10^{-2}	4/4	4	0	27	0	100
10^{-3}	4/4	4	0	23	0	100
10^{-4}	4/4	4	0	19	0	100
10^{-5}	3/4	3	1	15	1	94
10^{-6}	3/4	3	1	12	2	86
10^{-7}	2/4	2	2	9	4	69
10^{-8}	2/4	2	2	7	6	54
10^{-9}	2/4	2	2	5	8	38
10^{-10}	2/4	2	2	3	10	23
10^{-11}	1/4	1	3	1	13	7
10^{-12}	0/4	0	4	0	17	0
10^{-13}	0/4	0	4	0	21	0
10^{-14}	0/4	0	4	0	25	0

İnokulum miktarı: 0.01 ml

%50 enfektif end-point, 10^{-8} (%54) ile 10^{-9} (%38) arasında yer almakta. Bu iki dilüsyon arasındaki orantısal uzaklığın bulunması;

$$\text{Orantısal uzaklık} = \frac{54-50}{54-38} = 0.25$$

Virüs süspansiyonunun gerçek titresi = $10^{-8.25}$ (0.01 ml inokulum için)

1 ml için hesaplama;

0.01 ml sulandırılmamış virüs $10^{8.25}$ ID_{50} içeriyorsa 1 ml'si ($10^{8.25}$ x 1/0.01) ID_{50} içerir.

$10^{8.25}$ x 1/0.01 = 10^{8} x antilog 0.25 x 1/0.01

= 10^{8} x 1.77 x 100

= **$\underline{1.77 \times 10^{10}\ ID_{50}/ml}$** stok virüs süspansiyonunun titresi

DENEME HAYVANLARINDA TİTRASYON

- Titrasyon deneyi için en çok deneme hayvanı olarak fareler kullanılır. Ancak bazı virüsler için duyarlılığı olan fare hariç diğer laboratuvar deneme hayvanlar veya çiftlik hayvanları kullanılır.
- Laboratuvar hayvanlarda titrasyon testi için temel bir biyogüvenlik seviyesi 2 laboratuvarı gerekir.
- Hayvanlarda titrasyonun bazen zorunluluk olabilir veya hücre kültürüne tercih edilir. Hayvanlarda titrasyonun hücre kültürüne en çok tercih edilme sebebi hayvan öldürücü dozlarının (Lethal dose; LD) belirlenmesidir.

PFU: Plak oluşturan ünite (Plaque-Forming Unit)

Örnek hesaplama;

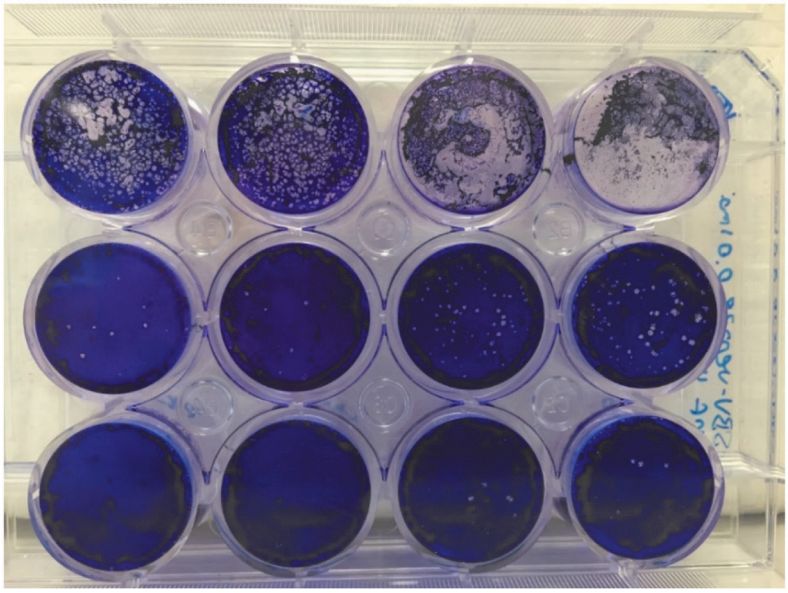
- **Her dilüsyondan 0.5 ml inokule edilen deney sonucunda, 10^{-4} dilüsyondaki kuyucukta 50 adet plak sayıldı ise;**

PFU/ml = 50 / 10^{-4} × 0.5

= 50 ×10^4 / 0.5

= 100 ×10^4

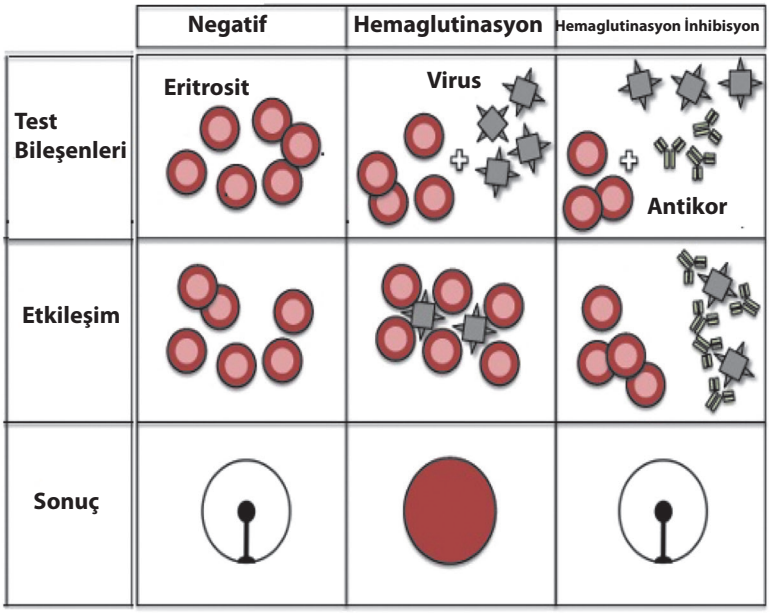
= 1 ×10^6 PFU/ml



Şekil 3. Plak titrasyon örneği

VİRÜS NÖTRALİZASYON TESTİ

- Enfeksiyöz bir virüsün enfeksiyöz kapasitesinin, hem in vivo (canlı organizma içerisinde) hem de in vitro (laboratuvar ortamında) sistemlerde, homolog antikorlar tarafından engellenmesi veya bloke edilmesi sürecine nötralizasyon adı verilir. Bu olay, antikorların, virüs partikülleri ile spesifik olarak bağlanarak virüsün konak hücrelere girişini veya hücre içinde çoğalmasını engellemesi ile gerçekleşir.
- Nötralizasyon, genellikle virüsün yüzey proteinleri ile antikorların doğrudan etkileşimine dayanır. Bu süreçte antikorlar, virüsün konak hücre üzerindeki spesifik reseptörlere bağlanmasını önleyebilir veya virüsün konak hücre zarını geçmek için gerekli olan füzyon veya penetrasyon mekanizmalarını bloke edebilir. Ayrıca bazı durumlarda antikorlar, virüs partikülünü opsonizasyon yoluyla bağışıklık sistemi hücreleri tarafından daha hızlı fagosite edilmesi için işaretleyebilir.

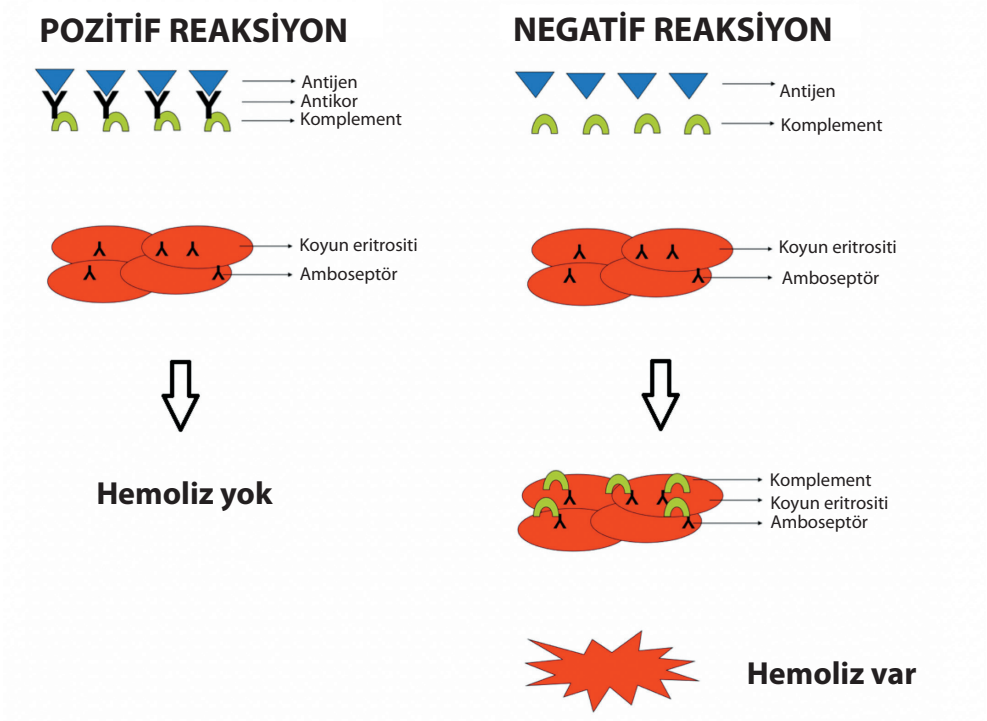


Şekil 3. Heamaglutinasyon ve hemglutinasyon inhibisyon testi çalışma prensipleri (Kaufmann ve ark., 2017)

- Sonuç olarak; hemaglutinasyon (HA) ve hemaglutinasyon inhibisyon (HI) testleri, viral yüzey proteinlerinin eritrositlere bağlanma yeteneğine dayanarak çalışır Bu testlerin sonuçları; pH, sıcaklık, inkübasyon süresi, kullanılan eritrosit türü ve virüs suşları gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilir. Sensitivite ve spesifite açısından modern moleküler tanı yöntemleri (RT-PCR gibi) kadar yüksek doğruluk sağlamasa da, düşük maliyetli, kolay uygulanabilir ve hızlı sonuç veren bir serolojik test yöntemi olarak önemini korumaktadır.
- Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (WOAH, eski adıyla OIE), kuş gribi (avian influenza) ve Newcastle hastalığının serolojik tanısında bu testlerin hâlâ kullanılmasını önermektedir. Özellikle sürveyans çalışmaları, aşılama sonrası bağışıklık yanıtının değerlendirilmesi ve geniş ölçekli tarama testlerinde etkinliği nedeniyle tercih edilmektedir.
- Bununla birlikte, çapraz reaksiyonlar, test koşullarına duyarlılık ve düşük sensitivite gibi sınırlamaları nedeniyle moleküler ve virolojik yöntemlerle desteklenmesi önerilmektedir.

11. HEMADSOBSİYON TESTİ

- Hemadsorbsiyon testi, hemaglutinasyon yeteneğine sahip virüs türlerinin, virüs çoğalması sırasında hücre yüzeyinde virüse ait hemaglütinin (HA) proteinine eritrositlerin tutunması ile gerçekleşir. Hemaglutinasyon yeteneğine sahip virüslerle enfekte edilen hücre kültürlerinde (Vero, MDBK) yaklaşık %0,2-2 oranında eritrosit ilave edildiğinde, eritrositler virüsle birleşerek hemadsorbsiyon oluşturur. Bu test, influenza, parainfluenza, kabakulak, kızamık, poks virüsleri, Afrika domuz vebası virüsü, Newcastle hastalığı virüsü, Sendai virüsü, herpes virüsü, fare hepatit virüsü ve kedilerin immün yetmezlik virüsü gibi virüslerle uygulanabilir. Testin prosedürü, virüsün hücre kültürüne adsorpsiyonuna bağlı olarak enfeksiyonun gerçekleştirilmesidir. Virüsün replikasyonu için gerekli süre verildikten sonra



Şekil 2. Komplement fikzasyon testinin pozitif ve negatif reaksiyonlarında oluşan sonuçlar.

KAYNAKLAR

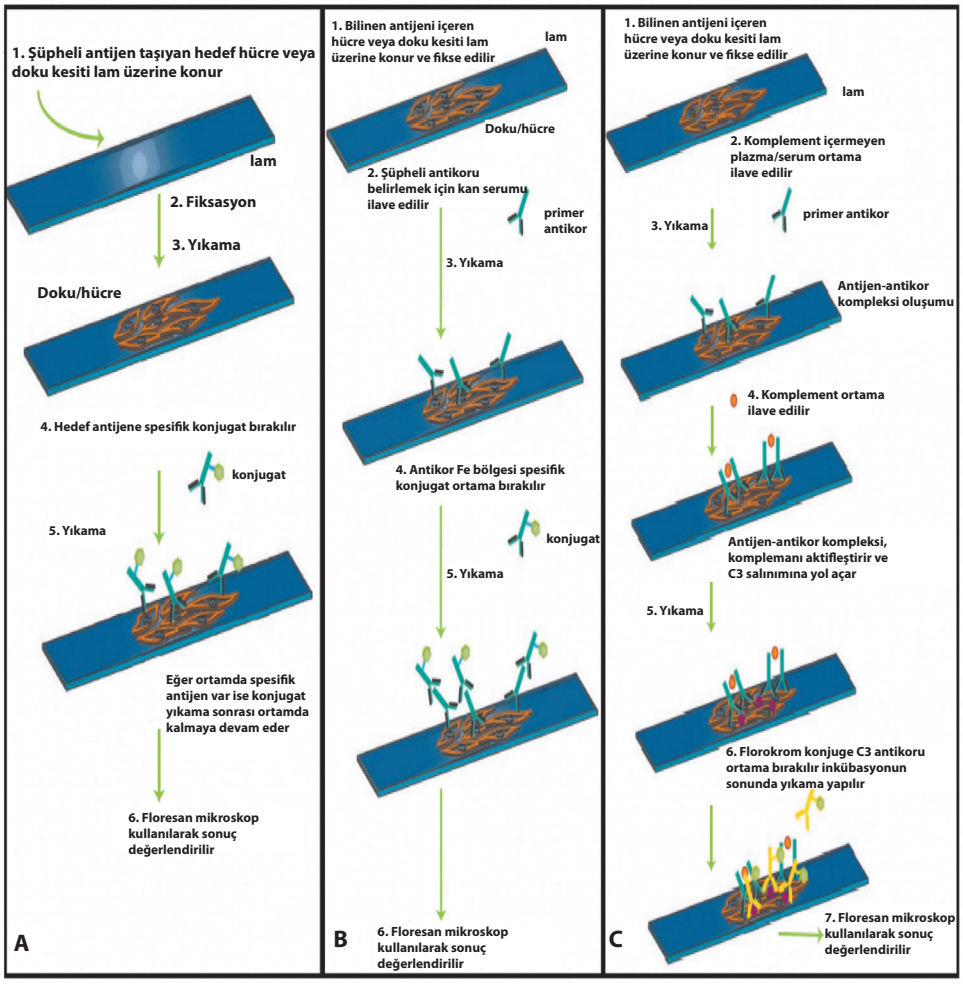
1. Jenson TA. Agar Gel Immunodiffusion Assay to Detect Antibodies to Type A Influenza Virus. Methods Mol Biol. 2020;2123:165-175.
2. WOAH, Terrestrial Manual 2018. Chapter 3.8.2. Caprine arthritis/encephalitis & maedi-visna.
3. WOAH, Terrestrial Manual 2019. Chapter 3.6.5. Equine infectious anaemia
4. WOAH, Terrestrial Manual 2023. Chapter 3.3.9. Marek's disease.
5. WOAH Terrestrial Manual 2018. Chapter 3.4.9. Enzootic bovine leukosis.
6. WOAH, Terrestrial Manual 2024. Chapter 3.6.9. Equine viral arteritis (infection with equine arteritis virus).
7. WOAH, Terrestrial Manual 2021. Chapter 3.1.10. Japanese encephalitis.
8. WOAH, Terrestrial Manual 2022. Chapter 3.1.25. Vesicular stomatitis.

3. **Yıkama: :** İnkübasyon sonrasında, PBST-20 yıkama solüsyonu ile en az üç kez yıkama yapılır ve ortamdan tüm artıklar uzaklaştırılır.
4. **Kompleman ilavesi:** Yıkama sonrası antijen-antikor kompleksine ortamda rastlanırsa kompleman sistemi, lam üzerindeki antikorlar tarafından aktive edilir ve bu işlem sırasında antijen-antikor komplekslerine bağlanan çok sayıda C3 molekülü salınır.

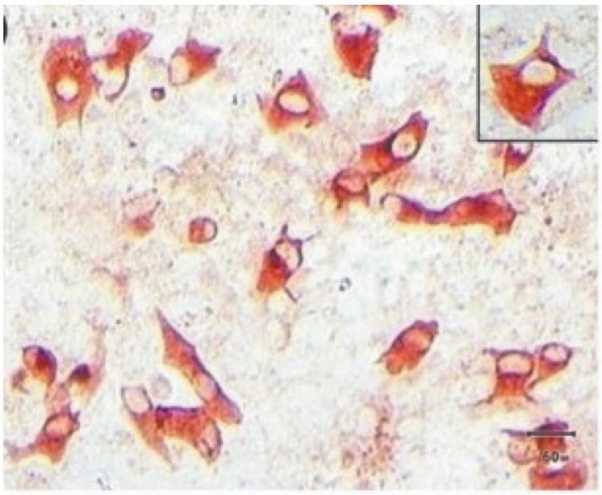
5- **Yıkama:** Adım üç tekrarlanır.

6- **Konjugat ilavesi ve yıkama:** Florokrom konjuge C3 antikoru ortama bırakılır. 37 °C'de nemli ortamda 30 dakika inkübe edilir. Yıkama işlemi en az 3 kez tekrarlanır.

7- **Görüntüleme:** Floresan mikroskop kullanarak sonuç değerlendirilir.



Şekil 3. İmmunofloresan yöntemleri **A-** Direkt immunofloresan yöntemi **B-** İndirekt immunofloresan yöntemi **C-** Komplement indirekt immunofloresan yöntemi. *Alhabbab, R.Y. (2018). Immunofluorescence (IF) Assay. In: Basic Serological Testing. Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert. Springer, Cham.*



Şekil 5. Afrika Domuz Ateşi virüsün antikorunun indirekt immunoperoksidaz yöntem ile belirlenmesi. Kahverengi boyananlar antijen-antikor kompleksi içereren hücreleri *göstermektedir.*

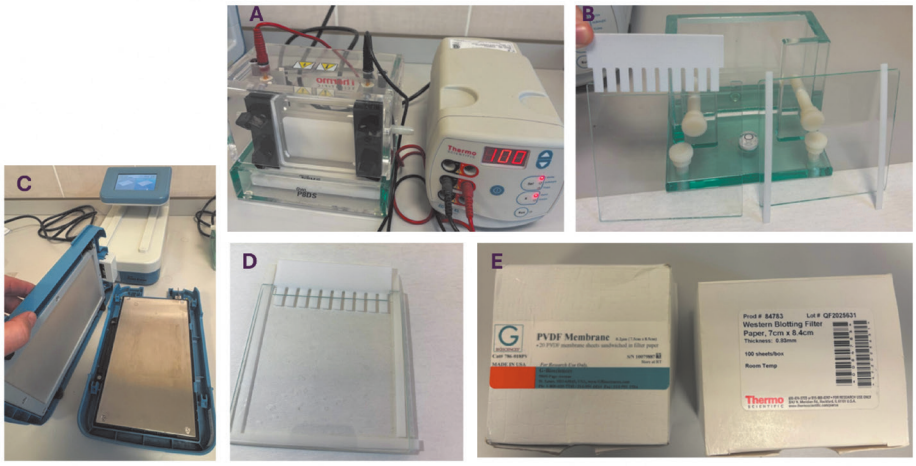
Beltrán-Alcrudo D, Arias M, Gallardo C, Kramer S. Penrith ML. 2017. African swine fever: detection and diagnosis – A manual for veterinarians. FAO Animal Production and Health Manual No. 19. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 88.

KAYNAKLAR

1. Alhabbab RY. (2018). Immunofluorescence (IF) Assay. In: Basic Serological Testing. Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert. Springer, Cham.
2. Beltrán-Alcrudo D, Arias M, Gallardo C, Kramer S. Penrith ML. 2017. African swine fever: detection and diagnosis – A manual for veterinarians. FAO Animal Production and Health Manual No. 19. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 88.
3. Bisht, D., Saxena, S., Kharayat, N.S., Gautam, S. (2022). Protocols for Immunofluorescence Techniques. In: Deb, R., Yadav, A.K., Rajkhowa, S., Malik, Y.S. (eds) Protocols for the Diagnosis of Pig Viral Diseases. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY.
4. Bolat Y, Doymaz MZ, Turan T. Genel Viroloji Ders Notları. Elazığ, 2014. 165-187.
5. Decorte I, Van Breedam W, Van der Stede Y, Nauwynck HJ, De Regge N, Cay AB. Detection of total and PRRSV-specific antibodies in oral fluids collected with different rope types from PRRSV-vaccinated and experimentally infected pigs. BMC Vet Res. 2014;10:134.
6. MacLachlan NJ, Dubovi EJ. Laboratory Diagnosis of Viral Infections. Fenner's Veterinary Virology. 5 th ed. London: Academic Press; 2016. p.105-129.
7. Realegeno S, Niezgoda M, Yager PA, Kumar A, Hoque L, Orciari L, Sambhara S, Olson VA, Satheshkumar PS. An ELISA-based method for detection of rabies virus nucleoprotein-specific antibodies in human antemortem samples. PLoS One. 2018 Nov 7;13(11):e0207009.
8. Tonbak S, Abaylı H. Bovine Ephemeral Fever Virüsün Rekombinant G Proteininin İmmunoperoksidaz Metodu ile Belirlenmesi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi. 2016; 30(3):217-20.

Bu tip enzim işaretli antikorlar konjugat olarak adlandırılır. Bir başka yöntem ikincil antikora tutunan floresan işaretli bir madde varsa kemilüminans veya floresan görüntüleme ile değerlendirme yapılır. Radyoaktif maddelerle işaretleme yapılarak görüntü sağlanabilir. İkincil antikor birincil antikora spesifik olarak bağlanır.

5) **Yıkama:** Yıkama solüsyonu ile membranda bağlanmamış moleküller ayrılır.
6) **Substrat:** Konjugattaki enzimle spesifik reaksiyona girecek olan substrat, membran üzerine konulur ve görüntüleme işlemi gerçekleştirilir. Substratlar başlıca ikiye ayrılır:
   1) Kromojenik substratlar; HRP için TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine), DAB (3,3'-Diaminobenzidine), AP için NBT(nitro blue tetrazolium), BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate)
   2) Kemiluminesan susbtratlar; HRP için ECL (enhanced chemiluminescence)

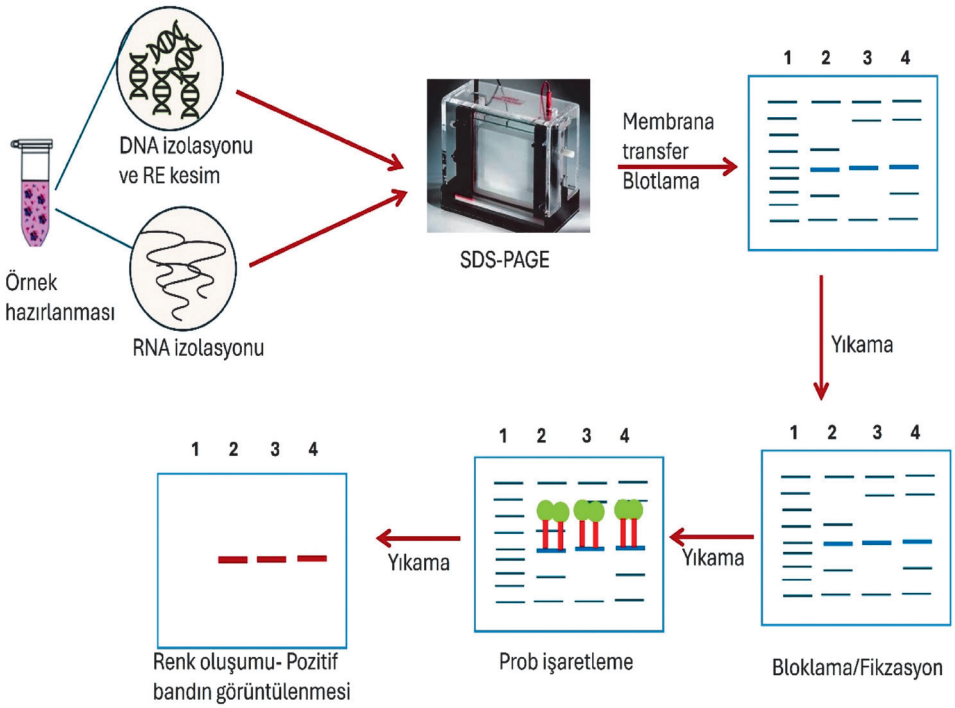


Şekil 6. Western blotlamada kullanılan cihaz ve sarf malzemeler. A: Dikey elektroforez sistemi; jel tankı ve güç kaynağı. B: Jelin hazırlandığı cam plakalar ve taraklar. C: Blotlamada kullanılan yarı kuru sistem. D: Jel ve tarağın cam plakalara yerleşim düzeneği. E: Membran ve filtre kağıtlar için örnek.

- Virüs enfeksiyonların tanısında görüntülenen molekül; yapısal veya fonksiyonel virüs protein, virüs karşı oluşan antikorlar veya diğer proteinlerdir. Birincil antikorun hedef proteine spesifik tutunabilmesi için homolog antikor olmalıdır.
- Virüs yapısındaki değişimler sonucu oluşan viral protein farklılıkları, virüs varyantlarında, serotip farklılıklarındaki gibi, antikorun bağlanmadaki spesifitesini ve aviditesini ekiler.
- Western blotlama tekniği çoğunlukla kalitatif değerlendirmeler için kullanılsa da kantitatif analizler için de optimize edilebilir. Testin optimizasyonda pozitif bulunan proteinin miktarının ölçülmesi hedeflenir. Bu amaçla, örneğin başlangıç miktarı ve blotlama sonrası bant yoğunluğu arasındaki ilişki değerlendirilir, kalibre edilir.

fik ve o diziyle hibridizasyon yoluyla bağlanabilen etiketli RNA veya DNA problar kullanılır. Bu probların etiketlenme türleri ve dolayısıyla görüntüleme değişkenlik gösterebilir.

- Radyoaktif bir işaretlemede kullanılan radyoaktif işaretli problar (^{32}P gibi) ile membran inkübasyona bırakılır. Bu basamakta hedef DNA ile radyoaktif etiketli prob hibriti meydana gelir ve oluşan hibritleri görüntülemek için radyootografi kullanılır.
- Radyoaktif olmayan işaretleme yöntemlerde digoksigenin ile nükleik asitlerin işaretlenmesi yapılır. Kullanımları daha pratik ve güvenlidir. Digoksigenin bitkisel kökenli steroid yapı orjinlidir ve nükleik asitlere bağlanır. İnkübasyon sonrası membran yıkama işlemi uygulanır ve daha sonra anti-digoksigenin antikorları ile muamele edilir.
- Bu antikorlar enzim, floresan veya kemilüminesan gibi reaktiflerle işaretli olabilir. Enzim, floresan veya kemilüminesan reaktiflerle işaretli problarla membran inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası oluşan hibridizasyonu görüntülemek için uygun görüntüleme adımı izlenir.
- Enzim reaktifler genellikle peroksidaz (HRP), alkalen fosfataz gibi enzimlerle işaretli antikor yani konjugatlardır. Bir sonraki basmakta enzim spesifik substrat kullanılır. Floresan veya kemilüminasans reaktiflerle işaretli antikorların kullanıldığı protokollerde karanlık ortamda floresans/lüminasans translüminatörler ile görüntüleme yapılır.
- Southern blotlamanın görüntülenmesi sonrası, DNA bantları kalitatif belirlenir ve isteğe bağlı olarak kantitatif analizi de yapılabilir. Kantitatif analiz için western blotlamada açıklandığı gibi önceden optimizasyon çalışmasının yapılarak doğrusal tanıma aralığı ve eğrisi oluşturulması gerekir. Jele yüklenen DNA örneğinin konsantrasyonu, pozitif kontrol, DNA merdiven, konsantrasyonları ve prob uzunluğu standart eğrinin oluşturulmasında kullanılır.



Şekil 10. Southern ve Northern blotlama yöntemlerinde ortak uygulanan test aşamaları.

- Real-time PZR analizleri için uluslararası kılavuz olarak kabul edilen MIQE rehberine göre; literatürde yer alan Ct (threshold cycle), Cp (crossing point) ve TOP (take-off point) gibi terimler gerçek zamanlı PCR cihazlarından alınan aynı değeri ifade etmektedir ve bilimsel doğruluk veya netlik nedeniyle değil, cihaz üreticilerinin rekabeti ve ürün farklılaştırması amacıyla ortaya çıkmıştır. MIQE rehberi bu terimlerin yerine, veri standardına uygun olarak, kantifikasyon döngüsü (quantification cycle; Cq) teriminin kullanılmasını önermektedir.

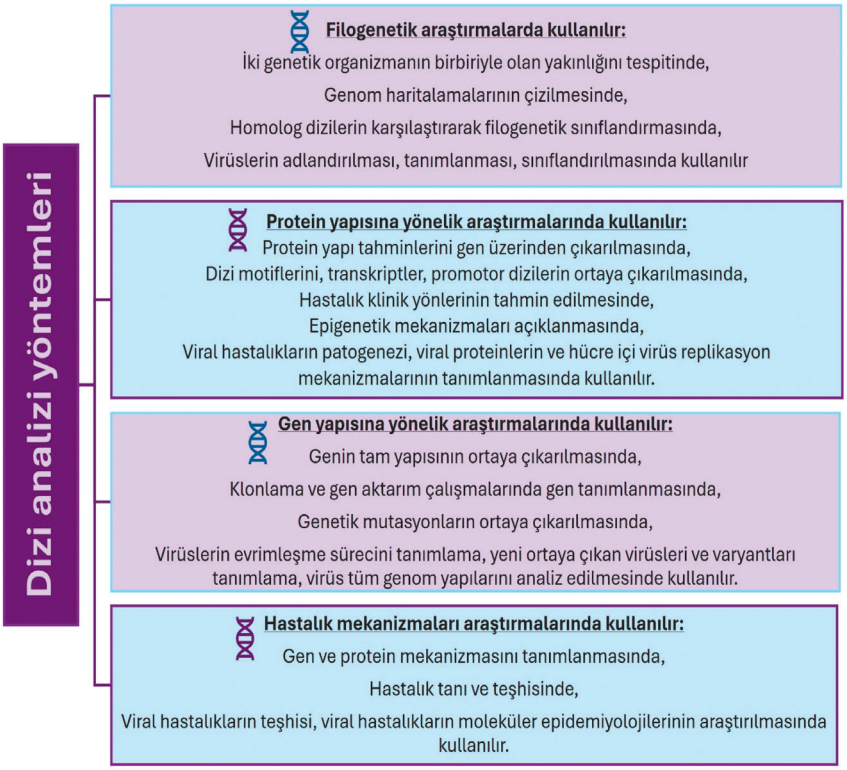
- Real-Time PZR (qPZR) yönteminde kantitatif analizlerde, gen ekspresyonu veya hedef DNA/RNA miktarının tespiti için iki temel kantitatif yaklaşım bulunmaktadır: absolute quantification (mutlak kantifikasyon) ve relative quantification (göreceli kantifikasyon). Absolute ve relative kantifikasyonlar arasındaki temel fark, absolute quantification gerçek gen miktarını belirler ve bir standart eğrisine dayanır, bu sayede kesin kopya sayısı elde edilirken; relative quantification analizinde, hedef genin, referans gene veya kontrol gruba göre göreceli değişimini ölçülür ve mutlak miktar elde edilemez.

3.4.1.1. Absolute Quantification (Mutlak Kantifikasyon)

- Absolute quantification, belirli bir hedef genin sayısal miktarını belirlemek için kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemde, amplifikasyon sırasında elde edilen floresan sinyali ile hedef DNA/RNA›nın gerçek miktarı arasındaki ilişki hesaplanır. Mutlak kantifikasyon için bir "standart eğri" gereklidir. Bu standart eğri, bilinen konsantrasyonlardaki hedef DNA/RNA örneklerinin amplifikasyon sinyali ile oluşturulur. Daha sonra, test örneklerinin floresan sinyalleri, bu eğriye karşı konumlandırılarak, örneklerdeki kesin gen miktarı (kopya sayısı veya konsantrasyon) belirlenir (Şekil 5).
- Absolute Quantification analizinde standart eğrinin oluşturulabilmesi için öncelikle pozitif plazmid (analiz edilecek geni taşıyan) veya DNA'nın tespit edilmesi ile başlar.
- Pozitif plazmidlerin DNA konsantrasyonları, spektrofotometrik yöntemle ölçülür ve bu veriler, aşağıda açıklanan formül kullanılarak hesaplanır. Plazmidler, 10^1 kopya/µL ile 10^9 kopya/µL arasında değişen 10 kat seyreltmelerle hazırlan**ır** ve moleküler sınıf su kullanılarak seyreltilir. Plazmid DNA konsantrasyonu, spektrofotometrik ölçüm sonrasında, kopya sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılır:

(X g/µL DNA / (plazmid uzunluğu bp × 660)) × 6.022 × 10^{23} = Y molekül/µL
X g/µL DNA: Plazmid DNA'nın yoğunluğu (gram cinsinden mikro litre başına).
Plazmid uzunluğu (bp): Plazmidin toplam baz çift sayısı.
660: DNA'nın ortalama moleküler ağırlığına karşılık gelen bir sabit sayıdır.
6.022 × 10^23: Avogadro sayısı, bir moldeki molekül sayısını ifade eder ve burada kopya sayısının hesaplanmasında kullanılır.

- Bu hesaplama, plazmidlerin konsantrasyonunu belirlemek için kullanılan yaygın bir moleküler biyoloji formülüdür. Test örnekleri, üçlü tekrarla yapılan seyreltme serisi ile çalış**ılır** ve her seyreltmenin ortalama değeri kullanılarak sonuçlar analiz edilir, böylece elde edilen verilerin güvenilirliği artırıl**ır**.



Şekil 1. Dizi analizi yöntemlerinin viroloji alanında kullanıldığı konular.

TESTİN PRENSİBİ

- Dizi analizi yöntemleri temel prensibi; genom yapının birincil yapısını, nükleik asit düzeyinde açıklatılması, proteinleri kodlayan ve kodlamayan genlerin yapısal özelliklerinin ortaya konulmasıdır.
- **DNA dizisi (Sekans):** DNA'nın yapısal olarak, bir iplikçiğindeki nükleotid yapısındaki diziliminin harflerle gösterilmiş halidir (Şekil 2).
- DNA dizi analizi ise gerçekte var olan iplikçikteki bu sıralı yapıyı ortaya çıkarmaya çalışır. Milyarlarca nükleotidi en doğru şekilde sıralar.
- DNA yapısındaki dizileri belirten harfler A (adenin), T (timin), C (sitozin) ve G (guanin)'dir ve nükleotidleri temsil eder. Bir dizide bu harfler bitişik yazılarak ifade edilir. RNA dizileme sonuçlarında U-urasili temsil eder. Genellikle RNA dizilemelerinde, RNA iplikçiği DNA komplementerine çevrilerek değerlendirilir.
- DNA yapısındaki iplikçikler 5'→3' yönünde pozitif iplikçik, 3'→5' yönünde negatif iplikçiği temsil eder. Tek bir iplikçiği ortaya çıkarmak için her iki yönde başlayan analiz ile elde edilen diziler birleştirilerek konsensus dizi oluşturulur ve nihai dizi elde edilir.
- Virüs genomunun polarite yapısı, bu iplikçiklerdeki nükleotid dizilerini de yansıtır. Sonuç itibariyle iki iplikçik birbirinin komplementeri olsa da dizi analizi tek iplikçik üzerindeki yazılımı oraya çıkarır. Her iki iplikçiğin dizi analizi sonrası elde edilen diziler biyoenforma-

Primer Seçimi

- Hedef genin çoğaltılmasında kullanılmak üzere ileriye (forward) ve geriye (revers) olmak üzere iki adet primer oluşturulmalıdır. Primerler sentetik oligonükleotitlerdir ve çoğaltılacak DNA bölgesinin uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanır. Kalıp DNA'nın sentezi için, başlangınç noktası olarak görev yaparlar. Bu pimerler oluşturulurken klonlama veya açıklama vektörlerinin klonlama bölgesindeki enzim kesim bölgeleri göz önünde bulundurulmalıdır ve kosirkülasyon olmaması için iki enzimin birbirinden farklı olmasına dikkat edilmelidir. Primerlerin 5'uç bölgelerine yerleştirilecek enzimlerin vektörde olmasına fakat hedef gen üzerinde bulunmamasına dikkat edilmelidir.

2. HEDEF (INSERT) GENİN BELİRLENMESİ VE POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU PCR) İLE ÇOĞALTILMASI

- PCR, DNA moleküllerinde özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına esasına dayanmakta ve az miktardaki DNA reaksiyon sonucunda milyarlarca adet çoğaltılabilmektedir. Reaksiyon
  1. İlk adımda, çoğaltılacak DNA denatüre etmek için 90-95° C,~5 dk bekletilir.
  2. Sıcaklık 50-70° C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale gelmiş DNA'ya bağlanması sağlanır.
  3. DNA polimeraz (Taq polimeraz) hedef genin sentezini 72°C 1-5 dakika arasında gerçekleştirir. Polimeraz enzimi, nükleotitleri 5' den 3' ne doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur.

Bu döngü programı 32 kez tekrarlanmakta ve istenilen hedef gen çoğaltılmaktadır.

- İzole edilen nükleik asit hedef gene spesifik primerler aracılığıyla çoğaltılır. Elde edilen nükleik asit türü RNA ise ilk olarak bunun revers transkriptaz enzimi kullanılarak yaklaşık bir saat süre sonunda 37 veya 42°C'de komplementer DNA'ya çevrilmesi gerekmektedir. Bir sonraki aşamada DNA veya cDNA kalıp olarak kullanılarak 32 döngüden oluşan PCR reaksiyonu ile çoğaltılmaktadır.
- Reaksiyon sonucunda çoğaltılan PCR ürünleri agaroz jelde elektrik akımı verilerek DNA'nın göç etmesi sağlanmaktadır. Bu işlem sonucunda agaroz jeldeki DNA etidyum bromid ile boyanarak ultra viole ışığı altında gösterimi yapılmaktadır.

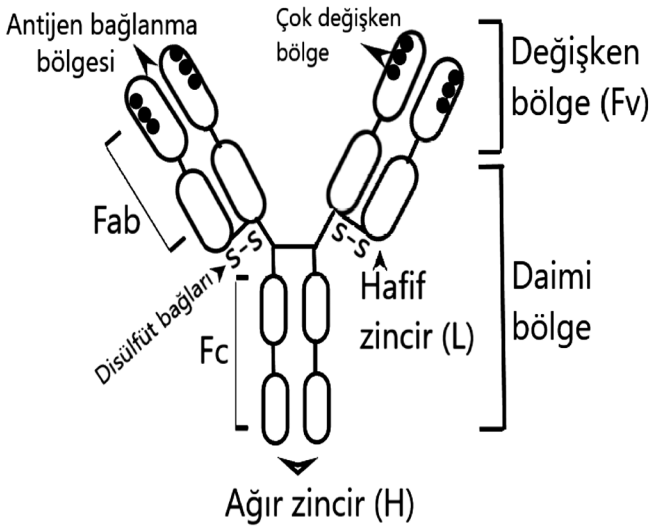
3. PLAZMİD (VEKTÖR) DNA'NIN ELDE EDİLMESİ

- Plasmid DNA'sı hazırlamak için, plasmid içeren bakteri hücresi uygun koşullarda sıvı besiyerinde antibiyotik ilave edilerek 16-20 saat üretilir.
- Üretilen bakteri hücrelerinden alkali lizis yöntemi veya plasmid DNA izolasyon kitleri kullanılarak plasmid DNA'sı elde edilmektedir

4. HEDEF GENİN (İNSERT) RESTRİKSİYON ENDONÜKLEZLARLA KESİMİ

- Agaroz jelden saflaştırılan insert DNA sı restriksiyon endonüklezlar ile kesime bırakılır. Yaklaşık bir saat 37°C'de bekletilerek kesim işleminin gerçekleşmesi sağlanmaktır. Bu sürenin sonunda hedef gen DNA agaroz jelde elektrik akımı verilerek yürütülür. İnsertün jelden pürifiye edilmesiyle kesim işlemi tamamlanmış olmaktadır.

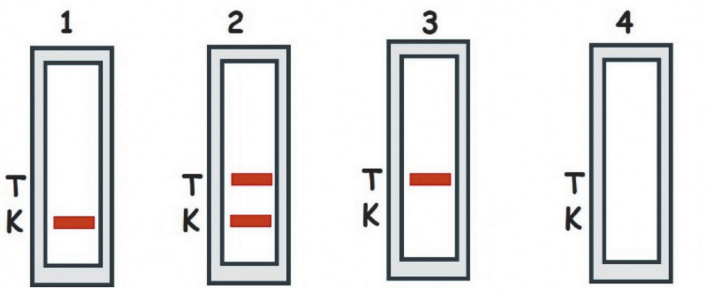
- 1975 yılında Georges Köhler ve César Milstein, myelom hücre (Farelerin kanserli plazma hücresi) ile immünize farelerden elde ettikleri B hücrelerinin füzyonunu başararak hidridoma elde edilmesi ve mAb üretimini pratik anlamda başarmışlardır.
- Georges Köhler ve César Milstein, monoklonal antikor üretmek için hibridoma tekniğini geliştirdikleri için 1984 Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü'ne layık görülmüştür.
- Poliklonal antikorlara kıyasla yüksek spesifikliği sebebiyle mAbs teşhis ve tedavide yaygın kullanım potansiyellerine sahiptirler ve bu özellikleri sebebiyle de mAbs mükemmel biyolojik yapılar olarak kabul edilmektedirler.
- Monoklonal antikor üretimi takip eden yıllarda bir teknoloji haline gelmiş ve monoklonal antikor veya hibridoma teknolojisi olarak da anılmaya başlamıştır.
- Daha sonraki yıllarda mAb üretim teknolojilerinde yeniliklerle birlikte fare harici türlere karşı mAbs'ın üretilmesinin yanı sıra birçok mikrobik etken ve kanser hücrelerinin tanı ve tedavisinde kullanılan çok sayıda mAb üretimi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.
- Monoklonal antikor üretimi için fare miyeloma hücrelerine ilave diğer memeli, bitki, bakteri ve maya hücre hatlarının tespiti, geliştirilmesi ve kullanımı çalışmaları devam etmektedir. Alternatif hücre hatları piyasadaki terapötik antikorlara yönelik ortaya çıkan ihtiyaçlar için umut verici sonuçlar sunmaktadır.
- 2018 yılında James P. Allison ve Tasuku Honjo, inhibitör bağlantıları önleyen mAbs kullanarak negatif bağışıklık düzenlemesinin engellenmesi yoluyla kanser tedavisini keşfettikleri için Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü'nü almışladır.
- Bugüne kadar mAb teknolojisinde alınan Nobellere ve birçok çığır açıcı gelişmeye rağmen, günümüzde mAb üretimde yeni teknolojilerin geliştirilmesi çalışmaları devam ettirilmektedir. Bu çalışmalar özellikle tedavi amaçlı kullanılmak üzere kanser ve mikrobik ajanlar için daha etkili mAb üretilmesi için umut vermektedir.



Şekil 1. İmmunoglobulin molekülünün şematik yapısı.

YARIŞMALI LFA MODELİ

- Bu model, iki antikora aynı anda bağlayamayan düşük moleküler ağırlığa sahip bileşiklerin tespitinde tercih edilir. Bu testte test çizgisinde çizgi/renk oluşmaması testtin pozitif olduğunu gösterir. Negatif bir sonuçta ise hem test hattında hem de kontrol hattında çizgi/renk oluşur. Küçük moleküller her iki antikora bağlanamazlar. Bu test sisteminde iki antikor kullanılır. Birincil antikor işaretlenmiş, konjugasyon pedinde bulunan antikordur. Diğer antikor ise kontrol hattında bulunan anti-immünglobulin yapıdadır.
- Test sisteminde; numune eklendiğinde pozitif reaksiyonda; kontrol çizgisinde bir kırmızı çizgi oluşur ve test çizgisinde renk oluşmaz. Negatif reaksiyon için test hattında ve kontrol hattında kırmızı çizgi belirecektir (Şekil 5).



Şekil 5. Yarışmalı model LFA test şerit /strip görüntüleri. T: Test hattı, K: Kontrol hattı. 1 numaralı test pozitif numuneyi, 2 numaralı test negatif numuneyi gösterir. 3 ve 4 nolu test tekrarlanmalıdır, test hatalıdır.

NÜKLEİK ASİT TESPİTİ MODELİ

Nükleik asit tespitinde hedef molekül tek tip nükleik asit olmakla birlikte birden fazla virüse ait mültipleks test düzeni kurulabilir. Böylece birden fazla patojen varlığın aynı anda test edilebilir. Özellikle klinik semptomların ve ayırıcı tanıda karışan hastalıklar yönünden hazırlanan test protokolleri klinik tanıyı kolaylaştırır. Örneğin ishalle seyreden hastalıklar, solunum sistemi hastalığına neden olan virüsler gibi.

- Nükleik asit tespitinde hızlı tanı yöntemlerinde temel olarak iki mekanizma esas alınarak test hazırlanır. Hasta örneğindeki numunede aranan nükleik asidin çoğaltılması yani amplifikasyonu yapılarak tespit edilen hızlı tanı testleri kısa zamanda kalitatif ve kantitatif sonuç verir. Bu testler PCR tabanlı reaksiyon yapan testlerdir. Gerçek zamanlı PCR sisteminin tam otomatize ve hızlı kullanımı ile oluşturulan bir sistemdir. Numune hazırlama, DNA amplifikasyonu ve tespiti gerçekleşir. Patojene spesifik PCR reaksiyonu floresan ışık algılama sistemine sahip bir cihaz içerisinde gerçekleşir.
- Diğer mekanizma ise nükleik asidin problar ile işaretlenmesi ve hibridizasyonuna dayalı test sistemidir. Bu tip testlerde işe kartuş, çip veya kart sistemi ile test düzeneği oluşturulur ve cihaz yardımıyla sonuç tanımlanır.

VETERİNER HEKİMLİĞİ

GENEL VİROLOJİ AKIL NOTLARI

ARADIĞINIZ TÜM TIP KİTAPLARI BU ADRESTE
www.guneskitabevi.com

GENEL DAĞITIM
GÜNEŞ TIP KİTABEVLERİ

YERLİ ÜRETİM

ANKARA
M. Rauf İnan Sokak No: 3
06410 Sıhhiye / Ankara
Tel: (0312) 431 14 85 • 435 11 91-92
Faks: (0312) 435 84 23

İSTANBUL
Gazeteciler Sitesi Sağlam Fikir Sokak
No: 7 / 2 Esentepe / İstanbul
Tel: (0212) 356 87 43

KADIKÖY
Rasimpaşa Mah. İskele Sokak
No: 4 / A Kadıköy / İstanbul
Tel: (0216) 546 03 47

Türkiye'nin her yerinden...
0505 734 13 13

ISBN 978-625-6065-63-5