



T.C.

**MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KLİNİK SEMPTOMLU KÖPEKLERİN KAN, İDRAR,
REKTAL SÜRÜNTÜ, NASAL VE OKÜLER AKINTI
ÖRNEKLERİNDE CANİNE DİSTEMPER VİRUS
ENFEKSİYONUN REAL TIME RT-PCR İLE TESPİT
EDİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Hasbi Sait SALTİK

VİROLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet KALE

BURDUR -2018

T.C.
MEHMET AKIF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KLİNİK SEMPTOMLU KÖPEKLERİN KAN, İDRAR,
REKTAL SÜRÜNTÜ, NASAL VE OKÜLER AKINTI
ÖRNEKLERİNDE CANİNE DİSTEMPER VİRUS
ENFEKSİYONUN REAL TIME RT-PCR İLE TESPİT
EDİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Hasbi Sait SALTİK
VİROLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet KALE

Bu tez, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeler Koordinatörlüğü tarafından 0403-DR-16 nolu proje ile desteklenmiştir.

BURDUR -2018

KABUL ve ONAY SAYFASI

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

HASBİ SAİT SALTİK tarafından **Prof. Dr. Mehmet KALE** yönetiminde hazırlanan "Klinik Semptomlu Köpeklerin Kan, İdrar, Rektal Sürüntü, Nasal ve Oküler Akıntı Örneklerinde Canine Distemper Virus Enfeksiyonunun Real Time RT-PCR ile Tespit Edilmesi" başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Viroloji Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

18/04/2018



Prof. Dr. Sibel YAVRU
Selçuk Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Başkan




Prof. Dr. Mehmet KALE
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri



Doç. Dr. Zafer ÖZYILDIZ
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri



Doç. Dr. Mehmet Özkan TİMURKAN
Atatürk Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri



Dr. Öğr. Üyesi Nural EROL
Adnan Menderes Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri

ONAY

Bu tez, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu **11.. 05/2018** Tarih ve **1.6...** sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Doğa TEMİZSOYLU
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamda yardımlarını esirgemeyen Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Viroloji Anabilim Dalı Baőkanı Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet KALE'ye, her konuda bana destek olan Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sibel HASIRCIOĞLU, Sayın Araő. Gör. Dr. Kamil ATLI ve Sayın Prof. Dr. Yakup YILDIRIM'a, doktora tez çalışmam süresince her türlü bilgi ve tecrübeleriyle bizlere yön veren ve yardımcı olan Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Viroloji Anabilim Dalı çok değerli öğretim üyeleri hocalarımıza en içten teőekkürlerimi sunarım.

Bu günlere gelebilmem için maddi ve manevi hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan Sevgili Ailem ve Eőim Sena'ya varlıkları ve destekleri için teőekkürü borç bilirim.

BEYAN

Klinik semptomlu köpeklerin kan, idrar, rektal sürüntü, nasal ve oküler akıntı örneklerinde canine distemper virus enfeksiyonunun real time rt-pcr ile tespit edilmesi başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

18.04.2018


HASEM SAİT SALTİK

ONAY



Prof. Dr. Mehmet KALE

Danışman

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
KABUL ve ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Taksonomi ve Sınıflandırma	2
2.2. Virion Özellikleri	2
2.2.1. Morfoloji	2
2.2.2. Nükleik Asit	3
2.2.3. Yapısal ve Düzenleyici Proteinler	3
2.3. Biyoloji	6
2.3.1. Replikasyon	6
2.3.2. Konakçı Spektrumu	7
2.3.3. Hücre Kültürü	7
2.3.4. Kimyasal ve Fiziksel Ajanlarla İnaktivasyon	8
2.4. Epidemiyoloji	9
2.5. Patogenez	9
2.6. Patoloji	11
2.7. Klinik Bulgular	11
2.8. İmmunoloji	12
2.9. Tanı	13
2.9.1. Klinik Tanı	13
2.9.2. Laboratuvar Tanı	14
2.9.2.1. Virolojik Tanı	14
2.9.2.2. Virus İzolasyonu	14

2.9.2.3. Moleküler Tanı	14
2.9.2.4. IHC	15
2.9.2.5. Serolojik Teşhis	16
2.10. Tedavi	16
2.11. Kontrol ve Korunma	16
2.12. Tezin Amacı	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Gereç	19
3.1.1. Araştırmada Örneklenen Hayvanlar	19
3.1.2. Araştırmada Kullanılan Örnekler	20
3.1.2.1. Serolojik Çalışmalar	20
3.1.2.2. Moleküler Çalışmalar	20
3.1.2.3. Virus İzolasyon Materyali	21
3.1.3. Hücre Kültürü	22
3.1.3.1. Fötal Dana Serumı (FDS)	22
3.1.4. Direkt İmmunofloresan Antikor Boyama Yöntemi (DIF)	22
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Örneklerin Hazırlanması	22
3.2.1.1. Kan Örneklerinin Hazırlanması	22
3.2.1.1.1. Serum Örneklerinin Hazırlanması	22
3.2.1.1.2. Lökosit Örneklerinin Hazırlanması	23
3.2.1.2. Rektal Sürüntü, Nasal ve Oküler Akıntı Örneklerinin	23
3.2.1.3. İdrar Örneklerinin Hazırlanması	23
3.2.2. Serolojik Çalışmalar	24
3.2.2.1. İndirekt IgG ELISA Testi	24
3.2.2.2. İndirekt IgM ELISA Testi	24
3.2.3. Moleküler Çalışmalar	25
3.2.3.1. Total RNA İzolasyonu	25
3.2.3.2. Primer – Prob Dizileri	26
3.2.3.3. One-Step Real Time RT-PCR Testi	26
3.2.4. Virolojik Çalışmalar	27
3.2.4.1. Hücre Kültürü	27
3.2.4.2. Virus İzolasyonu	29
3.2.4.3. DIF	30

3.2.5. İstatistiki Analiz	31
4. BULGULAR	32
4.1. İndirekt ELISA Test Sonuçları	32
4.2. One Step Real Time RT-PCR Sonuçları	33
4.3. Hücre Kültürü İnokulasyon Sonuçları	39
4.4. DIF Boyama Sonuçları	44
4.5. İstatistiki Sonuçlar	48
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
7. KAYNAKLAR	69
8. EKLER	78
8.1. Etik Kurul Kararı	78
9. ÖZGEÇMİŞ	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. RNA genomu içerisindeki proteinlerin 3'→5' yönünde	4
Şekil 2.2. Enfekte vero hücre kültüründe cdv inkluzyon	15
Şekil 3.1. İdrar örneklerinin toplama çalışmaları	19
Şekil 3.2. RNA ekstraksiyonu sırasında ayrılan sıvı ve	25
Şekil 3.3. Floid Hücre Görüntüleme Sistemi ile MDCK hücre üretimi	28
Şekil 3.4. MDCK Hücre Kültürü pasajlama ve 24 gözlü	29
Şekil 3.5. Örneklerin MDCK ile kaplı 24 gözlü mikroplyet	30
Şekil 4.1. Olgu 1-2-3-4'e ait One Step Real Time RT-PCR sonuç	33
Şekil 4.2. Olgu 5-6-7'e ait One Step Real Time RT-PCR sonuç	34
Şekil 4.3. Olgu 8-9-10'a ait One Step Real Time RT-PCR sonuç	34
Şekil 4.4. Olgu 11-12-13'e ait One Step Real Time RT-PCR sonuç	34
Şekil 4.5. Olgu 14-15-16'ya ait One Step Real Time RT-PCR sonuç	35
Şekil 4.6. Olgu 17-18-19'a ait One Step Real Time RT-PCR sonuç	35
Şekil 4.7. Olgu 20-21-22'ye ait One Step Real Time RT-PCR sonuç	35
Şekil 4.8. Olgu 23-24-25'e ait One Step Real Time RT-PCR sonuç	36
Şekil 4.9. Olgu 26-27-28'e ait One Step Real Time RT-PCR sonuç	36
Şekil 4.10. Olgu 29-30-3'e ait One Step Real Time RT-PCR sonuç	36
Şekil 4.11. Olgu 32-33-34'e ait One Step Real Time RT-PCR sonuç	37
Şekil 4.12. Olgu 35-36-37'ye ait One Step Real Time RT-PCR sonuç	37
Şekil 4.13. Olgu 38-39-40'a ait One Step Real Time RT-PCR sonuç	37
Şekil 4.14. Olgu 41-42-43'e ait One Step Real Time RT-PCR sonuç	38
Şekil 4.15. Olgu 44-45-46'ya ait One Step Real Time RT-PCR sonuç	38
Şekil 4.16. Olgu 47-48'e ait One Step Real Time RT-PCR sonuç	38
Şekil 4.17. Olgu 49-50'ye ait One Step Real Time RT-PCR sonuç	39
Şekil 4.18. MDCK Hücre Kontrol. (24 saat sonraki görüntü)	41
Şekil 4.19. MDCK Hücre Kontrol. (48 saat sonraki görüntü)	41
Şekil 4.20. MDCK Hücre Kontrol. (96 saat sonraki görüntü)	42
Şekil 4.21. MDCK Hücre Kontrol. (144 saat sonraki görüntü)	42
Şekil 4.22. Ekimden 48saat sonra CPE görüntüsü	43
Şekil 4.23. Ekimden 96 saat sonra CPE görüntüsü	43
Şekil 4.24. Ekimden 144 saat sonra CPE görüntüsü	44
Şekil 4.25. Düşük Seviye CPE Pozitif (A). DIF görüntüsü (B)	45

Şekil 4.26. Orta Seviye CPE Pozitif (A). DIF görüntüsü (B)	45
Şekil 4.27. İleri Seviye CPE Pozitif (A). DIF görüntüsü (B)	46
Şekil 4.28. 2.pasaj sonrası DIF pozitif bulunan örnekler	47
Şekil 4.29. Solunum sistemi bulgusu (Olgu No 7)	54
Şekil 4.30. Burun ucunda hiperkeratoz (Olgu No 6)	54
Şekil 4.31. MSS bulgusu (Olgu No 9)	55
Şekil 4.32. Taban yastığında hiperkeratoz (Olgu No 28)	55



TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1. Örneklerin ırklara göre dağılımı	20
Tablo 3.2. Viral genom varlığı yönünden test edilen örnekler	21
Tablo 3.3. Virus izolasyonu için kullanılan örnek ve sayıları	21
Tablo 3.4. CDV Ondesterpoort suşundan referans alınan primer prob	26
Tablo 3.5. Onestep Real time RT-PCR testinde kullanılan	26
Tablo 3.6. One step Real Time RT-PCR testinde uygulanan protokol	27
Tablo 4.1. İndirekt ELISA testiyle pozitif tespit edilen olgu	32
Tablo 4.2. CDV'ye özgü IgG ve IgM antikor varlığının	32
Tablo 4.3. CDV pozitif olgulara ait örneklerin viral nükleik asit	33
Tablo 4.4. MDCK Hücre Kültürlerine ekimi yapılan pozitif	39
Tablo 4.5. Çalışmada kullanılan çeşitli yaş ve cinsiyetteki	48
Tablo 4.6. IgM varlığının yaş gruplarına göre dağılımı	49
Tablo 4.7. IgG varlığının yaş gruplarına göre dağılımı	49
Tablo 4.8. Viral genom varlığının yaş gruplarına göre dağılımı	50
Tablo 4.9. Virus izolasyonunun yaş gruplarına göre dağılımı	50
Tablo 4.10. IgM varlığının cinsiyete göre dağılımı	50
Tablo 4.11. IgG varlığının cinsiyete göre dağılımı	50
Tablo 4.12. Viral Genom varlığının cinsiyete göre dağılımı	50
Tablo 4.13. Virus İzolasyonunun cinsiyete göre dağılımı	50
Tablo 4.14. Lökosit örneklerinde yapılan One Step Real Time	51
Tablo 4.15. Nasal Akıntı örneklerinde yapılan One Step Real Time	51
Tablo 4.16. Oküler Akıntı örneklerinde yapılan One Step Real Time	51
Tablo 4.17. Rektal Sürüntü örneklerinde yapılan One Step Real Time	52
Tablo 4.18. İdrar örneklerinde yapılan One Step Real Time	52
Tablo 4.19. Araştırmada CDV pozitiflik tespit edilen örneklere ait	52
Tablo 4.20. ELISA IgG ve IgM testlerinin karşılaştırılması	56
Tablo 4.21. ELISA IgM ile One Step Real Time RT-PCR	56
Tablo 4.22. ELISA IgG ile One Step Real Time RT-PCR	56
Tablo 4.23. IgM ELISA testi ile Virus İzolasyon testlerinin	57
Tablo 4.24. IgG ELISA testi ile Virus İzolasyon testlerinin	57
Tablo 4.25. One Step Real Time RT-PCR testi ile Virus İzolasyon	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
γ	: Gamma
aa	: Amino Asit
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
bp	: Baz Çifti
B95a	: Marmoset B-Lenfosit Hücresi
CD	: Canine Distemper
CDV	: Canine Distemper Virus
cELISA	: Capture Enzim Bağlı İmmunosorbent Test
CeMV	: Cetacean Morbillivirus
CHO	: Çin Hamsteri Ovaryum Hücresi
CPE	: Sitopatik Etki
DEPC	: Dietilpirokarbonat
DIF	: Direk İmmunofloresan Antikor Boyama Yöntemi
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbeccos's Modified Eagle Medium
DPBS	: Dulbecco's Fosfatlı Tampon Solusyonu
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	: Enzim Bağlı İmmunosorbent Test
EM	: Elektron Mikroskop Tekniği
FAT	: Floresan Antikor Testi
FAM	: 6-carboxyfluorescein
FDS	: Fötal Dana Serumu
FeMV	: Feline Morbillivirus
F	: Füzyon
G	: Guanin
ICTV	: Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi
IFAT	: İndirek Floresan Antikor Testi
Ig	: İmmunglobulin
IP	: İmmunperoksidaz Plak Testi

H	: Hemaglütinin
IHC	: İmmunohistokimyasal
IL	: İnterlökin
kDa	: Kilo Dalton
M	: Matriks
MALT	: Mukoza Bağlantılı Lenfatik
MDCK	: Köpek Böbrek Epitel Hücresi
MeV	: Measles morbillivirus
MHC	: Büyük Doku Uyuşum Kompleksi
M_r	: Bağlı Molekül Kütlesi
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
N	: Nükleokapsit
NTC	: Negatif Kontrol
MV	: Measles Virus
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
P	: Fosfoprotein
PBS	: Phosphate-Buffered Saline
PDV	: Phocine morbillivirus
PPRV	: Small ruminants morbillivirus
RPV	: Rinderpest morbillivirus
RdRP	: RNA-bağımlı RNA Polimeraz
RT-PCR	: Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SLAM	: Lenfosit Aktivasyon Sinyal Molekülü
(ss)RNA	: Tek İplikçikli Ribonükleik Asit
TAMRA	: 6-carboxytetramethylrhodamine
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör- α
UTR	: Translasyona Uğramayan Bölge
Vero	: Afrika Yeşil Maymun Böbrek Hücresi
VN	: Virus Nötralizasyon
vRp	: Viral RNA Polimeraz
μm	: Mikrometre
μl	: Mikrolitre

ÖZET

T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Doktora Tezi

Klinik Semptomlu Köpeklerin Kan, İdrar, Rektal Sürüntü, Nasal ve Oküler Akıntı Örneklerinde Canine Distemper Virus Enfeksiyonunun Real Time RT-PCR ile Tespit Edilmesi

Hasbi SAİT SALTİK
VİROLOJİ Anabilim DALI

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mehmet KALE
BURDUR - 2018

Batı Akdeniz illeri (Burdur, Isparta ve Antalya)'nde CDV'ye özgü klinik semptom gösteren, aşılanmamış, 1 yaş altı, 50 adet köpekten örnekleme yapıldı. Bu amaçla hayvanlardan kan, idrar, rektal sürüntü, nasal ve oküler akıntı örnekleri toplandı. Örnekler serolojik, moleküler ve virolojik yöntemlerle incelendi. Çalışmada en fazla pozitiflik tüm testlerde 0-3 aylık hayvanlarda belirlendi. ELISA (IgM-IgG) ve virus izolasyonunda dişilerde, viral genom tespitine yönelik yapılan testte erkeklerde daha fazla pozitiflik belirlendi. Kan serum örneklerinde CDV'ye özgü IgM ve IgG antikor varlığına yönelik yapılan analizlerin virus izolasyon sonuçlarıyla kıyaslanması sonucu hem erken konvalesan dönemde hem de geç konvalesan dönemde etken izolasyonunun yapılabileceği ortaya kondu. Ayrıca CDV'ye özgü IgM ve IgG antikorlarının her ikisinin birden pozitif olup viral nükleik asidin tespit edilmediği durumlarda, virus izolasyonunun yapılabileceği saptandı. Toplamda 250 örnekte viral genom RNA varlığı One Step Real Time RT-PCR tekniğiyle araştırıldı. Bu metot ile en fazla pozitiflik (% 93.75) rektal sürüntü örneklerinde tespit edildi. Pozitif rektal sürüntü örneklerinin temin edildiği hayvanlarda öncelikle sindirim ve merkezi sinir sistemi semptomları gözlemlendi. Virus izolasyonu için tüm örnekler MDCK hücre kültürlerine ekildi. Bu metot ile de en fazla pozitiflik (% 93.75) rektal sürüntü örneklerinde tespit edildi. Pozitif rektal sürüntü örneklerinin temin edildiği hayvanlarda öncelikle solunum, sindirim ve merkezi sinir sistemi semptomları gözlemlendi. Tüm örneklerin meydana getirdiği CPE'ler üç derecede incelenerek; ileri(+++) seviye CPE meydana getiren örneklerin rektal sürüntü ve idrar örnekleri olduğu, düşük(+) seviye CPE meydana getiren örneklerin lökosit örnekleri olduğu belirlendi. Bu çalışmada, CDV enfeksiyon teşhisinde kullanılan testler arası korelasyonlar istatistiki açıdan önemli bulundu. Batı Akdeniz Bölgesi'nde aşılanmamış ve CDV enfeksiyonuna ait klinik semptom gösteren köpeklerden alınan farklı örneklerden 105 (%42) adet CDV genomu tespit edildi. Ayrıca çalışmada 39 (%78) köpekten alınan muhtelif örneklerden virus izolasyonu yapıldı.

Anahtar kelimeler: **Canine distemper virus, DIF, İzolasyon, MDCK, Real Time PCR**

“Bu araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 0403-DR-16”

ABSTRACT

**Mehmet Akif Ersoy University
Institute of Health Science
Doctora Thesis**

Investigation of Canine Distemper Virus by Real Time RT-PCR Technique In Blood, Urine, Rectal Swab, Nasal and Ocular Discharge Samples of Dogs With Clinical Signs

**Hasbi SAİT SALTİK
Department of VİROLOJİ**

**Supervisor
Prof. Dr. Mehmet KALE
BURDUR - 2018**

In Western Mediterranean provinces (Burdur, Isparta and Antalya) the samples of 50 unvaccinated dogs under 1 year age which show CDV-specific clinical symptoms were taken. For this purpose, blood, urine, rectal swab, nasal and ocular discharge specimens obtained from these dogs were collected. Specimens were examined by serological, molecular and virological methods. In this study, the highest positivity in all tests was detected in one-three month animals. More positivity was detected in ELISA (IgM-IgG) and virus isolation for females, and viral genome detection test for male dogs. By analysis presence of CDV specific IgM and IgG in blood serum samples with isolation results showed that virus isolation can be done in both early and late convalescence period. In a total of 250 samples, the presence of viral genomic RNA was investigated by One Step Real Time RT-PCR method. With this method, the highest positivity (93.75%) was detected in rectal swab specimens. In animals where positive rectal swab specimens were obtained primarily symptoms of digestion and central nervous system were observed. All samples for virus isolation were seeded into MDCK cell cultures. With this method, the highest positivity (93.75%) was also detected in rectal swab specimens. In animals where obtained primarily respiratory, digestive and central nervous system symptoms were observed. The CPEs of all samples used in the study were examined at three rates after the seeding of the MDCK cell cultures. It was determined that the samples which showed high level(+++) CPE were rectal swabs and urine specimens while the leukocyte samples which showed low level(+) CPE. By this method, the highest positivity (%62) was detected in RS samples. Mixed symptoms were also observed in animals with the most positive RS samples, as well as primarily digestive system symptoms. In this study correlations between tests which are used in diagnosis of CDV infection were significant in terms of statistic. 105 (42%) CDV genomes were detected in different samples from unvaccinated and symptomatic dogs of the CDV infection in the Western Mediterranean Region. In addition, virus was isolated from 39 (78%) dogs.

Key Words: Canine distemper virus, DIF, Isolation, MDCK, Real Time PCR

“This study was supported by Mehmet Akif Ersoy University Science Research Projects Unit. Project number: 0403-DR-16”

1. GİRİŞ

Paramyxoviridae ailesinde, Morbillivirus genusunda yer alan Canine Distemper Virus (CDV) özellikle bağışıklığı yeterince uyarılmamış genç köpekleri uzun yıllardır tehdit etmektedir. İlk defa Ulloa 1746 yılında adlı araştırmacı tarafından Güney Amerika'da, sonraki yıllarda Avrupa ve Rusya'da Canine Distemper (CD) hastalığının bulgularına raslanmıştır. CD ilk defa Henri Carré tarafından 1905 yılında tanımlanmış olup, 1926 yılında etiyolojik olarak kanıtlanmıştır (12, 21). 1950'lerde attenüe canlı CDV aşısı kullanılmaya başlanmıştır (22). Ülkemizde ve Dünya'da yaygın olarak uygulanan aşılama programları CD'ye karşı alınan önlemlerin temelini oluşturmaktadır. Bu aşılama programlarıyla birlikte evcil köpeklerde CD'nin görülme oranı çarpıcı biçimde azaltılabilmektedir (62). Ancak, yaygın aşılama programlarına rağmen CDV günümüze kadar varlığını koruyabilmektedir. CD köpeklerde ve diğer karnivorlarda enzootik bir enfeksiyona neden olmaktadır. Köpeklerin en önemli enfeksiyonlarından biri olarak bilinen CD'nin başlıca; sindirim, solunum ve sinir sistemi bozukluklarının yanı sıra şiddetli immunsupresyona da neden olduğu bildirilmiştir (84). Özellikle aşılanmamış yavru köpeklerde yüksek mortalite ve morbidite oranlarına sahip olduğu görülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, CD'nin özellikle aşısız evcil ve başıboş köpekler için tehdit konumunda olduğunun üzerinde durulmaktadır (29, 43). Ayrıca bu hastalığın, vahşi hayattaki birçok karnivor türü için hala daha öldürücü etkiye sahip olduğu bilinmektedir (24). Bu durum hastalığın teşhisi konusunda doğru örnekleme yapılarak daha etkin tekniklerin kullanılmasıyla birlikte özellikle ülkemizde var olan bölgesel suş veya suşların daha detaylı araştırılmasını ve mücadele programlarının kapsamının genişletilmesini gerektirmektedir.

Bu çalışmada CDV varlığı yönünden Real Time RT-PCR tekniğiyle tespit edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca çalışmada pozitif olarak tespit edilen numunelerin devamlı hücre kültürlerine ekilerek, bölgesel suşun izole edilmesi de hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Taksonomi ve Sınıflandırma

CDV, *Paramyxoviridae* ailesi *Mononegavirales* takımı içerisinde yer almaktadır. *Morbillivirus*, *Paramyxoviridae* ailesinde bulunan 7 genustan biridir. Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (ICTV)'nin verilerine göre *Morbillivirus* genusunu köpeklerde canine morbillivirus (CDV), deniz memelilerinde Cetacean morbillivirus (CeMV), kedilerde Feline morbillivirus (FeMV), insanlarda Measles morbillivirus (MeV), fokgillerde Phocine morbillivirus (PDV), sığırlarda Rinderpest morbillivirus (RPV) ve koyun-keçilerde small ruminant morbillivirus (PPRV) tarafından oluşmaktadır (2). Bu genusta yeralan virus türleri arasında antijenik yakın ilişki olduğu bildirilmiştir (13). Morbillivirus ismi “il morbo (veba)” dan ayırmak amacıyla İtalyanca küçük hastalık manasına gelen “morbili” isminden türetilmiştir. Morbilliviruslar'ın nöroaminidaz aktivitesi yokluğu ve intra nükleer inklüzyon cisimciği oluşturması nedeniyle diğer Paramyxovirus'lardan farklı olduğu bildirilmiştir (80). Serolojik olarak tek tipe sahip olan CDV'nin antijenik çeşitlilik nedeniyle farklı genotipik suşları bulunmaktadır. CDV hastalığının şiddeti ve nöroinvasif olması farklı genotipteki suşlara göre değişiklik göstermektedir (42).

2.2. Virion Özellikleri

2.2.1. Morfoloji

Virus'un 150-350 nm çapta, pleomorfik ve filamentöz formu yaygın olmasına rağmen genellikle küresel şekilde bir morfolojiye sahip olduğu bildirilmektedir. Enfekte bir hücrenin kesitinde, filamentöz partiküllerin 150 – 1000 nm uzunlukta görüldüğü rapor edilmiştir. Helikal simetriye sahip olan nükleokapsit, lipit yapıda zar tabakasıyla sarılmıştır. Zarın direkt olarak enfekte konak hücre plazma membranından tomurcuklanarak meydana geldiği bildirilmiştir. Zarın dış yüzeyinde 10-15 nm uzunlukta Hemagglütinin (H) ve 10-13 nm uzunlukta Füzyon (F) transmembran glikoproteinler bulunmaktadır (37, 69). Zarın dış yüzeyindeki homo-oligomer ve spike-like (çıkıntı benzeri) yapıların morfolojik olarak birbirlerinden farklı olduğu belirtilmiştir. Zarın iç yüzeyini nükleokapsit ve transmembran glikoproteinlerin sitoplazmik uzantılarıyla etkileşim halinde olan Matriks (M) proteini oluşturmaktadır.

M proteini virus olgunlaşmasında anahtar rol oynamaktadır. Helikal nükleokapsit, zar içerisinde genomik RNA'ya bağlı simetrik bir sargı halinde paketlenmiştir. Bu simetrik sargıda yaklaşık 2500 kopya Nükleokapsit (N) proteini bulunurken, az miktarda da Fosfoprotein (P) ve Large (L) proteinlerinin kopyası bulunmaktadır (80). Virion'un sükröz ve sezyum klorürdeki buoyant yoğunluğu sırasıyla 1.18-1.20 g cm³, 1.30-1.31 g cm³ olarak bildirilmiştir. Virion içinde viral polimeraz enzimi bulunmaktadır (6, 63).

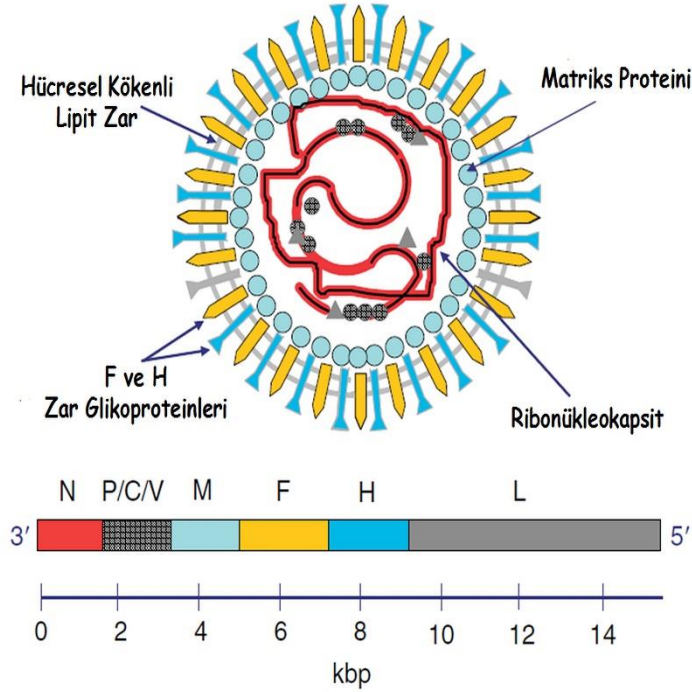
2.2.2. Nükleik Asit

Lineer, negatif anlamlı, tek iplikçikli (ss)RNA genomu, nükleokapsit form içinde ve enfeksiyöz özelliktedir. CDV genomunun büyüklüğü yaklaşık 15,690 nükleotit (nt) olarak bilinmektedir (31). Her bir adet nükleokapsit proteininin 6 nt'e bağlanmasından dolayı *Paramyxovirinae* alt ailesinde yer alan üyelerin (MeV: 15.894 nt, RPV: 15.882 nt, CeMV: 15.702 nt vb.) nt uzunlukları altının katları şeklindedir., "Altı Kuralı" olarak bilinen bu durum RNA replikasyonu için önem arz etmektedir. Virion ağırlığının % 0.5'lik kısmını oluşturan genomun bağıl molekül kütlesi (M_r) 5 x 10⁶ olarak bildirilmiştir (2, 63).

2.2.3. Yapısal ve Düzenleyici Proteinler

CDV'nin yapısal olmayan C ve V proteinleri ile yapısal L, H, P, N, F ve M proteinlerine sahip olduğu bildirilmiştir. Yapısal olmayan C ve V proteinleri P genindeki alternatif Açık Okuma Çerçevesi (ORF) tarafından kodlanmaktadır. CDV genomu, 3' başlangıç ve 5' bitiş dizileri tarafından çevrilmektedir. Bu dizilerin viral replikasyon sırasında genom ve anti-genom üretilmesi için çok gerekli olduğu düşünülmektedir (100). CDV'nin 8 proteini kodlayan 6 adet gen içerdiği, bütün genlerin 3' ve 5' Translasyona Uğramayan Bölge (UTR)'lere sahip olduğu ve birbirinden CUU kodonu ile ayrıldığı bildirilmektedir. N geni hemen 3' ucunda lokalize olmuştur ve 5' ucuna doğru onu sırasıyla P, M, F, H ve L geni takip etmektedir. M ve F genleri arasında kalan bölge ile H proteininin çok değişken, N, P, M ve L genlerinin ise yüksek derecede korunaklı olduğu bildirilmiştir (64). Fakat yapılan çalışmalar olası mutasyonların sadece zar proteinlerinde değil N, P ve L gibi

polimeraz kompleks proteinlerinde de meydana gelebileceğini göstermektedir (87, 98).



Şekil 2.1. RNA genomu içerisindeki proteinlerin 3'→5' yönünde doğrusal dizilimi ve Morbillivirus virion yapısının şematik görünümü (63).

Hem genomik hem de anti-genomik viral RNA'yı enkapside eden nükleokapsit (N) proteini morbilliviruslar içerisinde oldukça korunaklı bir gen bölgesi tarafından kodlanmaktadır. 58 kilodalton (kDa) ağırlığında olan N proteini 523 amino asit (aa) uzunluğa sahiptir. N proteini helikal simetriye sahip olan CDV'nin nükleokapsit yapısını oluşturarak viral nükleik asidi hücre içi proteolitik etkenlerden korumaktadır. M proteini ile ilişki kurarak viral partiküllerin tomurcuklanması ve yeni partiküllerin birleşmesini indüklediği bildirilmiştir. Ayrıca persistentliğin gelişmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (103).

P geni tarafından 3 bağımsız mRNA üretilerek 54 kDa ağırlığında ve 507 aa uzunluğa sahip fosfoprotein kodlanmaktadır. P proteininin C-terminal bölgesi aracılığıyla transkriptaz kompleks formunu oluşturmak için L proteiniyle ilişki kurduğu düşünülmektedir. P proteininin N-terminal bölgesi viral nükleik asitle

bağlantısı olmayan çözülebilir monomerik N proteini ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (90).

299 aa uzunlukta 33 kDa ağırlıkta olan V proteini viral polimeraz tarafından önceden tasarlanmamış bir Guanin (G) bazı eklenmesi sonucu sentezlenmektedir. Bu durum RNA düzeltilmesi olarak da tanımlanmıştır. MeV'ta olduğu gibi V proteini ana immün interferens proteini olarak bilinmektedir (60, 90).

C proteini mRNA'ları alternatif bir okuma çerçevesinin transkripsiyonu sayesinde P geninden sentezlenir. 174 aa uzunluğundaki C proteini 20 kDa ağırlığa sahiptir. CDV C proteininin rolü çok az bilinmekle beraber MeV C proteini gibi partikül birleşmesi ve salınmasında rol alabileceği düşünülmektedir (23).

M proteini, yüzey glikoproteinleri (H ile F) ve N proteini arasında köprü görevi görmektedir. M geni ORF 335 aa ve 38 kDa moleküler ağırlığında olup M proteinini kodlamaktadır. M proteini virus olgunlaşma aşamasında önemli rol oynamaktadır. CDV M proteininin C terminus bölgesi hücre yüzeyindeki glikoproteinlerle etkileşime geçerek füzyonu durdurduğu bildirilmiştir (103). CDV enfeksiyonu sırasında hücre zararı sınırlandırmak için M ve N proteinlerinin sinerjik olarak hareket ettiği belirtilmiştir. M geni çıkarılan MeV'nin virus salınım mekanizması bozulmasından dolayı aynı durumun CDV için de geçerli olabileceği düşünülmektedir (84).

F proteini, 135 aa'lık long N-terminal sinyal peptitleri hariç tip I integral membran proteindir. Önce N-glikanları kazandığı endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı'nda 527 aa'lık öncü F₀ proteini şeklinde sentezlenmektedir (9). Daha sonra bu öncü protein glikolizasyon ve endoproteolizise uğrayarak sırasıyla 40 kDa ve 20 kDa moleküler ağırlığa sahip F1 ve F2 alt ünitelere ayrılır. Böylece biyolojik olarak aktif F proteini meydana gelmektedir. F proteini 4-5 adet potansiyel N-bağlı glikolizasyon bölgesi içermektedir. N-glikanlar viral füzyon aktivitesi ve doğru hücre yüzeyi ekspresyonu için önem arz etmektedir. Ayrıca F proteininin sinsityal dev hücre oluşumuna neden olan ana etkenlerden biri olduğu bildirilmektedir (3, 97).

CDV H proteini 607 aa uzunlukta ve 76 kDa ağırlıkta olduğu bildirilmiştir (10). Yaklaşık 8 adet potansiyel N-glikolizasyon bölgesi içermektedir (85). Tip II integral membran glikoproteini olan H proteini virusun konak hücre reseptörlerine

tutunmasında görev almaktadır (64). Bu nedenle CDV'nin tropizm ve patogeneğinde çok kritik bir rol oynadığı bildirilmektedir (96). *Paramyxoviridae* ailesinde bu tutunma proteini belirleyici rol oynamaktadır. Paramyxovirüslerde hem hemagglütinasyon hem neuroaminidaz, morbillivirüslerde sadece hemagglütinasyon aktiviteli tutunma proteini bulunmaktadır. Pneumovirüslerdeki tutunma proteininde ise ne hemagglütinasyon ne de neuroaminidaz aktivitesi gözlenmektedir (25, 52). H proteini CDV izolatları içinde en fazla genetik çeşitliliğe sahip olan gen tarafından kodlanmaktadır. Dolayısıyla filogenetik analizlerde bu gen bölgesi yaygın olarak kullanılmaktadır (92).

CDV genomu tarafından kodlanan en büyük protein 246 kDa ağırlıkta 2184 aa uzunlukta L proteini multifonksiyonel bir RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRP)'dir. L proteini P proteini ile birlikte viral mRNA'ları transkribe eden transkriptaz kompleksini oluşturmaktadır (4). Bu L-P protein kompleksi virus partikülünün içine yerleşmek için N proteini ile etkileşime geçerek anti-genomik ve genomik RNA'yı oluşturmaktadır. Genom pozisyonu 5' ucuna yakın olmasından dolayı enfekte hücrelerde en az miktarda sentez edilmektedir (84). Viral transkripsiyon ve replikasyonda önemli rol oynamaktadır (52).

2.3. Biyoloji

2.3.1. Replikasyon

CDV replikasyonu, daha çok diğer paramyxovirus transkripsiyon ve replikasyon stratejileriyle kıyaslanarak açıklanmaya çalışılmıştır. CDV'nin transkripsiyon ve replikasyon aşamalarının sitoplazmada gerçekleştiği düşünülmektedir (44, 52). CDV'de konak hücre yüzeyi ile etkileşim nöroaminidaz aktivitesi görülmeyen H proteini ile olmaktadır. Membran füzyonunun gerçekleşebilmesi için F proteininin aktif halde olması gerekmektedir. F proteininin aktifleşmesi sonrası, viral membran ile hedef hücre plazma membranı arasında füzyon gerçekleşmektedir (105). Virus partikül içeriğinin hücre sitoplazmasına aktarılmasıyla penetrasyon aşaması meydana gelmektedir. Fujiata ve ark. (34) tarafından yapılan bir çalışmada ekstrasellüler matrikste yer alan Heparin Sülfat maddesi virus tutunması ve girişinde rol oynadığı rapor edilmiştir. Viral RNA polimeraz (vRp) genomun 3' ucundan başlayarak henüz işlevsel olmamış öncül RNA'ları sentezlemektedir (84).

Yine vRp sayesinde 5' ucuna cap (7-metil guanozin) 3' ucuna poli A bağlanmaktadır. İntronların kesilip ekzonların birleştirilmesinden sonra da viral RNA olgun ve işlevsel hale gelmektedir (1). Viral transkripsiyon sitoplazmada gerçekleştiğinden viral mRNA'lar translasyon için direk olarak ribozomlara gitmektedir. Viral replikasyon partikülleri (vRp)'nin genomik kalıptan ayrılmadan önce gen birleşim bölgelerinde ya durduğu ya da bir sonraki başlama sinyaliyle yeniden harekete geçtiği düşünülmektedir. Transkripsiyonel Dur – Başla Mekanizması (Stop-Start model of Transcription) olarak bilinen bu durum farklı bir mRNA sentezlenmesine neden olmaktadır (52). Son olarak vRp negatif polariteli anti genomları sentezlemektedir. Sentezlenen RNA'ların hepsi altının katları kadar nükleotit içermektedir (17). Enfekte hücrede yeterli genomik RNA ve viral protein sentezlendikten sonra virus toplanması gerçekleşmekte ve projeni virionlar tomurcuklanarak enfekte hücre membranından ayrılmaktadır (4).

2.3.2. Konakçı Spektrumu

CDV'nin *Canidae*, *Procyonidae*, *Mustelidae*, *Mephtidae*, *Hyaenidae*, *Ailuridae*, *Viverridae*, *Ursidae* ve *Felidae* ailelerinde yer alan türleri doğal olarak enfekte edebildiği bildirilmektedir (7, 62). CDV, *Phocidae* familyasında yer alan bazı deniz memelilerinde görülen toplu ölümlerden sorumlu tutulmuştur (49). Ayrıca *Cercopithecidae* ailesinde yer alan Japon Makak ve *Tayassuidae* ailesinde yer alan Yakalı Pekari'de de CDV varlığı rapor edilmiştir (20). Deneysel olarak intraserebral inokulasyon sonrası fare ve hamsterlarda Merkezi Sinir Sistemi (MSS) bulguları tespit edilmiştir. Çok geniş bir konakçı spektrumu olmasına rağmen CDV'nin ana rezervuar konakçısı köpekler olarak bilinmektedir (37). Vahşi yaşamda köpek harici diğer türlerde CDV'nin bu kadar yaygın olmasından H geninde meydana gelen moleküler değişiklikler sorumlu tutulmasına rağmen (41, 65), Gowtage-Sequeira ve ark. (35) tarafından yapılan bir çalışmada H geninde meydana gelen değişikliğin etkili olmadığı bildirilmiştir.

2.3.3. Hücre Kültürü

CDV köpek, gelincik, insan, maymun, sığır ve kanatlı orijinli primer ve devamlı hücre kültürlerinde karakteristik Sitopatik Etki (CPE) meydana getirerek

üretilebilmektedir (6, 14-16, 59). Özellikle primer köpek ve gelincik hücre kültürlerinde eozinofilik intrasitoplazmik ve intranükleer inklüzyon cisimcikleriyle birlikte sinsityum veya yıldız hücrelerinin oluşumu ile karakterize CPE'lere raslanmaktadır (15). Köpek Böbrek Epitel Hücresi (MDCK), Afrika Yeşil Maymun Böbrek Hücresi (Vero), Marmoset B-Lenfosit Hücresi (B95a) ve Çin Hamsteri Ovaryum hücresi (CHO) gibi devamlı hücre kültürleri veya bu kültürlerin yüzeylerinde CD150 olarak da bilinen Lenfosit Aktivasyon Sinyal Molekülü (SLAM) sunan klonları deneysel çalışmalar, aşı ve virus üretilmesi için tercih edilmektedir (6, 87, 96, 99). SLAM reseptörleri CDV'nin hücre içine girmesini kolaylaştırmaktadır. CDV'nin lipid içeren zarlı yapısından dolayı çevre şartlarına hassas olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla sahadan elde edilen suşların hücre kültürlerinde izolasyonunu zorlaştırmaktadır. Buna rağmen saha izolatlarının köpek ve dağ gelinciği makrofajlarında kolaylıkla replike olduğu bildirilmektedir. Bunun makrofajların hücre yüzeylerinde CD150 reseptörleri bulunmasından dolayı olduğu düşünülmektedir (92).

2.3.4. Kimyasal ve Fiziksel Ajanlarla İnaktivasyon

CDV ultraviyole ışığa, ısıya, kurumaya, eter, kloroform, fenol (%0.75) gibi iyonik ve iyonik olmayan deterjanlara, formaldehit (%0.5'ten daha düşük oranlarda) ve oksitleyici ajanlara oldukça duyarlı olduğu bildirilmektedir. Etken, doku kesitlerinde ve vücut ekskret/sekretlerinde 37°C'de 1 saat, oda sıcaklığında (20°C) 3 saat, 0°C- 4°C arası 1 hafta, -65°C ve daha düşük sıcaklıklarda ise en az 7 yıl kadar ve pH 4.5 ile 9.0 arasında stabil kalabilmesine rağmen 60°C'de 30 dakikadan sonra inaktive olduğu bildirilmektedir (6). Bussell ve ark. (14) tarafından yapılan bir çalışmada CDV'nin kanatlı embriyonal hücre kültüründe ısı ile inaktivasyonu sonucu etkenin viral yarı ömrü 21°C'de 120 dk, 37°C'de 60 dk, 45°C'de 10 dk, 56°C'de 3 dk olarak belirlenmiştir. Ticari kullanımlar ve laboratuvar çalışmaları için en uygun saklama koşulu olan liyofilizasyon ile 4°C'de 2-3 yıl saklanabilmektedir. CDV'nin zarlı olmasından dolayı rutin dezenfektan koşullarının virus inaktivasyonu için yeterli olacağı bildirilmiştir (37).

2.4. Epidemiyoloji

H genine dayalı yapılan dizi analizlerine göre filogenetik olarak Dünya genelinde CDV'nin Asya-1-2, Amerika 1-2, Arktik-like, Avrupa 1-2, Güney Amerika 1-2 ve Güney Afrika suşları olduğu rapor edilmiştir (74). CD, evcil ve yabani karnivorlarda dönemsel salgınlara neden olabilmektedir. Hastalık dünya genelinde özellikle yavru köpeklerde şiddetli ve yaygın olarak görülebilmektedir. Düzenli aşılamaların yapılmadığı ve sokak köpeklerinin yaygın olarak bulunduğu kentsel ve kırsal alanlarda CDV'nin görülme oranı oldukça yüksektir (26). CDV özellikle maternal antikorları olmayan veya az olan genç köpeklerde sıklıkla görülmektedir. Attenüe canlı aşının 1950'li yıllarda geliştirilmesinden sonra özellikle gelişmiş ülkelerdeki evcil köpeklerde CDV'nin görülme oranının düştüğü gözlenmiştir (18, 62). Bir çok yabani hayvan türünün CDV enfeksiyonuna hala duyarlı olduğu bilinmektedir (7, 72). Enfeksiyona duyarlı yabani türler rezervuar görevi görerek hem evcil hem de yabani hayvanlar için risk oluşturmasına rağmen, asıl rezervuarın köpekler olduğu bildirilmiştir (37).

Enfekte köpeklerin solunum yollarında bol miktarda viral etken bulunmaktadır. Bundan dolayı hastalık genellikle hava ve damlacık yollarıyla bulaşmaktadır. Hastalık özellikle yavru ve aşısız köpeklerin akut ve subklinik enfekte diğer köpeklerle direkt veya indirekt temas etmesi sonucu kolaylıkla yayılabilmektedir (6). CD yeni doğan köpeklerin ilk 12 aylık döneminde ciddi tehdit oluşturmaktadır. Bu dönemde köpekler kolostrum veya aşı ile gerekli antikorları almamış ise hastalığa çok kolay yakalanabilmektedir (29, 43). Aşılı hayvanlar dahil her yaşta köpekte immun sistemin herhangi bir nedenle baskılanması veya enfekte hayvanlarla sürekli teması sonucu da enfeksiyon oluşabileceği bildirilmektedir. Hastalığın görüldüğü belirli bir mevsimsel dönemi olmasa da soğuk aylarda daha sık ortaya çıkmaktadır. Brakiyosefal köpeklerin dolikosefal anatomik yapılı köpeklere göre hastalığa daha az yakalandığı ve bu hayvanlarda mortalitenin daha düşük olduğu rapor edilmiştir (37).

2.5. Patogenez

CDV temas, damlacık ve hava yoluyla bulaşarak ilk olarak üst solunum yolları mukozasındaki immun sistem hücrelerinde lokalize olmaktadır. Diğer morbilliviruslar

gibi CDV de üzerinde CD150 reseptörü bulunan makrofaj, timosit, dendritik hücre, T ve B lenfositleri enfekte etmektedir (45, 93). Enfeksiyonun başlamasından sonra 2-4 gün içerisinde enfekte immun sistem hücrelerinin lokal lenf düğümleri (Tonsil, retrofaringeal ve bronşiyal), dalak ve timusa göç etmektedir. 3-6 gün sonra tüm lenfatik dokunun enfeksiyonu sonucu primer viremi ile birlikte 5-7. günlerde geçici bir ateş ve lenfopeni gözlenmektedir (58, 98). Enfeksiyon sonrası 4 ile 6 günler arası, virus lenfatik sistem boyunca yayılarak alt solunum yolları, gastro-intestinal sistem, lenfoid organlar, karaciğer kupffer hücreleri, idrar kesesi epitelleri ve MSS'ye kadar ulaşabilmektedir. Bu generalize enfeksiyon tablosunda kanda yeni enfekte olan mononükleer hücreler sekonder viremiye neden olmaktadır (62). Böylece 2 fazlı ateş yükselmesi gerçekleşmektedir (7). Sekonder viremi vücuttaki duyarlı epitel hücrelerin enfeksiyonuna neden olmaktadır. Hastalık, enfekte solunum, ürogenital ve konjunktiva epitellerinden meydana gelen viral saçılım ile daha da hızlı yayılmaktadır (62). Sonuç olarak deri döküntüsü, seröz burun akıntısı, konjunktivit, anoreksi vb. ile karakterize semptomlar meydana gelebilmektedir (98).

Enfeksiyon sonrası 14 ile 21 günler arası, zamanında ve yeterli immun yanıt oluşursa virus elemine edilebilmektedir. Virus, yeterli düzeyde immun yanıt oluşmadığı zamanlarda (enfeksiyon sonrası 9 ile 14 gün arası) deri, salgı bezleri, sindirim, solunum ve ürogenital sistem epitellerine sıçramaktadır. Özellikle idrar kesesi epitel hücreleri ve astrositlerin sitoplazmasında veya çekirdeklerinde asidofilik inkluzyon cisimcikleri oluşabilmektedir. Viral partiküller, böyle şiddetli enfekte köpeklerin dokularında ölene kadar kalabilmektedir (37). Virus'un MSS'de persiste kalması sonucu akut dönemde veya iyileşme görüldükten aylar sonra bile sinirsel semptomlar ortaya çıkabilmektedir (67, 84, 89). Enfeksiyon köpeğin bağışıklık durumuna göre klinik olarak akut, subakut veya kronik bir hal almaktadır. CDV enfeksiyonlarında virusun suşuna, konak yaşı ve immun durumuna bağlı olarak akut ensefalomyelitis, ayak taban yastığı ve burun ucu hiperkeratozuna sıklıkla karşılaşılmaktadır (62, 98). Klinik semptomların görülmesinden birkaç gün önce tüm sekret ve ekskretlerde virus saçılımı başlayıp enfeksiyonun 5-6. haftalarına kadar sürmektedir. Klinik belirti görülen veya görülmeyen enfekte köpeklerin tüm vücut ekskret/sekretlerinden virus saçılabilir (7).

2.6. Patoloji

Akut enfeksiyonlarda özellikle genç köpeklerde seröz ve mukopurulent okulonasal akıntıyla birlikte rhinitis, konjunktivitis, tracheitis, pnömoni, bronşitis ve enteritis meydana gelmektedir (21). Tipik olarak akciğerlerde ödem, alveolar duvarlarda kalınlaşma ve intersitisyel pnömoniyle birlikte özellikle sekonder mikrobiyal etkenlerin devreye girmesi sonucu bronkopnömoniyle karşılaşılmaktadır (57). Sistemik CDV enfeksiyonlarında lenf foliküllerinde çok çekirdekli sınırsız hücre oluşumu ve immun sistem hücre ölümleri görülmektedir (62). CDV'nin serolojik olarak tek tip olmasına rağmen biyolojik olarak farklı suşlara sahip olduğu bilinmektedir (64). Bazı suşlar sinirsel semptomlar ile seyreden yüksek mortaliteli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Enfekte konağın yaşı ve bağışıklık durumu ile birlikte virusun suşuna bağlı olarak MSS'de demyelinizasyon, nöronal nekroz, gliosis ve meningoencephalomyelitis gibi lezyonlar gelişebilmektedir (37). Ayrıca Mukoza Bağlantılı Lenfatik Doku (MALT) kaybı ve timus atrofi de CDV enfeksiyonlarında görülen patolojik bulgular içinde olduğu rapor edilmiştir (11). Doğal enfekte köpeklerin özellikle karın bölgelerinde ve uyluklarında pustuler dermatitis lezyonları oluşmaktadır. Histolojik olarak vezikül ve pustül oluşumuyla birlikte hiperkeratozis bulgularına raslanmaktadır. Enfekte köpeklerin bazılarında ayak taban yastığı ve burun ucu hiperkeratozu hastalığın patognomonik bulgularındandır (38, 39). Akciğer, mide, renal pelvis ve idrar kesesi epitel hücrelerinde, retiküler hücrelerde, lenfositlerde ve astrositlerde oluşan eozinofilik intrastoplazmik ve intranükleer inklüzyon cisimciklerinin CD için karakteristik olduğu bildirilmiştir (11, 54, 62).

2.7. Klinik Bulgular

Klinik bulgular virus saçılımının sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır. CD hastalığında inkubasyon periyodu 1 ile 6 hafta arasında değişiklik göstermektedir (63). Genel olarak inkubasyon periyodunun 3 ile 6. günlerinde 39-41 °C'ye varan birinci ateş safhası görülmektedir (11). İmmun sistemin baskılandığının en önemli göstergesi olan lenfopeni, enfeksiyon sonrası 5-7. günlerde ortaya çıkmaktadır (58). Akut enfeksiyonlarda oküler ve nazal akıntı (seröz veya mukopurulent), konjunktivitis, öksürük, pnömoni, letarji, dehidrasyon, iştahsızlık, kilo kaybı, anoreksi, ishal, kusma vs. gibi klinik semptomlar ortaya çıkmaktadır (57). Tremor, ataksi, miyoklonus,

konvulziyon, nistagmus ve paraliz gibi sinirsel semptomlar akut enfeksiyonlarda görülebildiği gibi subklinik veya kronik enfeksiyonları takiben aylar sonra da ortaya çıkabilmektedir (11). Yetişkin köpeklerde kronik veya yavaş ilerleyen CDV enfeksiyonu sonucu ortaya çıkan bu durum “Yaşlı köpek ensefaliti (Old dog encephalitis)” olarak da bilinmektedir. Duyarlı epitel hücrelerin etkilenmesi sonucu bazı enfekte köpeklerde ayak taban yastığı ve burun ucunda hiperkeratoz görülebilmektedir. Birinci ateş yükselmesinden birkaç gün sonra yeni enfekte olmuş periferik mononükleer kan hücreleri ikinci ateş yükselmesi ve lenfopeniye neden olmaktadır (62). Zayıf mukozal bariyerleri ve baskılanmış bir immün sistem, sekonder mikrobiyal enfeksiyonlara zemin hazırlamaktadır. Sonuç olarak böyle hayvanlarda ölüm kaçınılmaz olmaktadır. Hastalık, Dünya genelinde oldukça yaygın, özellikle köpeklerde çok bulaşıcı akut, subakut ve kronik formlarıyla karşılaşılmaktadır. Hastalığın seyri duyarlı konağın yaşı, bağışıklık durumu ve çevresel şartlarının yanısıra Virus’un suşu ve miktarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (63).

2.8. İmmunoloji

Etkenin akciğer, gastrointestinal organlar, idrar kesesi, deri, ayak taban yastıkları ve MSS dahil olmak üzere epitelyal dokularda yayılabilmesi virusun suşuna, konağın yaşına ve immün sistemine bağlı olarak gelişmektedir. CDV özellikle enfeksiyonun ilk haftasında lenfopeniye ve sonrasında lenfatik dokularda nekroza neden olmaktadır. Bu durum enfekte köpeklerde immünyüpresyon oluşmasını tetiklemektedir (5). CDV enfeksiyonlarında ciddi ve uzun süreli immünyüpresyon görülmesine rağmen hayatta kalan köpeklerde ömür boyu süren bağışıklık oluşabilmektedir. Enfeksiyonu atlatan köpeklerden virusun elemine edilebileceği bildirilse de; nöronlarda, burun ucu ve ayak taban yastığı keratinositlerinde kalabileceği de rapor edilmiştir (37). CDV antijenleri astrositlerin yüzeylerinde sunulmaktadır. İmmün sistem hücrelerinin yüzeylerindeki SLAM bu viral antijenlerle etkileşime girmektedir. Antijenler makrofajların ve diğer immün sistem hücrelerinin aktivasyonu ile birlikte T hücrelerine sunulmaktadır. CDV antijenlerine duyarlı hale gelen lenfositler kan yoluyla MSS’ye ulaşmaktadır. Perivasküler hücre infiltrasyonu ile birlikte T ve B lenfositlerde artış meydana gelmektedir. Virus’a karşı immün yanıt olarak B lenfositler tarafından önce CDV spesifik IgM ve IgG nötralizan

antikorları sentezlenmektedir. Virusun suşuna bağlı olarak H ve F zar proteinlerine karşı oluşan nötralizan antikorlar enfeksiyon sonrası 10-20. günlerde saptanabilmektedir. Enfeksiyonu takiben ilk haftadan 3 aya kadar IgM nötralizan antikorlar, iyileşme döneminde de IgG nötralizan antikorlar serumda bulunabilmektedir (5). Serum IgG varlığı ise mevcut veya daha önceden geçirilmiş enfeksiyona ya da hayvanın aşılanmış olduğuna işaret etmektedir (37). Ayrıca mononükleer hücrelerin perivasküler infiltrasyonu sonucu İnterlökin (IL)-6, IL-8, IL-12 ve Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α) gibi sitokinler de salgılanmaktadır (70). B lenfositlerden salgılanan CDV spesifik antikorlar enfekte astrositlerin antijenlerine bağlanarak SLAM ve makrofajların Büyük Doku Uyuşum Kompleksi Sınıf 2 (MHC-II) moleküllerinin sunulmasını arttırmaktadır. Böylece humoral ve hücrel bağışıklık mekanizmaları devreye girmektedir. Her iki immun yanıtın da hastalığın klinik seyrinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Hücrel immun yanıt enfeksiyon sonrası 10-14. günlerde görülmeye başlayıp 14-28. günlerde maksimum seviyeye geldiği ve 6-10. haftadan sonra da dereceli olarak azalıp kaybolduğu bildirilmiştir (5). CDV enfeksiyonunda akut dönemde ve subakut dönemde ilk olarak T lenfositler etkilendiği için hücrel bağışıklık mekanizması baskılanmaktadır (56). Bu dönemlerde IgM antikorları saptanabilmesine rağmen yeterince antikor sentezlenmeden enfekte köpeklerin ölebileceği de bildirilmiştir (5). Hücrel bağışıklık mekanizmasının enfeksiyondaki rolüyle ilgili çok az bilgi mevcuttur. Nielsen ve ark. (70) tarafından minklerde yapılan çalışmada CDV'nin suşu ile lenfosit aracılı sitotoksosite düzeyi arasında hastalıktan korunmada pozitif bir ilişki olduğu bildirilmiştir.

2.9. Tanı

2.9.1. Klinik Tanı

Özellikle aşısız ve genç köpeklerde meydana gelen solunum, sindirim ve sinir sistemi semptomları klinik olarak ilk önce CD hastalığını akla getirmektedir. Akut sistemik CD enfeksiyonlarında serumdaki biyokimyasal değişiklikler spesifik olarak gelişmemektedir. Prenatal ve neonatal enfekte köpeklerde virustan kaynaklanan immunsupresyon nedeniyle hipoglobulinemi görülebilmektedir. Total protein anazilinde ergin köpeklerde albumin azalması, alfa (α) ve gamma (γ) globulin artması görüldüğü bildirilmiştir (37). Lenfopeni, trombositopeni ve anemi özellikle 3

haftalıktan küçük enfekte köpeklerde görülürken, daha yaşlı ve doğal enfekte köpeklerde bu bulgulara nadir olarak rastlanmaktadır (5).

2.9.2. Laboratuvar Tanı

2.9.2.1. Virolojik Tanı

Hastalıkta konjunktival, nasal, rektal sürüntüler, dışkı, Beyin Omurilik Sıvısı (BOS), kan ve idrar gibi bir çok marazi madde virolojik tanı amaçlı kullanılabilir. Antemortem muayenede akciğer, bağırsak, böbrek, beyin, dalak, idrar kesesi vb. iç organ kesitleri viral antijen varlığını ortaya koymak için kullanılabilir (5, 28). Bu doğrultuda viral antijen varlığını ortaya koymak için İmmunohistokimyasal (IHC) (54), Floresan Antikor Testi (FAT) (38) ve Enzim Bağlı İmmunosorbent Test (ELISA) sıklıkla tercih edilen yöntemler arasında yer almaktadır (61, 62).

2.9.2.2. Virus İzolasyonu

Virulent CDV'nin makrofaj ve aktif lenfositlerde üretilip ilk adaptasyonu yapıldıktan sonra primer köpek akciğer hücreleri ile MDCK ve Vero gibi permanent hücre kültürlerinde çoğaltılarak izole edilebileceği bildirilmiştir (37, 62). Virolojik tanı için kullanılan marazi maddelerden hazırlanan inokulumlar duyarlı hücre kültürlerine ekilebilir. İzolasyon için alınan örneklerin özellikle enfeksiyonun akut döneminde olması tercih edilmektedir (5).

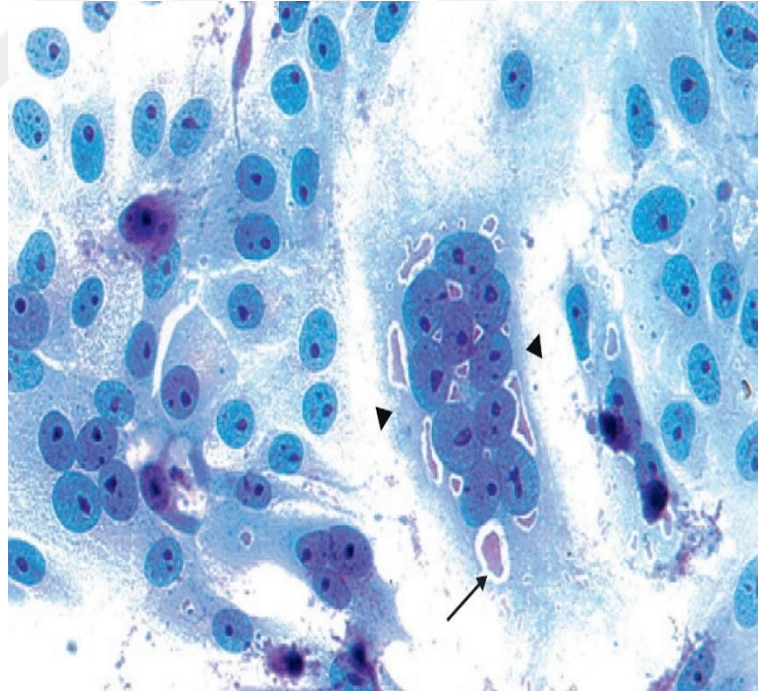
2.9.2.3. Moleküler Tanı

Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)'nin oldukça duyarlı bir yöntem olduğu bilinmektedir. Sublinik veya klinik olarak CDV enfekte köpeklerden temin edilen çeşitli örneklerde RT-PCR testi ile viral nükleik asit tespiti yapılmaktadır (33, 50, 88). Ölü hayvanlardan uygun şekilde alınan örneklerde moleküler yöntemle etken tespiti yapılabilir. Özellikle subakut ve kronik enfekte köpeklerde CDV enfeksiyonunun RT-PCR yöntemiyle tespit edebilme şansının IHC yöntemlerine göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (47). Son yıllarda CDV'nin hızlı, hassas ve spesifik olarak teşhis edilmesine yönelik TaqMan Prob sistemine dayalı Real Time RT-PCR tekniği geliştirilmiştir (28). Bu teknik PCR için

real time sistemlerde Taq DNA polimerazın 5' nükleaz aktivitesinden faydalanarak floresan probaların kullanılmasına dayanmaktadır. TaqMan probaları 5' ucunda bir raportör (reporter) florokrom ve 3' ucunda baskılayıcı (quencher) florokrom ile işaretlenmiş 18-22 bazçifti (bp)'lik bir oligonükleotitten oluşmaktadır. TaqMan sistemi Real Time PCR testlerinde floresan probaları kullanarak reaksiyon süresi boyunca oluşan tüm spesifik PCR ürünlerin toplamını belirleyebilmektedir.

2.9.2.4. IHC

Wright-Leishman boyama ile lenfositlerdeki inklüzyon cisimcikleri 3 µm'ye kadar varabilen büyüklüklerde, tek, oval ve gri renkte, eritrositlerdeki inklüzyon cisimcikleri çok sayıda yuvarlak ve açık mavi renkte olduğu bildirilmiştir (37). Virüs enfekte hücrelerin belirlenmesinde nadiren kullanılan sitolojik boyama teknikleri virüsün varlığını ortaya koymaya yönelik yapılan tarama testleri için tercih edilebilmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Enfekte Vero hücre kültüründe Cdv inklüzyon cisimcikleri (oklar) ve sinsityum oluşumu (ok başları) (62).

FAT, CDV teşhisi için hızlı, güvenilir ve diğer testlere nazaran daha ucuz olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (46). İnküzyon cisimciklerinin

paramyxovirüs benzeri nükleokapsit yapılarının elektron mikroskopla da tespit edilebildiği bildirilmiştir (37).

2.9.2.5. Serolojik Teşhis

CDV'nin serolojik olarak değerlendirilmesi Virus Nötralizasyon (VN) (77), ELISA (26), İmmunperoksidaz Plak (IP) (91) ve İndirek Floresan Antikor (IFA) (36) testleriyle gerçekleştirilmektedir. CDV'ye karşı oluşmuş IgM varlığının veya nötralizan antikorların dört katlı artışının ortaya konması güçlü bir şekilde CDV enfeksiyonu ile ilişkilendirilmektedir (58, 84). Özellikle rutin teşhis laboratuvarlarında nötralizan antikorların belirlenmesi için duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek ELISA testleri VNT yerine tercih edilmektedir. Ayrıca kan serumlarında IgM varlığının ortaya konmasına yönelik geliştirilen capture-ELISA(cELISA) testi akut CDV hastalığının teşhis edilmesini kolaylaştırmaktadır (95). Serolojik testlerle iyileşme dönemi (konvalesan)'nde oluşan özgül IgG'ler ile aşılama sonrası antikor varlığı ve titresi belirlenebilmektedir. Bu durum subakut veya kronik enfekte köpeklerin antikor seviyeleriyle aşılanmış köpeklerin antikor seviyelerinin kıyaslanmasına imkan sunmaktadır (5).

2.10. Tedavi

Spesifik olarak CDV'ye etkili antiviral bir ilaç bulunmamaktadır. CDV ile enfekte köpeklerin solunum ve sindirim sistemlerinde sıklıkla meydana gelen sekonder bakteriyel enfeksiyonlar için antibiyotik kullanımı tercih edilmektedir. Ayrıca ishal ve dehidrasyona karşı sıvı-elektrolit, iştahsızlığa karşı vitamin, kusmaya karşı anti-emetik, sinirsel semptomlara karşı sedatif ve antikonvulsan uygulamaları hastalığın asemptomatik tedavileri arasında yer almaktadır (5, 37).

2.11. Kontrol ve Korunma

Hastalığın kontrol altına alınabilmesi için temel olarak uygulanan yöntemlerin doğru teşhis, karantina, sanitasyon ve aşılama dayandığı bildirilmektedir (62). CDV'ye özgü herhangi bir antiviral ilaç bulunmadığından semptomatik tedavilerin yanı sıra sekonder enfeksiyonlara karşı antibiyotik kullanılarak hastalıkla mücadele edilebilmektedir (37).

Evcil köpeklerde güvenli bir şekilde uygulanabilen canlı attenüe CDV aşıları ilk defa 1950’lerde geliştirilmiştir (48, 82). Günümüzde hücre kültürü orijinli olan “Rockborn suşu” ve embriyolu tavuk yumurtası orijinli olan “Onderstepoort suşu” yaygın olarak kullanılmaktadır. Her iki aşı da evcil köpeklerde sağlam bir immunizasyon oluşturabilmektedir. Buna rağmen bazı evcil köpeklerde aşılarda risk faktörleri arasında nadiren de olsa ensefalit, immunsupresyon ve trombositopeni bulunabilmektedir (5, 18).

Canlı modifiye aşılarda hayvanat bahçesi ve yaban hayvanlarında yan etkiler meydana getirebileceğinden kullanılmaması tavsiye edilmektedir. Günümüz biyoteknolojik imkanlarıyla canarypox vektör virus veya bazı DNA plasmidlerinde CDV’nin H ve F genlerinin ekspresyonuna dayanarak üretilen rekombinant ve DNA CDV aşıları (75, 102) yaban ile hayvanat bahçesi hayvanlarında etkili ve güvenli bir immunizasyon sağlamaktadır. Nitekim biyoteknolojik aşılarda dev panda ve siyah ayaklı gelincik gibi bazı nesli tükenmekte olan hayvanlarda kullanılmaktadır (62).

Bağışık annelerden doğan yavrular transplasental yolla aktarılmış olan maternal antikolar sayesinde birkaç hafta kadar hastalığa karşı korunabilmektedir (75). Maternal antikoların azalmasından sonra sağlam bir bağışıklık oluşturabilmek için yaşamın ilk 6 ayında yirmi bir gün ara ile iki veya üç kez aşı uygulaması yapılmaktadır. Takip eden yılda booster (bağışıklık arttırıcı) aşı ve her üç yıl da bir de aşı tekrarları yapılması tavsiye edilmektedir (5, 84). Yavru köpeklerde 6 haftalıktan itibaren 16 haftalığa kadar uygulanan aşı programı standart aşı programı olarak bilinmektedir (62). Özellikle maternal antikoların olmadığı durumlarda yavru köpeklerin immunizasyonu canlı attenüe aşılarda gerçekleştirilse de, 4 haftalıktan küçük köpeklerde aşılardan kaynaklı ensefalit oluşabilme riski de göz önünde bulundurulmalıdır (5).

2.12. Tezin Amacı

Dünya’da Sert taban (Hard Pad) hastalığı olarak da bilinen Köpek Gençlik Hastalığı’na neden olan CDV’nin yayılması özellikle damlacık enfeksiyonuyla gerçekleşmektedir. Klinik ve subklinik hasta hayvanların her türlü sekret ve ekskretleri (kan, oküler ve nasal akıntı, dışkı, idrar vb.) ile viral saçılım olabileceğinden kontakt

yolla bulaşma diğer önemli bulaş yollarından biri olarak bilinmektedir. 1 yaş altında hastalığa karşı tam olarak bağışıklığı sağlanmamış genç köpekler bu hastalık için en büyük risk grubunu oluşturmaktadır. Ülkemizdeki evcil köpeklerin yanı sıra özellikle sokak köpekleri bu hastalığın varlığında ve yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Korunma olasılıkları daha yüksek olan evcil köpekler dahil doğal şartlar altında bulunan sokak köpeklerinden doğru ve zamanında alınan örneklerin, duyarlılığı yüksek, özgül ve hızlı tekniklerle analiz edilmesi hastalığın kontrol altına alınmasının temelini oluşturmaktadır. Bu doğrultuda araştırmada incelenen klinik semptomlu köpeklerde öncelikle etkenin N proteinine özgül sentezlenen IgM ve IgG antikorlarının varlığının ELISA yöntemiyle araştırılarak enfeksiyonun döneminin belirlenmesi, temin edilen tüm örneklerde N proteinine özgül sentezlenen primer/prob dizileriyle One Step Real Time RT-PCR tekniğiyle viral nükleik asit varlığının araştırılması, örneklerin virus izolasyonu amacıyla duyarlı MDCK devamlı hücre kültüründe üretilerek bölgesel süşun elde edilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Araştırmada Örneklenen Hayvanlar

Tez çalışmasında, 2015-2017 yılları arasında Batı Akdeniz illeri (Burdur, Isparta ve Antalya)'nden Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi'ne getirilen ve Burdur Belediyesi Sokak Hayvanları Rehabilitasyon Merkezi'nde bulunan köpeklerden alınan örnekler kullanıldı. Örneklemede CDV'ye özgü klinik semptom gösteren veya enfeksiyon riski taşıyan köpekler kullanıldı. Bu doğrultuda 1 yaş altı 50 adet hayvanın serum örnekleri incelendi. Hem klinik ön tanı hem de indirek ELISA IgM ve IgG test sonuçlarına göre pozitif tespit edilen hayvanlardan aynı zamanda lökosit, idrar (Şekil 3.1), rektal sürüntü, nasal ve oküler akıntı örnekleri de temin edildi. Örneklerin tamamı Burdur, Isparta ve Antalya'da yaşayan köpekten sırasıyla 25, 13 ve 12 adet toplandı.



Şekil 3.1. İdrar örneklerinin toplanma çalışmaları.

Örnekleme yapılan hayvanların ırklara göre dağılımı Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Örneklerin ırklara göre dağılımı.

IRK	ADET (%)
Sokak Köpeği	24 (%48)
Melez	9 (%18)
Kangal	7 (%14)
Pitbull	3 (%6)
Zağar	1 (%2)
Drahthaar	1 (%2)
Rottweiler	1 (%2)
Doberman	1(%2)
Alman Kurdu	1(%2)
Golden	1(%2)
Total	50 (%100)

3.1.2. Araştırmada Kullanılan Örnekler

3.1.2.1. Serolojik Çalışmalar

Klinik belirti gösteren 1 yaş altındaki toplam 50 hayvandan kan serum örnekleri toplandı. Test aşamasına kadar örneklerin muhafazası için –80 °C derin dondurucu (Haier, Çin) kullanıldı.

3.1.2.2. Moleküler Çalışmalar

Klinik belirti gösteren 1 yaş altındaki toplam 50 hayvandan kan (Lökosit), idrar, rektal sürüntü, nasal ve oküler akıntı örnekleri toplandı. Araştırma kapsamında CD viral genom varlığı yönünden değerlendirilen örnekler ve sayıları Tablo 3.2’te gösterildi.

Tablo 3.2. Viral genom varlığı yönünden test edilen örnekler ve sayıları.

Örnek Türü	Adet
Lökosit	50
İdrar	50
Oküler Akıntı	50
Nasal Akıntı	50
Rektal Sürüntü	50
Toplam	250

Ekstraksiyon için total RNA izolasyonu (GeneAll® RiboEx™, Kore) solusyonuna ek olarak kloroform (Sigma, ABD), izopropil alkol (Sigma, ABD) ve etanol (Sigma, ABD) gibi saf kimyasallar kullanıldı. Çalışma sırasında ihtiyaç duyulan yüksek devirli döndürme işlemleri için soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya) kullanıldı. Real Time RT-PCR testinde referans suş olarak Onderstepoort suşu kullanıldı. Onderstepoort suşu ticari olarak tedarik edilen canlı attenüe CDV aşısından total RNA izolasyonu yapılarak çalışıldı. Test aşamasına kadar örneklerin muhafazası için –80 °C’lik derin dondurucu kullanıldı.

3.1.2.3. Virus İzolasyon Materyali

Tez çalışması doğrultusunda virus izolasyonu amacıyla CD hastalığı yönünden şüpheli bulunan 50 hayvana ait 250 ayrı örnek kullanıldı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Virus izolasyonu için kullanılan örnek ve sayıları

İzolasyon Materyali	Adet
Lökosit	50
Nasal Akıntı	50
Oküler Akıntı	50
Rektal Sürüntü	50
İdrar	50
Toplam	250

3.1.3. Hücre Kültürü

Bu çalışmada T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Şap Enstitüsü'nden tedarik edilen MDCK An4 devamlı hücre hattı kullanıldı. Hücre kültürü için idame vasat olarak 500 ml'lik steril ticari Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (4.5 g/l), with L-Glutamine (Capricorn, Almanya) kullanıldı. Koruma amaçlı antibiyotik (10000 Units/ml Penisilin, 10.00 mg/ml Streptomisin, 9.00 mg/ml sodyum klorit) (Capricorn, Almanya) ve antimikotik (250 µg/ml amfoterisin B, 205 µg/ml sodyum deoksikolat) (Capricorn, Almanya) kullanıldı.

3.1.3.1. Fötal Dana Serumu (FDS)

Hücre kültürü çalışmaları için gerekli olan FDS (Capricorn, Almanya) ticari olarak 500 ml filtreli ve steril olarak temin edildi. Çalışmalarda kullanılabileceği kadar -20 °C'de muhafaza edilen FDS, kullanım öncesi 56 °C'de 30 dk'da inaktive edildi.

3.1.4. Direkt İmmunofloresan Antikor Boyama Yöntemi (DIF)

Çalışmada inokulasyon için daha önce -80 °C' de muhafaza edilen tüm örnekler MDCK devamlı hücre kültürlerine ekildi. Yeterli inkubasyon süresini takiben virus üremesinin ortaya konması için floresan boya (Fluorescein isothiocyanate) ile işaretli anti-CDV poliklonal antiserum konjugat (VMRD, ABD) ile boyandı. Sonuçlar doku kültürü mikroskobu (Life technologies™ Fluid® Cell Imaging Station, ABD)'nda değerlendirildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin Hazırlanması

3.2.1.1. Kan Örneklerinin Hazırlanması

3.2.1.1.1. Serum Örneklerinin Hazırlanması

Silikonlu tüplere (Vacuette, Avusturya) alınan kan örnekleri 3000 devir/dakika (dk)'da 5 dk süre ile santrifüj işlemine tabi tutuldu. İşlem sonrası kan serumları 2 ml'lik steril mikrotüplere aktarıldı. Test işlemine kadar -80 °C'de saklandı. Testte kullanılmadan hemen önce bütün serum örnekleri 56 °C'de 30 dk'da inaktive edildi.

3.2.1.1.2. Lökosit Örneklerinin Hazırlanması

Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere alınan kan örnekleri 2000 devirde 10 dk süreyle santrifüj işlemine tabi tutuldu. Ayrılan lökosit tabakası içerisinde Phosphate-Buffered Saline (PBS) (Biochrom, Almanya) bulunan 2 ml'lik steril tüplere aktarıldı. 2000 devirde 10 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Dipte toplanan lökositler tekrar toplanarak üzerine PBS ilave edilip 2000 devirde 10 dakika 4 °C'de tekrar santrifüj edildi. Bu işlem son bir kez daha tekrar edildi ve dipte kalan lökositler üzerine 1 ml antibiyotikli PBS ilave edildi. Nükleik asit varlığının araştırılması amacıyla son sulandırmadan 250 µl alınarak RNase-DNase içermeyen steril 2 ml'lik tüpler (Axygen, USA)'e aktarıldı. 250 µl örnek üzerine 750 µl total RNA izolasyon ticari solusyonu ilave edilip 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra nükleik asit ekstraksiyonu yapıncaya kadar -80 °C'de stoklandı. Geriye kalan miktar virus izolasyonu amacıyla duyarlı hücre kültürlerine ekilinceye kadar -80 °C'de saklandı.

3.2.1.2. Rektal Sürüntü, Nasal ve Oküler Akıntı Örneklerinin Hazırlanması

Örnekler, içerisinde antibiyotikli PBS bulunan steril ticari sürüntü çubukları kullanılarak toplandı. Karıştırıcı (vorteks) yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra swap çubukları içerisindeki tüm sıvı 2 ml'lik steril mikrotüplere aktarıldı. +4 °C'de 3000 devirde 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant kısmından 250 µl alınarak nükleik asit varlığının araştırılması amacıyla RNase-DNase içermeyen steril 2 ml'lik mikrotüplere aktarıldı. 250 µl örnek üzerine 750 µl total RNA izolasyon ticari solusyonu ilave edilip 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra nükleik asit ekstraksiyonu yapıncaya kadar -80 °C'de stoklandı. Geriye kalan süpernatant, steril 2 ml'lik mikrotüplere aktarıldı ve duyarlı hücre kültürlerine ekilinceye kadar -80 °C'de saklandı.

3.2.1.3. İdrar Örneklerinin Hazırlanması

Alınan idrar örnekleri 3000 devirde 10 dk süreyle santrifüj işlemine tabi tutuldu. Süpernatant kısmından 250 µl alınarak nükleik asit varlığının araştırılması amacıyla RNase-DNase içermeyen steril 2 ml'lik mikrotüplere aktarıldı. 250 µl örnek üzerine 750 µl total RNA izolasyon ticari solusyonu ilave edilip 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra nükleik asit ekstraksiyonu yapıncaya kadar -80 °C'de stoklandı.

Geriye kalan süpernatant, içerisinde antibiyotikli PBS bulunan steril 2 ml'lik mikrotüplere 1/10 oranında olacak şekilde aktarıldı ve duyarlı hücre kültürlerine ekilinceye kadar -80 °C'de saklandı.

3.2.2. Serolojik Çalışmalar

3.2.2.1. İndirekt IgG ELISA Testi

Kan serum örneklerinde, CDV'ye karşı gelişen spesifik IgG varlığı araştırıldı. Bu amaçla ticari indirekt ELISA kiti (Agrolabo, İtalya) kullanıldı. Üretici firmanın prosedürüne göre tüm serum örnekleri 1/100 oranında (5 µl serum, 495 µl sulandırma solüsyonu) sulandırıldı. Ticari kitin kullanıma hazır pozitif ve negatif kontrollerinden 100'er µl uygun mikroplyet gözlerine aktarıldı. Kalan gözlere sulandırılmış serum örneklerinden 100'er µl aktarıldı. 10 dakika oda sıcaklığında inkube edildi ve 4 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında her göze 100'er µl konjugat ilave edildi ve tekrar 10 dakika oda sıcaklığında inkube edildi. Süre sonunda 4 kez yıkanan tüm gözlere 100'er µl substrat ilave edildi ve 5 dk oda sıcaklığında inkube edildi. Son olarak her göze 100'er µl stop solüsyonu ilave edilip mikroplyet okuyucu (Mindray, Çin)'da 450 nm dalga boyuna sahip filtre kullanılarak optik dansiteler belirlendi ve sonuçlar değerlendirildi.

3.2.2.2. İndirekt IgM ELISA Testi

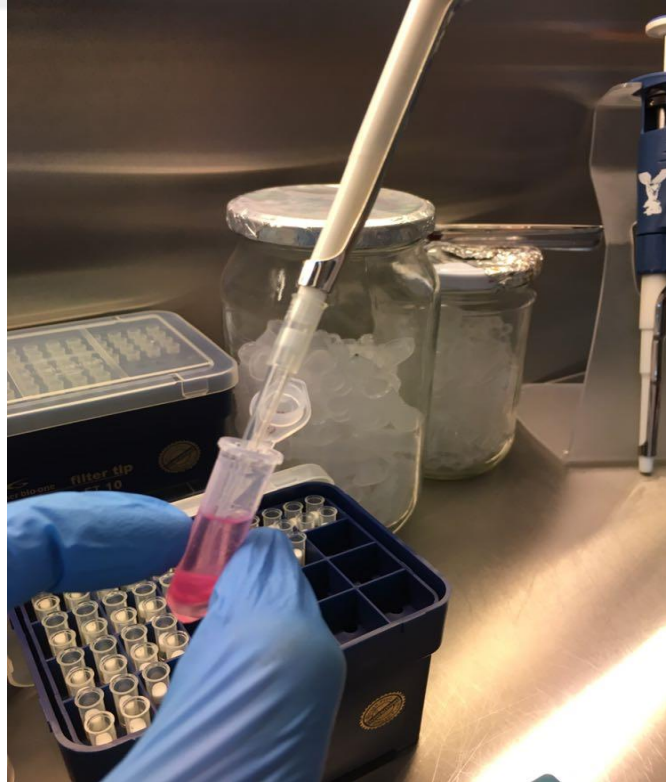
Kan serum örneklerinde, CDV'ye karşı gelişen spesifik IgM varlığı araştırıldı. Bu doğrultuda ticari indirek ELISA kiti (Agrolabo, İtalya) kullanıldı. Üretici firmanın prosedürüne göre tüm serum örnekleri 1/100 oranında (5 µl serum, 495 µl sulandırma solüsyonu) sulandırıldı. Ticari kitin kullanıma hazır pozitif ve negatif kontrollerinden 100'er µl uygun mikroplyet gözlerine aktarıldı. Kalan gözlere sulandırılmış serum örneklerinden 100'er µl aktarıldı. 15 dk 37 °C'de inkube edildikten sonra 4 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Süre sonunda her göze önceden sulandırılmış rekombinant viral antijenden 100'er µl ilave edildi. 15 dk 37 °C'de inkube edilip 4 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında her göze 100'er µl konjugat ilave edildi ve tekrar 15 dk 37 °C'de inkube edildi. Süre sonunda 4 kez yıkanan tüm gözlere 100'er µl substrat ilave edildi ve 5 dk oda sıcaklığında inkube edildi. Son olarak her göze 100'er µl stop

solüsyonu ilave edilip mikroyu okuyucuda 450 nm dalga boyuna sahip filtre kullanılarak optik dansiteler belirlendi ve sonuçlar değerlendirildi.

3.2.3. Moleküler Çalışmalar

3.2.3.1. Total RNA İzolasyonu

Daha önceden RNA izolasyonu için $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de mikrotüpler içinde muhafaza edilmiş olan örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek çözdürüldü ve ticari firmanın protokolüne göre $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 11000 devirde 15 dk süreyle santrifüj edildi. Alt, ara ve üst olmak üzere üç faza ayrılan karışımın renksiz akuöz üst fazı (Şekil 3.2) yeni steril mikrotüplere aktarıldı ve üzerine 0.5 ml isopropil alkol ilave edildi. Karışım 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 11000 devirde 10 dk süreyle santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra dipte kalan pellet üzerine 1 ml %75'lik etanol ilave edilerek 9000 devirde 5 dk süreyle $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi. İşlem sonrası kalan etanol iyice uzaklaştırıldı ve pellet 40 μl dietilpirokarbonat (DEPC)'li saf suda çözdürüldü. 0.2 ml'lik RNase, DNase içermeyen mikrotüplere aktarılan ekstraktlar test için kullanılmak üzere $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.



Şekil 3.2. RNA ekstraksiyonu sırasında ayrılan sıvı ve organik faz görünümü.

3.2.3.2. Primer – Prob Dizileri

N proteinini kodlayan gen bölgesinin mutasyonlar bakımından korunaklı olmasından dolayı Elia ve ark. (28) tarafından yapılan çalışmadan baz alınarak primer ve prob dizileri sentez ettirilmiştir. Sentez ettirilen TaqMan probu 5' ucunda 6-carboxyfluorescein (FAM) ve 3' ucunda 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) ile etiketlenmiştir. TaqMan RT-PCR amplifikasyonu için kullanılan primer ve prob dizileri ve lokasyonları Tablo 3.4'te gösterildi.

Tablo 3.4. CDV Ondesterpoort suşundan referans alınan primer prob dizileri ve lokasyonları.

Primer/Prob	Lokasyon	Sekans 5' – 3'
CDV-F*	905-931	AGCTAGTTTCATCTTAACTATCAAATT
CDV-R*	966-987	TAACTCTCCAGAAAACATCATGC
CDV-Pb*	934-963	FAM- ACCCAAGAGCCGGATACATAGTTTCAATGC- TAMRA

6-carboxyfluorescein (FAM), 6-carboxytetramethylrhodamine(TAMRA).

*Flojenik RT-PCR

3.2.3.3. One-Step Real Time RT-PCR Testi

Bütün One-Step Real Time RT-PCR testleri hazır ticari kit (GeneAll® HyperScript™ One-step RT PCR master mix, Kore) kullanılarak StepOne™ (48-well) cihazında (Applied Biosystems™, ABD) gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi, denatürasyon ve amplifikasyon döngülerinin hepsi StepOne™ Software 2.2.2 sürümü standart mod kullanılarak gerçekleştirilmiştir. GeneAll® HyperScript™ One-step RT PCR master mix kiti içerisinde Hyperscript™ reverse transkriptaz, HS-Taq DNA polimeraz, dNTPs, reaksiyon buffer (2.5 mM MgCl₂), dengeleyici ve RNase inhibitörü bulunmaktadır. Her bir örnek için Tablo 3.5'deki gibi reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 3.5. Onestep Real time RT-PCR testinde kullanılan komponentlerin konsantrasyon ve miktarları.

Komponent	Miktar (µl)
Master mix	10
Forward Primer (20 µM)	1
Revers Primer (20 µM)	1.5

Komponent	Miktar (μ l)
Prob (5 μ M)	1
ROX	0.5
Saf Su	3
Hedef RNA	3
Toplam	20

Her test için ayrı olarak hazırlanan Negatif Kontrol (NTC) reaksiyon tüpleri içerisine 3 μ l nükleaz içermeyen saf su ilave edilmiştir. Pozitif kontrol reaksiyon tüpü içerisine 3 μ l CD Onderstepoort suşu içeren Nobivac® Puppy DP aşısı ekstrektü ilave edilmiştir. One-Step Real Time RT-PCR Testinde uygulanan protokol Tablo 3.6’da gösterildi.

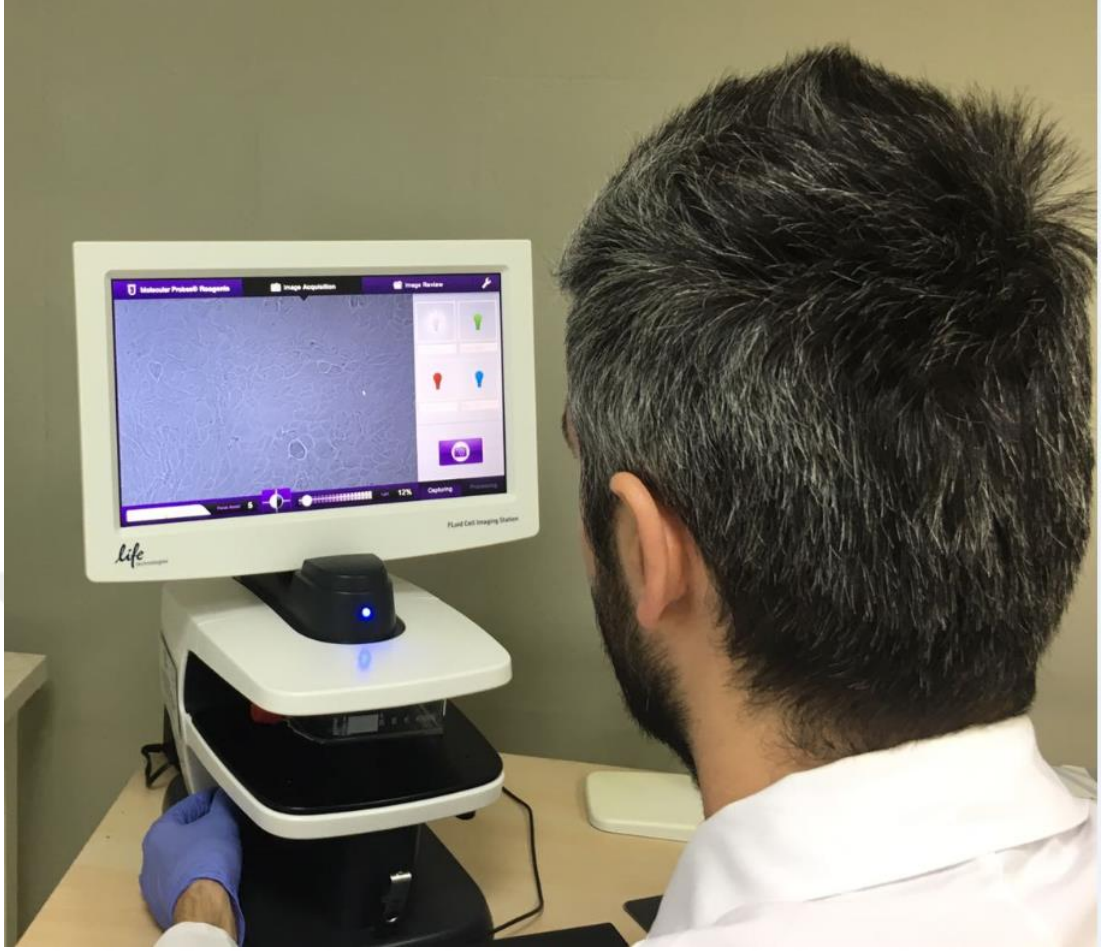
Tablo 3.6. One step Real Time RT-PCR testinde uygulanan protokol.

	cDNA Sentezi		Denatürasyon	Amplifikasyon			Soğutma
Döngü	1	1	1	50			1
Sıcaklık	58 °C	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C	72 °C	40 °C
Süre	5 dk	5 dk	30 sn	5 sn	30 sn	1 sn	30 sn

3.2.4. Virolojik Çalışmalar

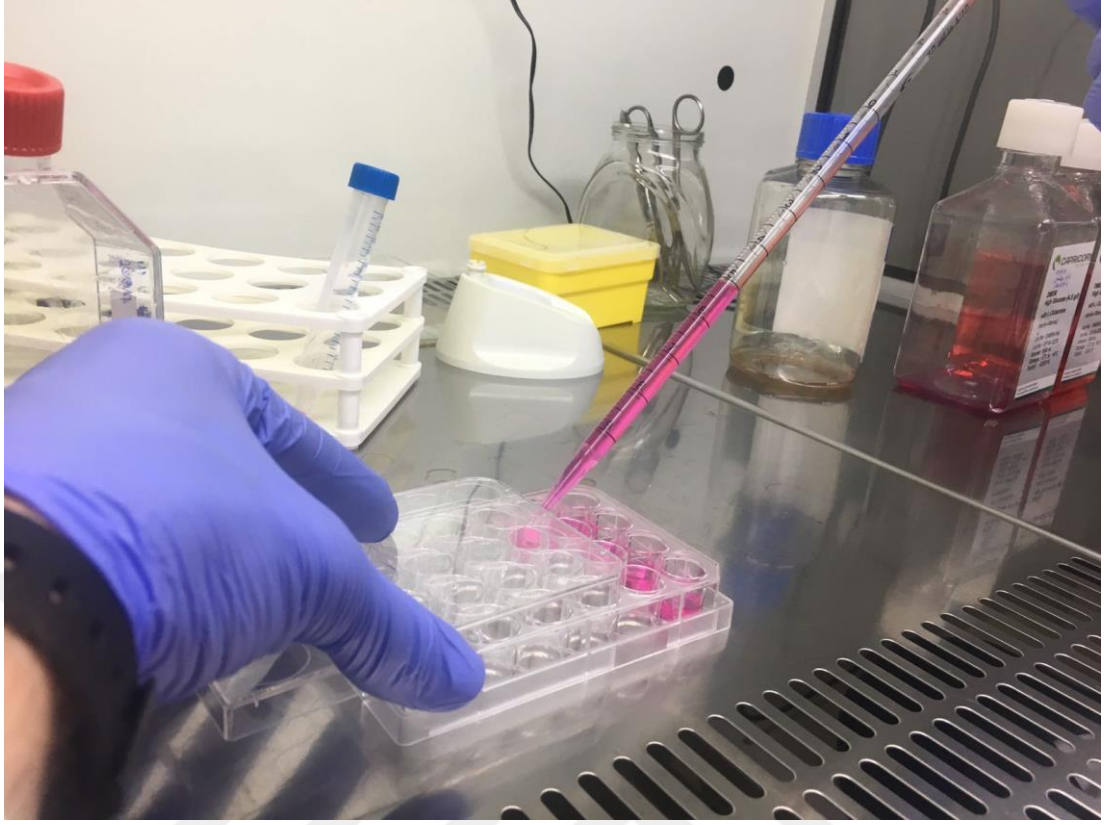
3.2.4.1. Hücre Kültürü

MDCK devamlı hücre kültürleri 25 cm²’lik (50 ml) flask (Corning, ABD) ve 75 cm²’lik (250 ml) flasklarda çoğaltıldı. Hücre üretme vasatı olarak %10 FDS, %10 antibiyotik, %7 antimikotik içeren steril ticari DMEM High Glucose (4.5 g/l), with L-Glutamine kullanıldı. Aynı oranlarda vasat ve FDS kullanarak amaca göre 6 gözlü ve 24 gözlü mikroyetlerde de hücreler çoğaltıldı. Hücreler 37 °C ve %5’lik CO₂ ortam sağlayan etüv (Nuair, ABD)’de inkube edildi. İnkube edilen hücreler her gün doku kültürü mikroskopunda incelendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Fluid Hücre Görüntüleme Sistemi ile MDCK hücre üretimi incelemesi.

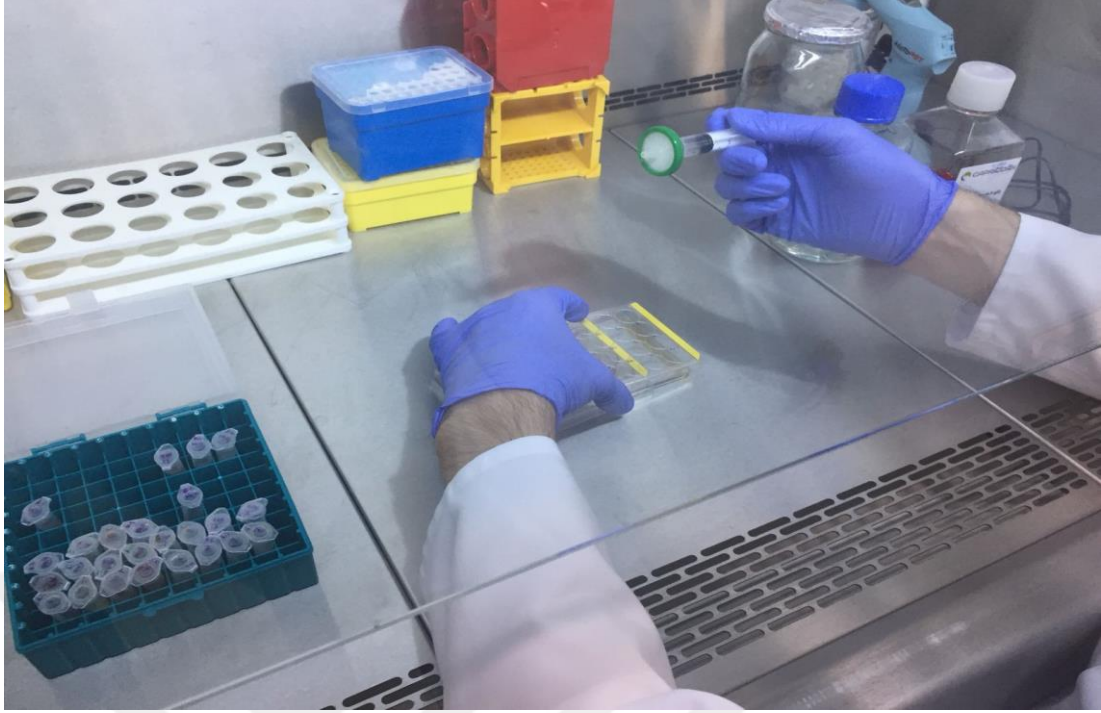
Flask yüzeyini kaplayan hücreler Ca/Mg içermeyen PBS (Biochrom, Almanya) ile bir kez yıkandıktan sonra Dulbecco's Fosfatlı Tampon Solusyonu (DPBS) içerisinde domuz pankreas orijinli tripsin-EDTA (%0.05) (Capricorn, Almanya) yardımıyla yüzeyden kaldırıldı. DMEM ile süspanse edilen hücreler 15 ml'lik santrifüj tüpleri (Corning, ABD)'ne aktarıldı. 1000 devirde 5 dk santrifüj edildi. Dipte toplanan hücre pelleti ihtiyaç oranında sulandırılarak yeni flask ve mikroyeşillere taksim edildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. MDCK Hücre Kültürü pasajlama ve 24 gözlü mikropleytlere aktarma çalışmaları.

3.2.4.2. Virus İzolasyonu

-80 °C’de muhafaza edilen numuneler virus izolasyonu amacıyla 37°C’lik su banyosunda hızlıca çözdürüldü. Tüm örnekler 0.22 mikrometre (μm)’lik steril filtre (Sartorius, Almanya)’lerden geçirilerek inokulum hazırlandı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Örneklerin MDCK ile kaplı 24 gözlü mikropleyt gözlerine inokulasyonu.

Ekim öncesi MDCK ile tam kaplı 24 gözlü mikropleytlerin vasatları döküldü. Her mikropleytle bir adet hücre kontrol gözü ayrıldı. Kalan gözlere hazırlanan inokulumlardan 400'er µl hacimlerde inokule edildi. Mikropleytle 37°C'de %5 CO₂'li etüvede 1 saat inkübe edildikten sonra üzerlerine 2 ml DMEM ilave edilerek tekrar aynı şartlardaki etüve kaldırıldı. Aynı yöntemle tüm örneklere bir kez kör pasaj uygulandı.

3.2.4.3. DIF

CPE varlığı yönünden incelenen mikropleytle - 80°C'de dondurulduktan sonra 37°C'lik sıcak su banyosunda hızla çözdürülüp ekim yapılan her gözün içeriğinin tamamı santrifüj tüplerine aktarıldı. +4 °C'de 3500 devirde 25 dk'lık santrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatantlar porsiyonlanarak steril tüplere aktarıldı. CPE gözlenen olgulardan lökosit, idrar, rektal sürüntü, nasal ve oküler akıntı her birinden 5'er tane rastgele belirlenerek toplamda 25 örnekte DIF uygulandı (Tablo 3.4). Önceden hazırlanmış ve her gözünde 24 mm çapında lamel olan MDCK ile kaplı 6 gözlü mikropleytlelerin vasatları ekim öncesi döküldü. Her bir pleytle bir adet hücre kontrol gözü ayrılarak kalan gözlere en son belirlenen inokulumlardan 250'şer µl

ekildi. 37 °C'lik %5 CO₂'li etüvde 1 saat inkube edildikten sonra üzerilerine 4 ml DMEM ilave edilerek tekrar aynı şartlardaki etüvde 5 gün süreyle inkubasyona bırakıldı. İnkubasyondan sonra mikroyet gözlerindeki vasatlar döküldü. Lameller pens yardımıyla alınarak kurutulmadan 1 kez PBS ile yıkandıktan sonra saf asetonda 20 dk süreyle oda sıcaklığında sabitlendi. Süre sonunda fikze olan lameller boyama öncesi 37 °C'lik etüvde 10 dk süreyle kurutuldu. Sonrasında her bir lamel virus üremesinin ortaya konması için floresan boya (Fluorescein isothiocyanate) ile işaretli anti-CDV poliklonal antiserum konjugat (VMRD, ABD) ile boyanarak 37°C'lik nemli etüvde 30 dk inkube edildi. Süre sonunda lameller 10 dk PBS içerisinde bekletildi. Kenarları ve altı kurutulan lameller doku kültürü mikroskopunda antijen varlığı yönünden değerlendirildi.

3.2.5. İstatistiki Analiz

Araştırmanın tüm sonuçları *Ki kare* (X^2) ve *Pearson korelasyon* (r) testleri kullanılarak hesaplandı (IBM SPSS 23). $p < 0.01$ değeri baz alınarak istatistiki açıdan önemli olan sonuçlar değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. İndirekt ELISA Test Sonuçları

Çalışmada 50 adet hayvandan elde edilen serum örneklerinde CDV indirekt ELISA testiyle IgG yönünden 47 (%94) adet, IgM yönünden 29 adet (%58) pozitiflik tespit edildi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. İndirekt ELISA testiyle pozitif tespit edilen olgu sayıları ve yüzdeleri.

Test	Adet	Yüzde (%)
IgM	29	58
IgG	47	94

Çalışmada sadece 2 (%4) olguda tek başına IgM ve sadece 20 (%40) olguda tek başına IgG tespit edildi. 1 (%2) olguda da ne IgG ne de IgM seropozitifliği belirlenmedi. Buna göre elde edilen sonuçlarımız Richmann ve ark. (80)'ın bildirmiş olduğu enfeksiyon değerlendirme tablosuna göre sınıflandırılmıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. CDV'ye özgü IgG ve IgM antikor varlığının değerlendirilmesi.

CDV İndirekt ELISA		Adet (N)	Yüzde (%)	Enfeksiyon Değerlendirmesi
IgG	IgM			
(-)	(+)	2	4	Akut Dönem
(+)	(+)	27	54	Erken Konvalesan Dönem
(+)	(-)	20	40	Geç Konvalesan Dönem*
(-)	(-)	1	2	Enfeksiyon yok

*Mevcut veya daha önceden geçirilmiş enfeksiyon

4.2. One Step Real Time RT-PCR Sonuçları

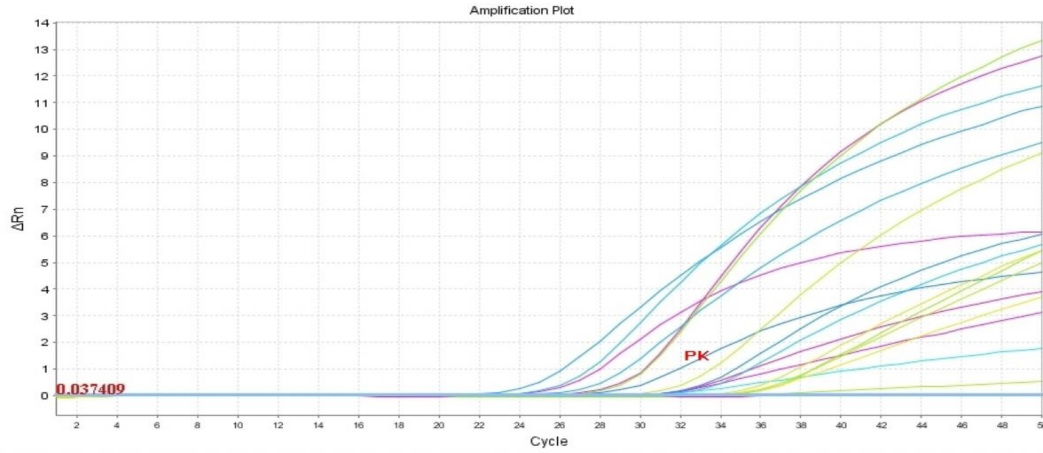
Çalışmada kullanılan 50 adet hayvandan temin edilen 250 örnekte One Step Real Time RT-PCR tekniğiyle yapılan araştırmada 105 adet örnekte viral nükleik asit saptanmıştır. CDV pozitif olgulara ait klinik örneklerin viral nükleik asit varlığı yönünden pozitiflik oranları karşılaştırıldı. 50 olguya ait 20 adet (%40) lökosit, 23 adet (%46) nasal sürüntü, 22 adet (%44) oküler sürüntü, 27 adet (%54) rektal sürüntü ve 13 adet (%26) idrar örneğinde viral nükleik asit saptandı (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. CDV pozitif olgulara ait örneklerin viral nükleik asit yönünden pozitiflik negatiflik oranları.

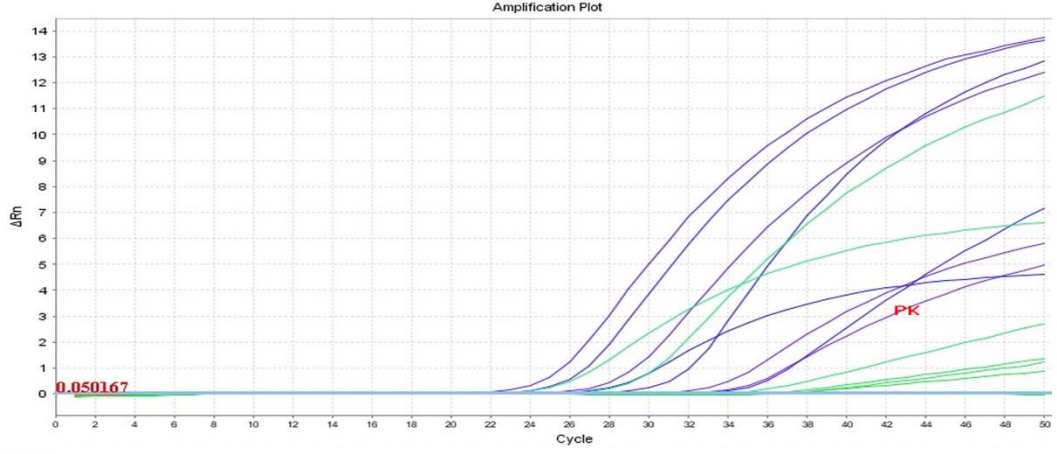
Örnekler	Lökosit		NS		OS		RS		İdrar		Toplam	
	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
Adet	20	30	23	27	22	28	27	23	13	37	105	145
%	40	60	46	54	44	56	54	46	26	74	42	58

P: Pozitif, N: Negatif, NS: Nasal Akıntı, OS: Oküler Akıntı, RS: Rektal Sürüntü

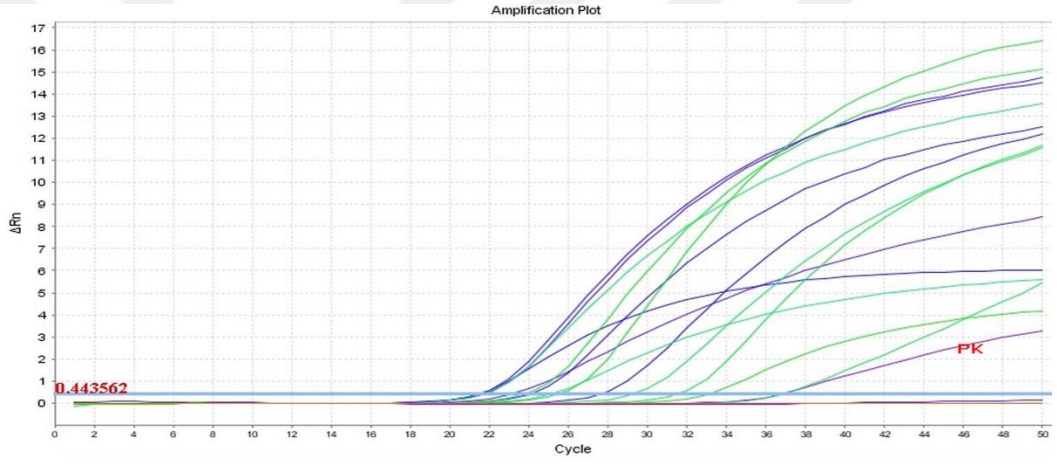
50 olguya ait örneklerin One Step Real Time RT-PCR analiz sonuç grafikleri Şekil 4.1.-4.17.'de gösterildi.



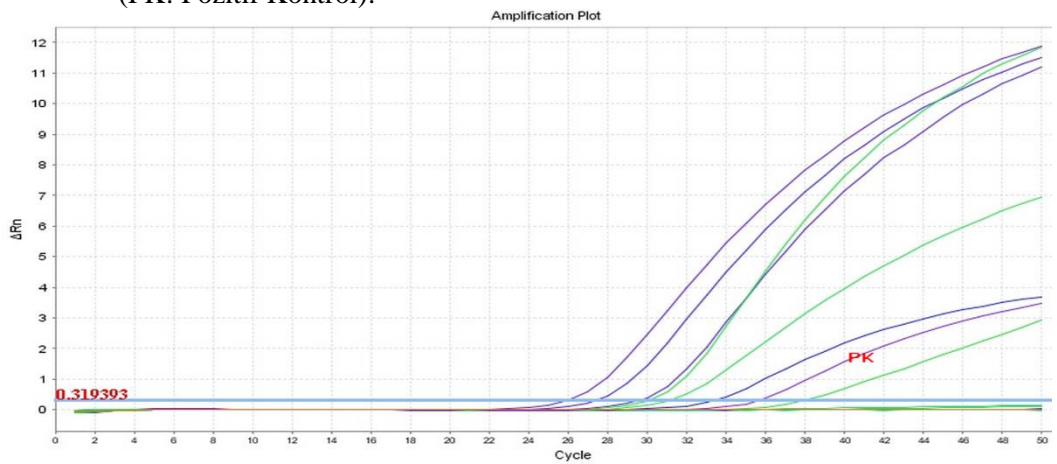
Şekil 4.1. Olgu 1-2-3-4'e ait One Step Real Time RT-PCR sonuçları (PK: Pozitif Kontrol).



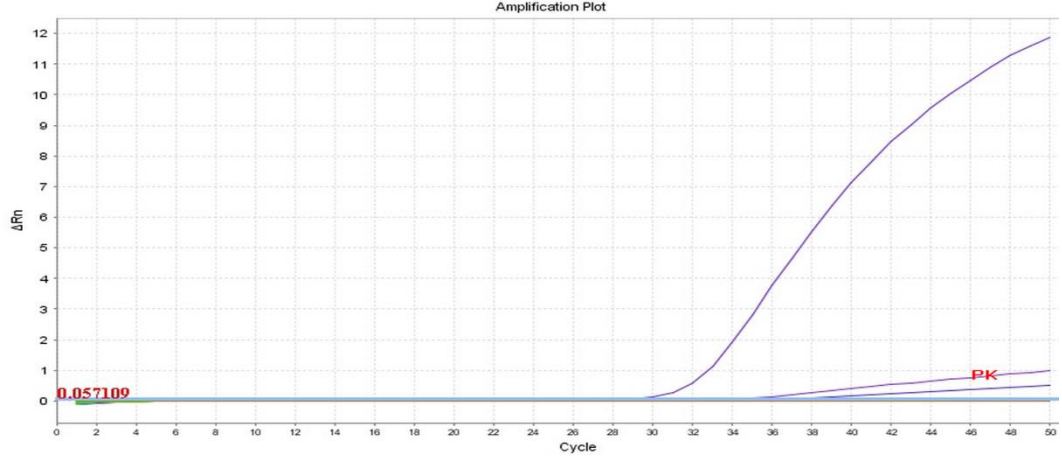
Şekil 4.2. Olgu 5-6-7'e ait One Step Real Time RT-PCR sonuçları (PK: Pozitif Kontrol).



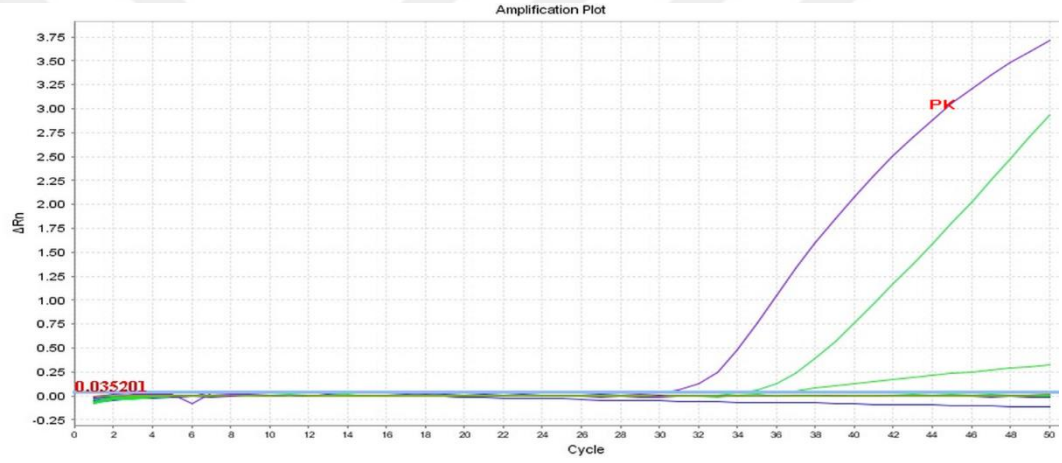
Şekil 4.3. Olgu 8-9-10'a ait One Step Real Time RT-PCR sonuçları (PK: Pozitif Kontrol).



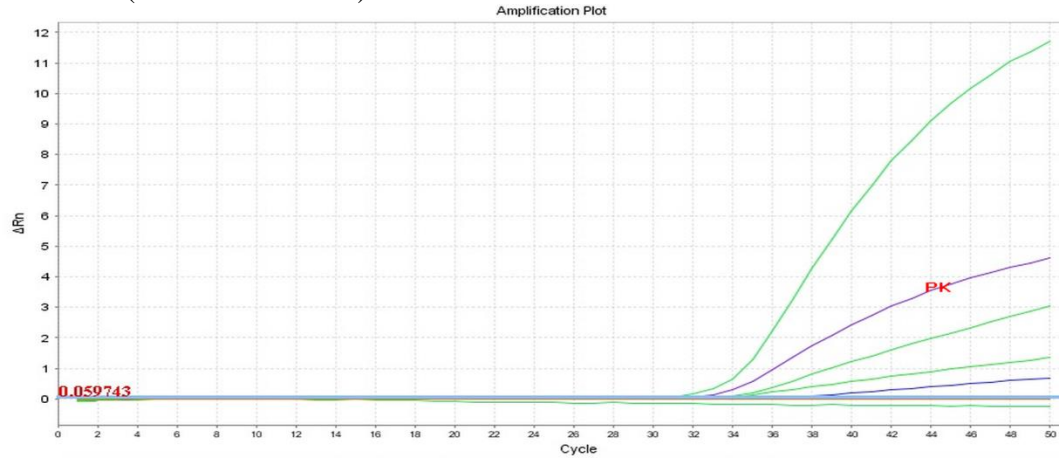
Şekil 4.4. Olgu 11-12-13'e ait One Step Real Time RT-PCR sonuçları (PK: Pozitif Kontrol).



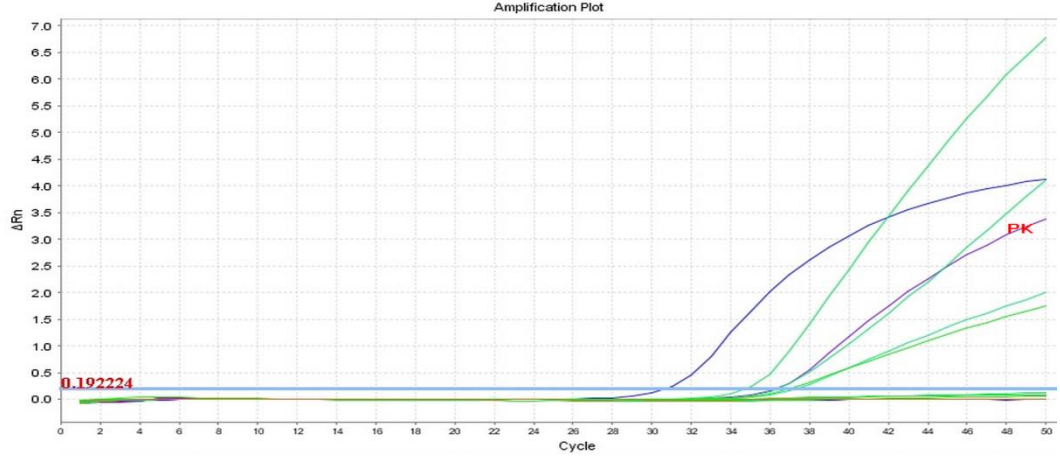
Şekil 4.5. Olgu 14-15-16'ya ait One Step Real Time RT-PCR sonuçları (PK:Pozitif Kontrol).



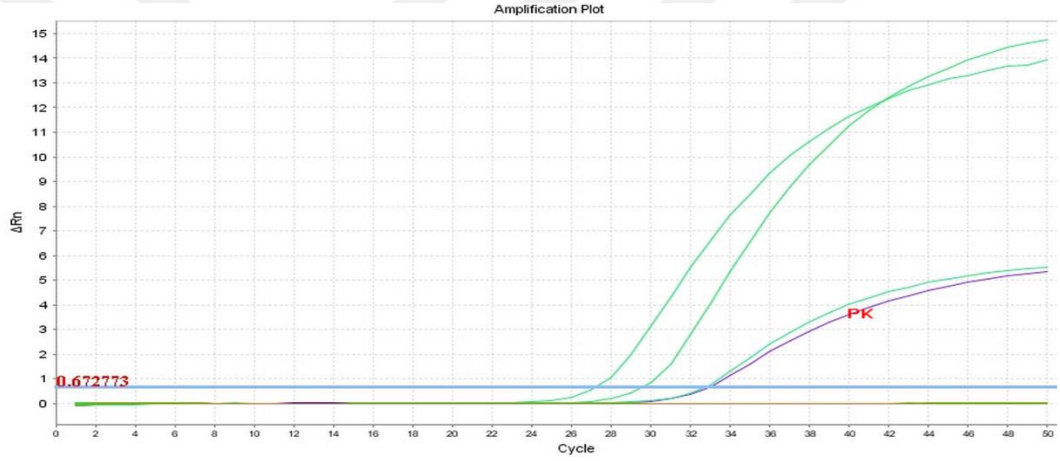
Şekil 4.6. Olgu 17-18-19'a ait One Step Real Time RT-PCR sonuçları (PK:Pozitif Kontrol).



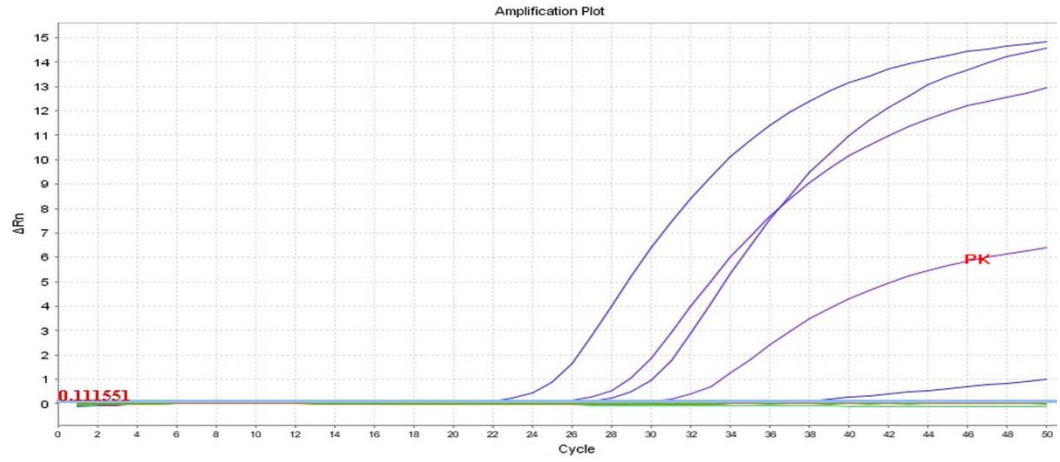
Şekil 4.7. Olgu 20-21-22'ye ait One Step Real Time RT-PCR sonuçları (PK:Pozitif Kontrol).



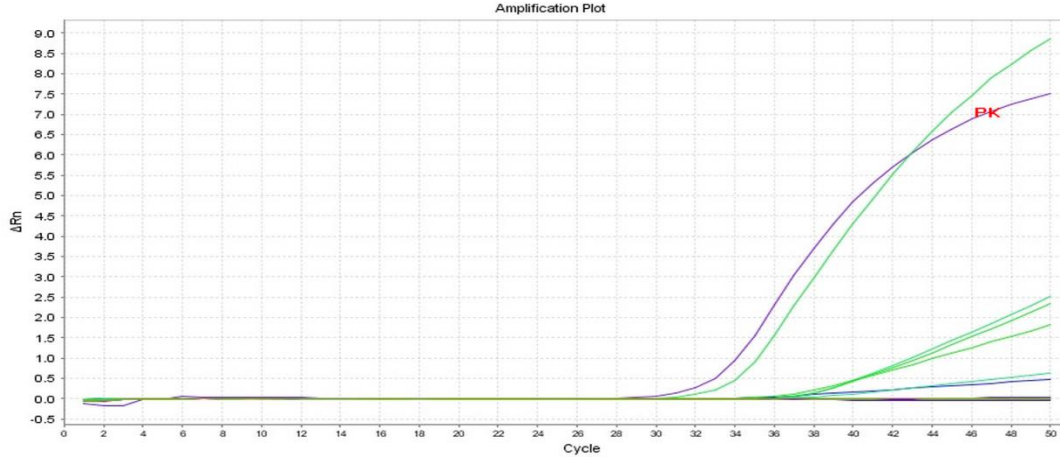
Şekil 4.8. Olgu 23-24-25'e ait One Step Real Time RT-PCR sonuçları (PK: Pozitif Kontrol).



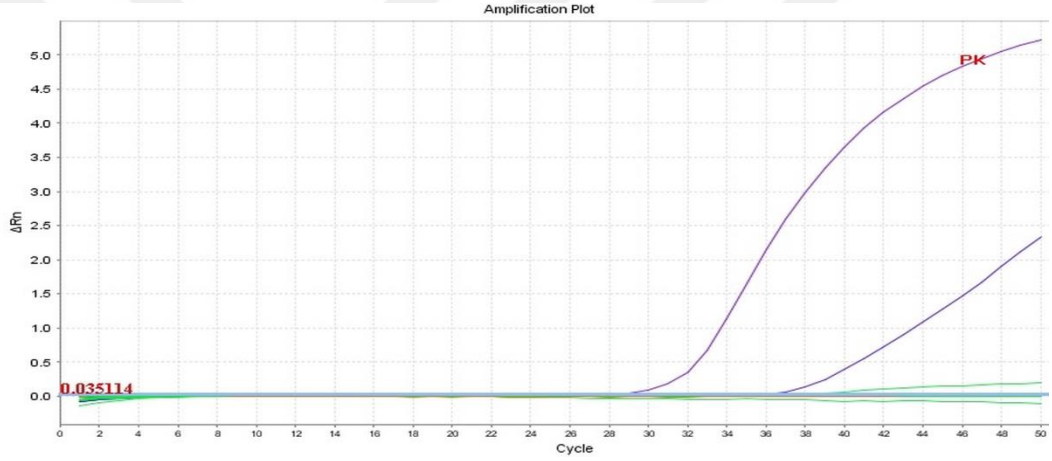
Şekil 4.9. Olgu 26-27-28'e ait One Step Real Time RT-PCR sonuçları (PK: Pozitif Kontrol).



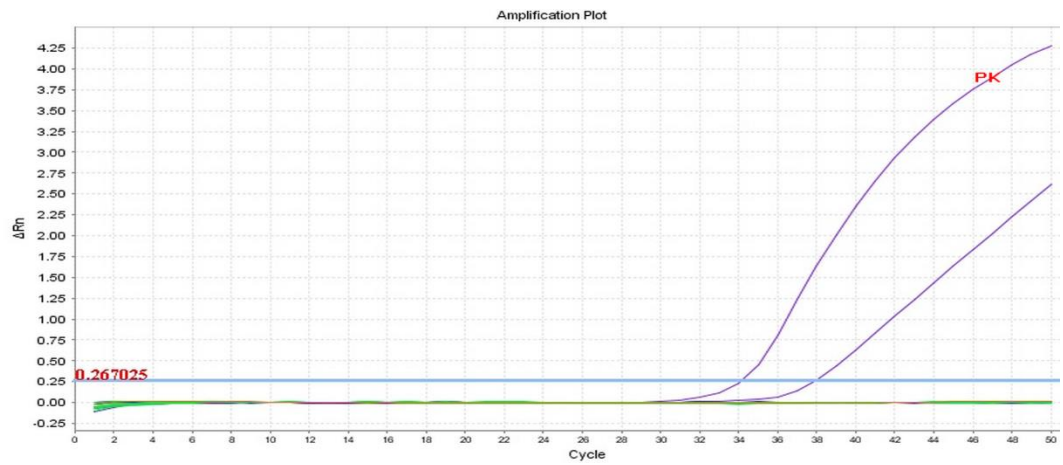
Şekil 4.10. Olgu 29-30-3'e ait One Step Real Time RT-PCR sonuçları (PK: Pozitif Kontrol).



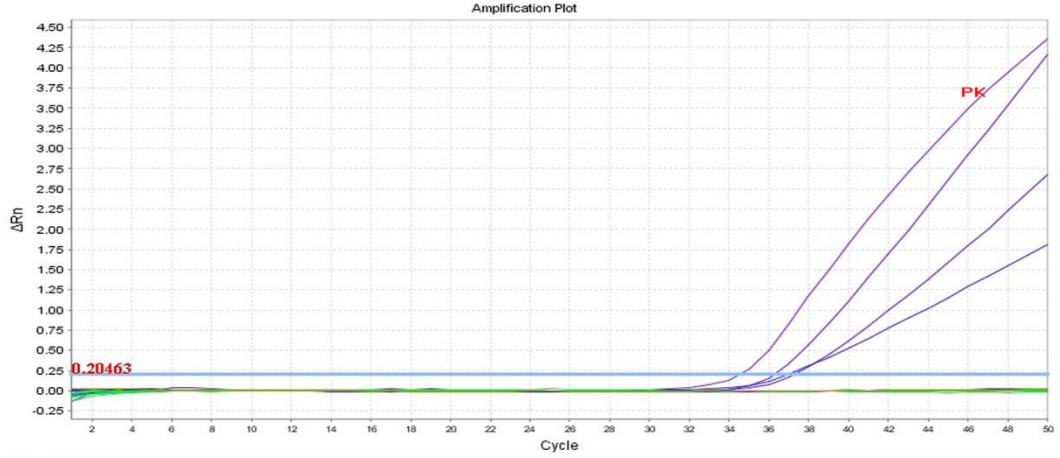
Şekil 4.11. Olgu 32-33-34'e ait One Step Real Time RT-PCR sonuçları (PK: Pozitif Kontrol).



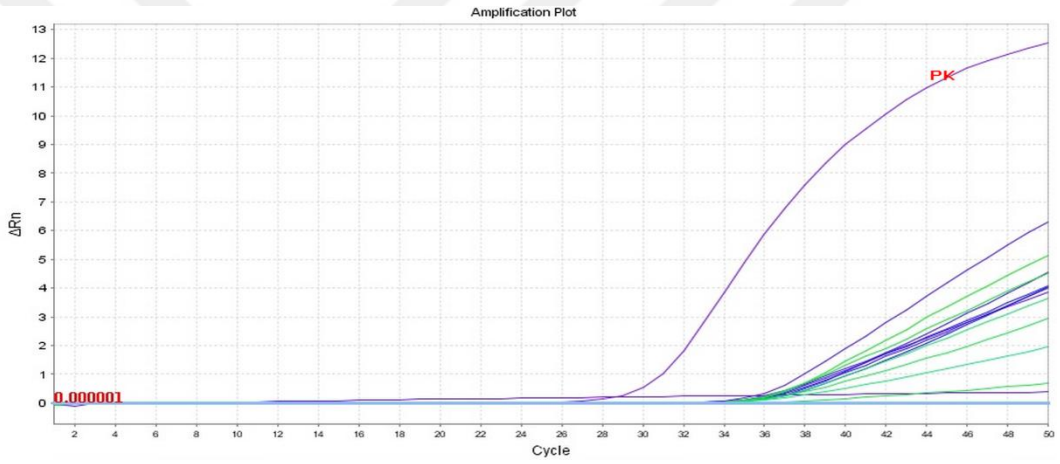
Şekil 4.12. Olgu 35-36-37'ye ait One Step Real Time RT-PCR sonuçları (PK: Pozitif Kontrol).



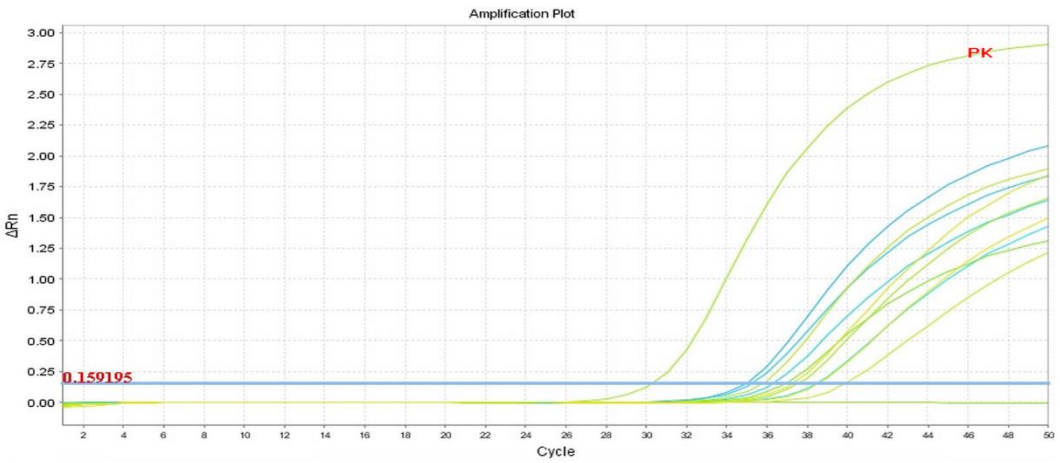
Şekil 4.13. Olgu 38-39-40'a ait One Step Real Time RT-PCR sonuçları (PK: Pozitif Kontrol).



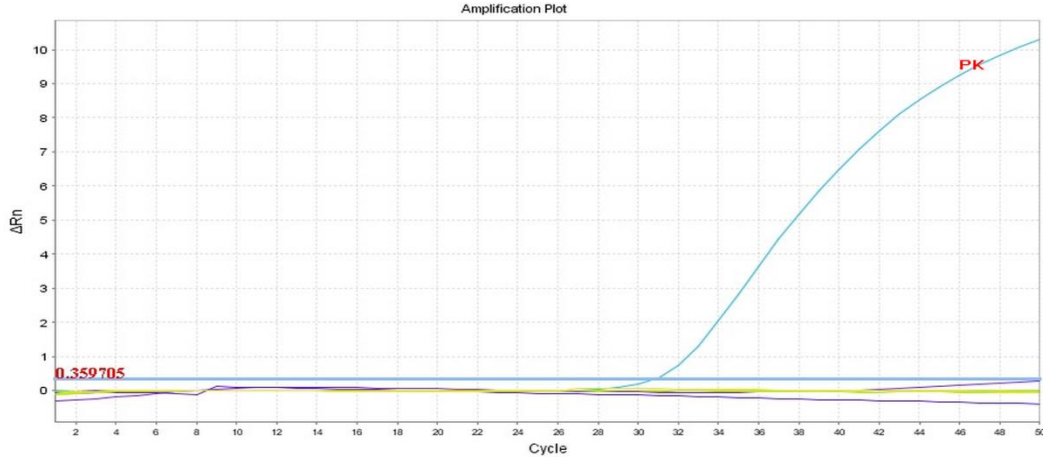
Şekil 4.14. Olgu 41-42-43'e ait One Step Real Time RT-PCR sonuçları (PK: Pozitif Kontrol).



Şekil 4.15. Olgu 44-45-46'ya ait One Step Real Time RT-PCR sonuçları (PK: Pozitif Kontrol).



Şekil 4.16. Olgu 47-48'e ait One Step Real Time RT-PCR sonuçları (PK: Pozitif Kontrol).



Şekil 4.17. Olgu 49-50'ye ait One Step Real Time RT-PCR sonuçları (PK: Pozitif Kontrol).

4.3. Hücre Kültürü İnokulasyon Sonuçları

Araştırmada kullanılan lökosit, nasal sürüntü, oküler sürüntü, rektal sürüntü ve idrar olmak üzere toplamda 250 adet örnek virus izolasyonu amacıyla MDCK hücre kültürlerine ekildi. Ekimi yapılan örneklerin CPE sonuçları olgu numaralarıyla birlikte Tablo 4.4'te gösterildi.

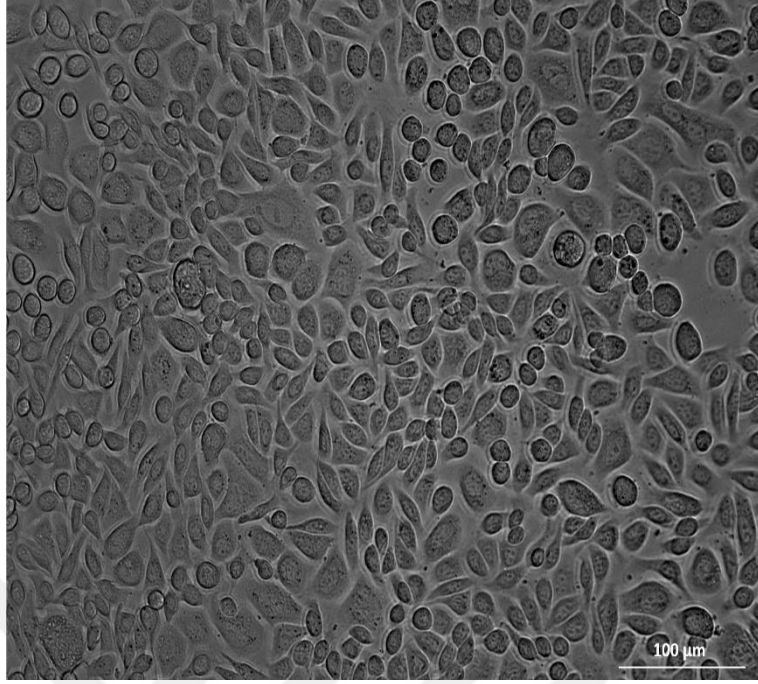
Tablo 4.4. MDCK Hücre Kültürlerine ekimi yapılan pozitif örneklerin cpe sonuçları.

Olgu No	Lökosit	NS	OS	RS	İdrar
1	+*	++	++	+++	+++
2	+	+*	X	+++	X
3	+	+	+*	+++	+++
4	+	+	+	+++*	+++
5	X	+	X	++	++*
6	+	++	++	+++	+++*
7	+	++	++	+++	+++*
8	++	+	+	+++	++
9	+	+++	+	+++	+++
10	+*	+	+	+++	X
11	X	+	+	++	X
12	X	X	X	+++*	X
13	X	+	+*	++	X
14	X	X	X	X	+
15	X	X	X	X	X
16	X	+++*	X	+++	X
17	+	X	X	+++	X
18	X	X	X	X	X
19	X	X	X	X	+

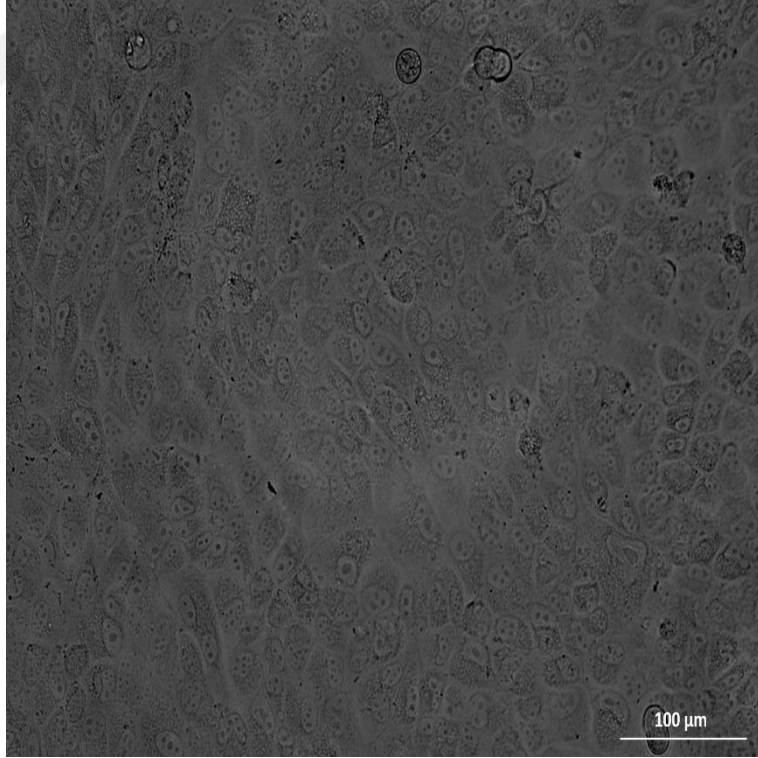
Olgu No	Lökosit	NS	OS	RS	İdrar
20	X	+	+	+++*	X
21	X	X	X	++	X
22	X	X	X	X	X
23	+*	X	X	X	X
24	+	++*	++*	+++	X
25	X	X	X	X	X
26	X	X	X	X	X
27	+++	++	+	X	X
28	X	X	X	+	++
29	X	X	X	++	+
30	X	X	X	X	+++*
31	+	+	+++	+++*	X
32	+	+*	X	+++	X
33	+*	X	+++	+++	X
34	X	X	X	X	X
35	X	X	X	X	X
36	X	X	X	X	+
37	X	X	+++*	X	X
38	X	X	X	X	X
39	X	X	X	+	+
40	X	X	X	X	+
41	X	X	X	X	X
42	X	X	X	+	+
43	+	X	++	++	X
44	X	++	+*	+++	+++
45	X	++	+	+++	+++*
46	++*	++	+	+	X
47	+	+	+	+++*	+++
48	+	++*	+	+++	+++
49	X	X	X	X	X
50	X	X	X	X	X

+ : Düşük CPE Pozitif, X : CPE Negatif
++ : Orta CPE Pozitif, +++ : İleri Seviye CPE Pozitif
*DIF uygulanan örnekler

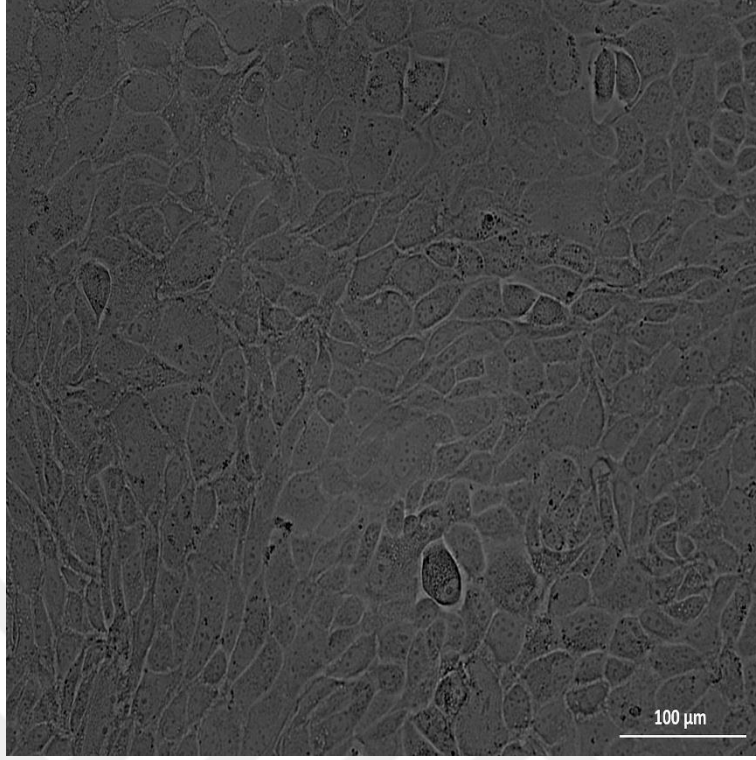
Hücre kültürü ekim sonuçlarına göre ekimi yapılan lökosit örneklerinin 20 (%40) adeti, nasal sürüntü örneklerinin 23 (%46) adeti, oküler sürüntü örneklerinin 22 (%44) adeti, rektal sürüntü örneklerinin 31 (%62) adeti, ve idrar örneklerinin 21 (%42) adetinde olmak üzere toplamda 117 (%46.80) adet örnekte CPE tespit edildi. MDCK devamlı hücre hatlarında saptanan hücre kontrol ve CPE görünütüleri sırasıyla Şekil 4.18-21 ve Şekil 4.22-24'te gösterildi.



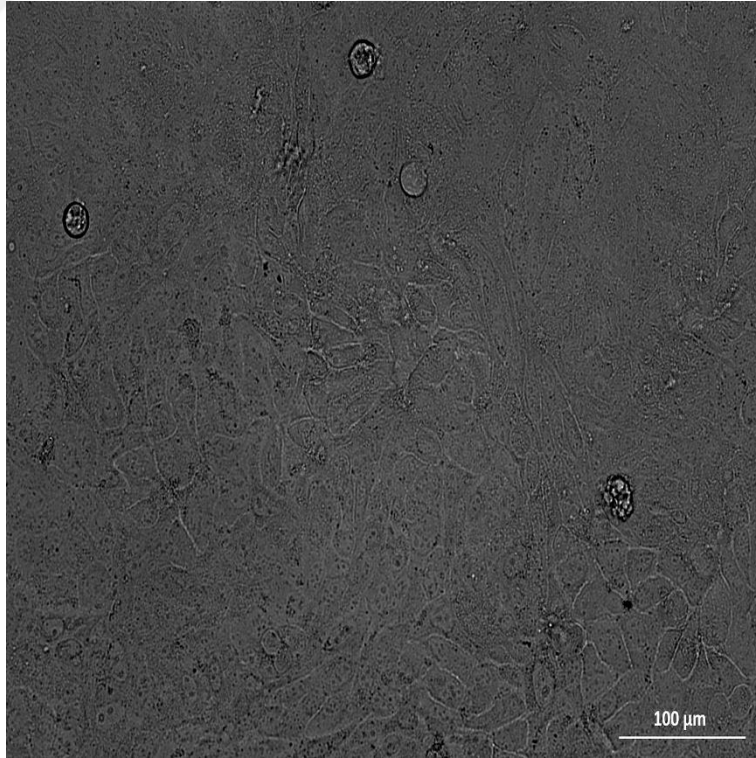
Şekil 4.18. MDCK Hücre Kontrol. (24 saat sonraki görüntü).



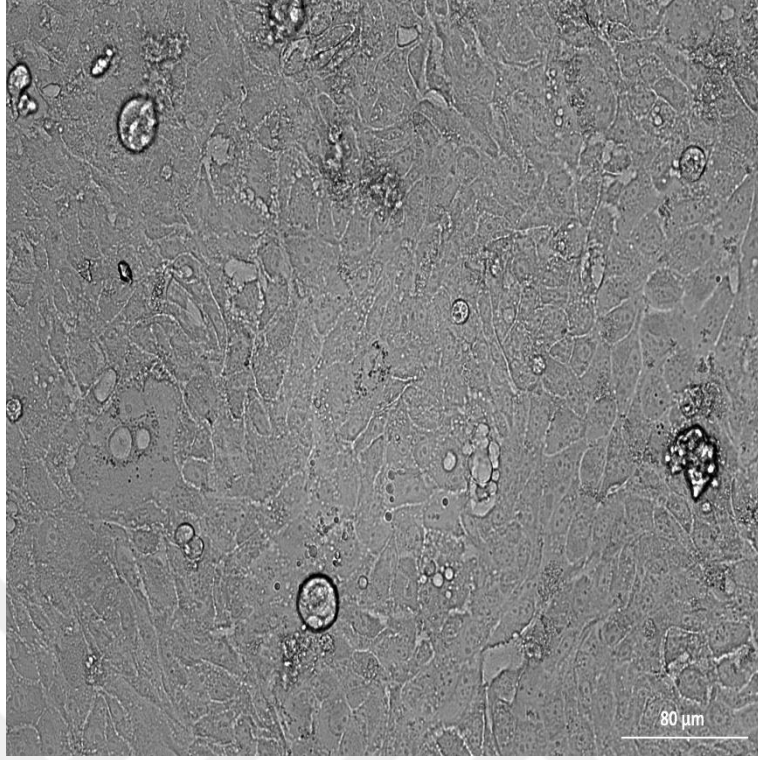
Şekil 4.19. MDCK Hücre Kontrol. (48 saat sonraki görüntü).



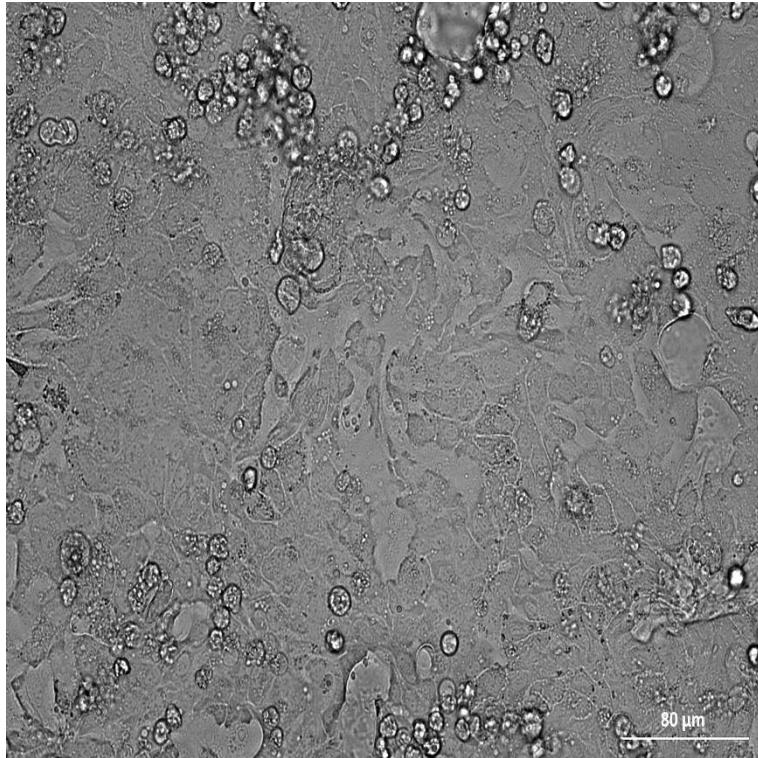
Şekil 4.20. MDCK Hücre Kontrol. (96 saat sonraki görüntü).



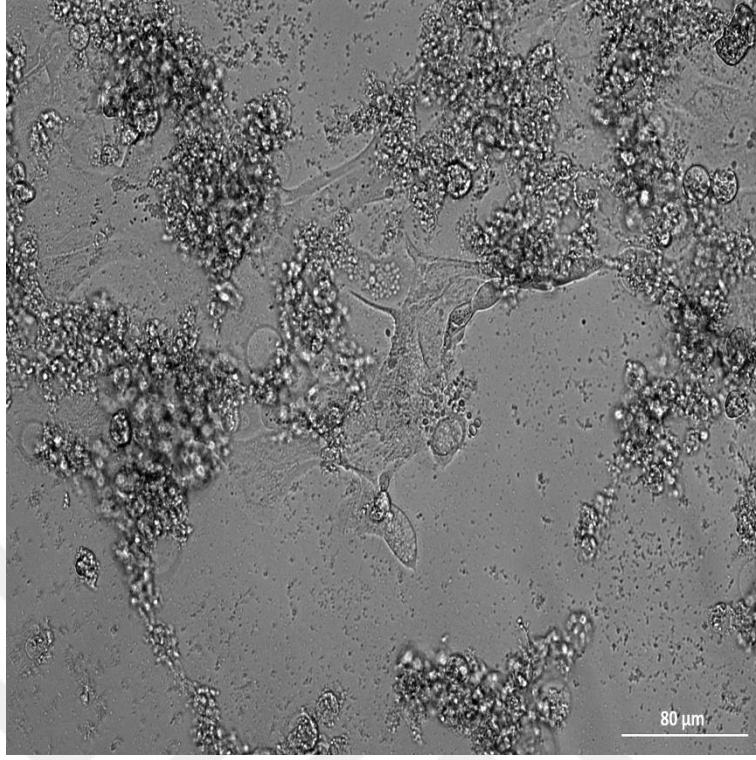
Şekil 4.21. MDCK Hücre Kontrol. (144 saat sonraki görüntü).



Şekil 4.22. Ekimden 48saat sonra CPE görüntüsü.
(İzolat 24RS 2. Pasaj).



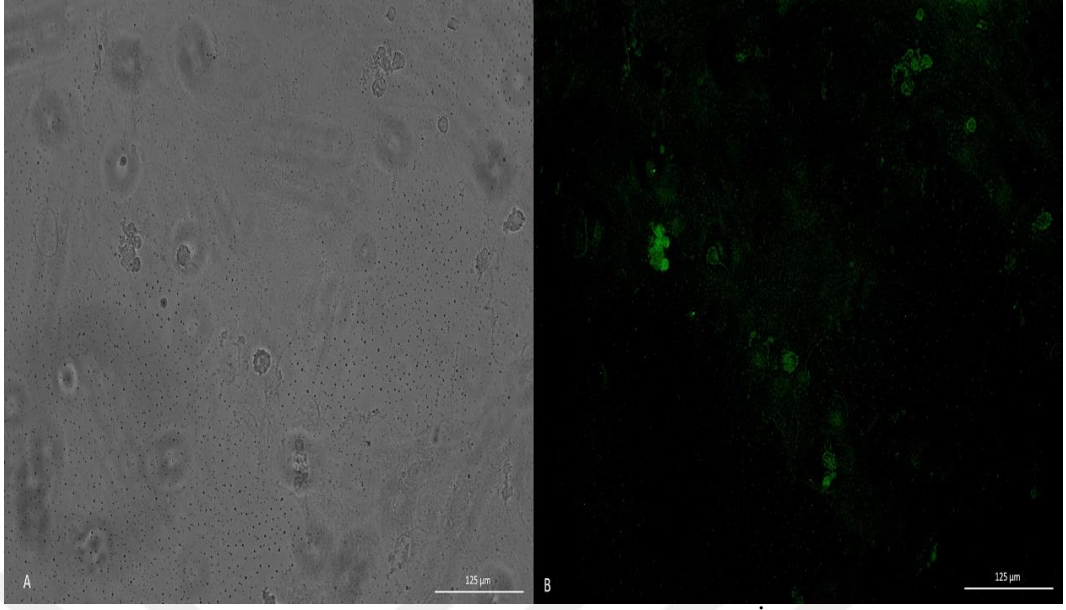
Şekil 4.23. Ekimden 96 saat sonra CPE görüntüsü.
(İzolat 24RS 2. Pasaj).



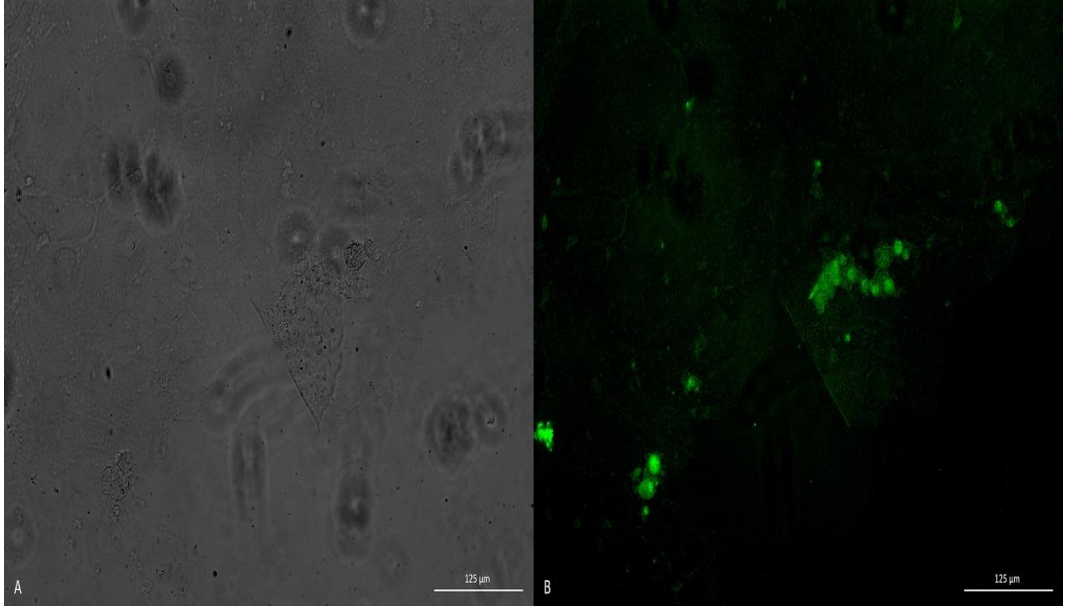
Şekil 4.24. Ekimden 144 saat sonra CPE görüntüsü.
(İzolat 24RS 2. Pasaj).

4.4. DIF Boyama Sonuçları

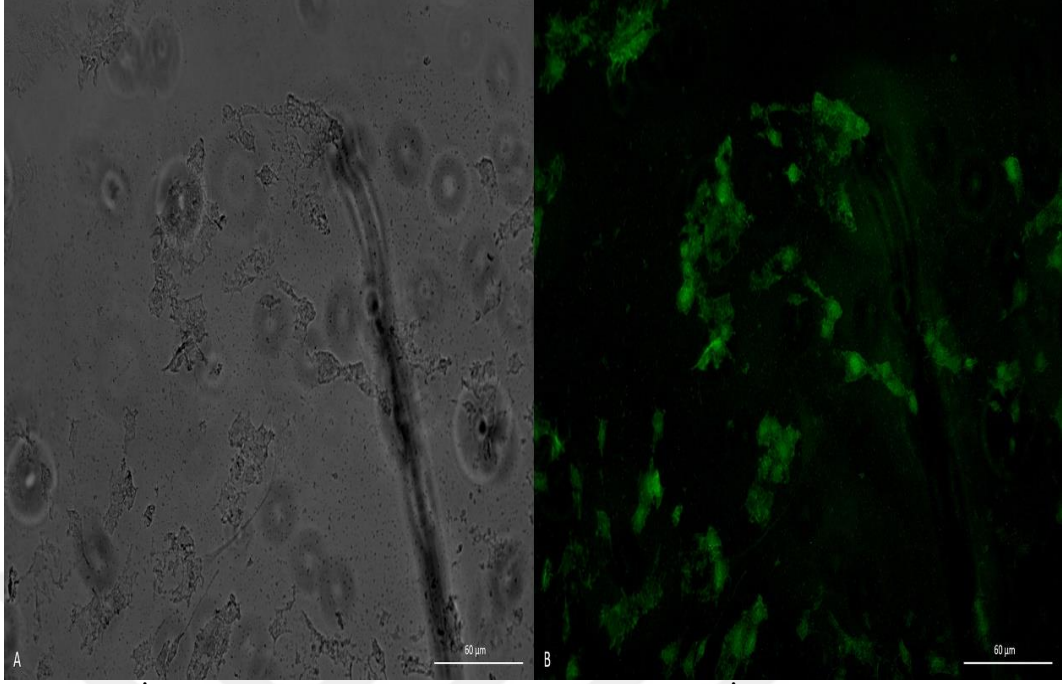
MDCK hücre kültürlerine ekimi yapılan ve CPE gözlenen örneklerin 25 adetinde DIF ile doğrulama testi yapıldı. Buna göre tüm örneklerde CDV antijen pozitiflik tespit edildi (Tablo 4.4). CPE gözlenen olgulardan seçilen örneklerin MDCK hücre kültürlerine yapılan ikinci pasajları sonrası elde edilen DIF görüntüleri Şekil 4.25-27’de gösterildi.



Şekil 4.25. Düşük Seviye CPE Pozitif (A). DIF görüntüsü (B). (İzolat 40i, 2.pasaj 6.Gün).

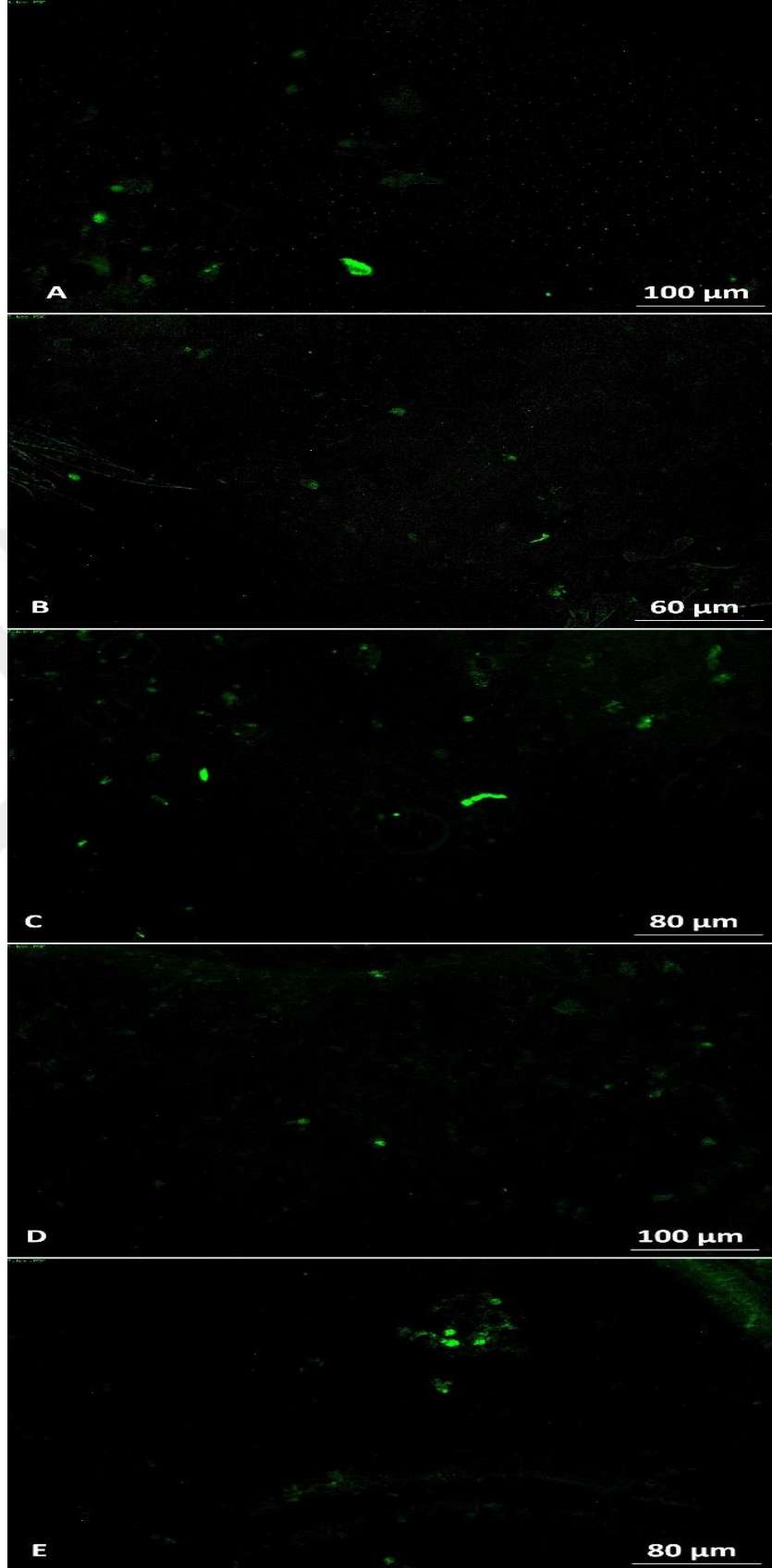


Şekil 4.26. Orta Seviye CPE Pozitif (A). DIF görüntüsü (B). (İzolat 37OS, 2.pasaj 6.Gün).



Şekil 4.27. İleri Seviye CPE Pozitif (A). DIF görüntüsü (B). (İzolat 10RS 2.pasaj 6.Gün).

İleri(+++), orta(++) ve düşük(+) seviye CPE meydana getiren örnek sayıları sırasıyla 37 (%14.8), 31 (%12.4) ve 50 (%20) olmak üzere toplamda 118 (%47.2) CPE meydana getiren örnek tespit edildi. İleri seviye(+++) CPE oluşturan örneklerden 21 (%56.7) adet rektal sürüntü, 11 (%29.7) adet idrar, 3 (%8.1) adet oküler sürüntü, 1 (%2.7)'er adet nasal akıntı ve lökosit örneklerinden meydana geldiği belirlendi. Orta seviye(++) CPE oluşturan örneklerden 10 (%38.4) adet nasal sürüntü, 6 (%23) adet rektal sürüntü, 5 (%19.2) adet oküler sürüntü, 3 (%11.5) adet idrar ve 2 (%7.6) adet lökosit örneklerinden meydana geldiği belirlendi. Düşük seviye(+) CPE oluşturan örneklerden 17 (%34) adet lökosit, 14 (%28) adet oküler sürüntü, 12 (%24) adet nasal sürüntü, 7 (%14) adet idrar ve 4 (%8) adet rektal sürüntü örneklerinden meydana geldiği belirlendi.



Şekil 4.28. 2.pasaj sonrası DIF pozitif bulunan örnekler
1L(A), 2NS(B), 3OS(C), 4RS(D), 5İ(E).

4.5. İstatistikî Sonuçlar

Çalışmada kullanılan çeşitli yaş ve cinsiyetteki köpeklerin ELISA, One Step Real Time RT-PCR ve Hücre Kültürü sonuçları Tablo 4.5'te verildi.

Tablo 4.5. Çalışmada kullanılan çeşitli yaş ve cinsiyetteki köpeklerin ELISA, One Step Real Time RT-PCR ve Hücre Kültürü sonuçları.

No	Yaş(AY)	Cinsiyet	IgG	IgM	Real Time RT-PCR					CPE
					L	NS	OS	RS	i	
1	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	2	+	+	+	+	+	-	+	-	+
3	1.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	1.5	-	+	+	+	+	+	+	+	+
5	1	+	+	-	+	-	+	+	+	+
6	1.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	2	-	+	+	+	+	+	+	+	+
9	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	3	+	+	+	+	+	+	-	-	+
11	9	+	+	-	+	+	+	-	-	+
12	4	+	+	-	-	-	+	-	-	+
13	8	+	+	-	+	+	+	-	-	+
14	1	+	+	-	-	-	-	-	-	+
15	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	5	+	-	-	+	-	+	-	-	+
17	7	+	+	+	-	-	+	-	-	+
18	10	+	-	-	-	-	-	-	-	-
19	3.5	+	-	-	-	-	-	-	-	+
20	10	+	+	-	+	+	+	-	-	+
21	4	+	+	-	-	-	+	-	-	+
22	7	+	-	-	-	-	-	-	-	-
23	11	+	+	+	-	-	-	-	-	+
24	1	+	+	+	+	+	+	-	-	+
25	6	+	-	-	-	-	-	-	-	-
26	3	+	-	-	-	-	-	-	-	-
27	8	+	+	+	+	+	-	-	-	+
28	5	+	+	-	-	-	-	-	-	+
29	4	+	+	-	-	-	-	-	-	+
30	4	+	+	-	-	-	-	-	-	+
31	2	+	-	+	+	+	+	-	-	+
32	1	+	-	+	+	-	+	-	-	+
33	2	+	-	+	-	+	+	-	-	+
34	8	+	-	-	-	-	-	-	-	-

No	Yaş(Ay)	Cinsiyet	IgG	IgM	Real Time RT-PCR					CPE
					L	NS	OS	RS	İ	
35	2.5	+O	+	-	-	-	-	-	-	-
36	5	O3	+	+	-	-	-	-	-	+
37	9	+O	+	+	-	-	+	-	-	+
38	12	O3	+	-	-	-	-	-	-	-
39	12	+O	+	+	-	-	-	-	-	+
40	11	O3	+	+	-	-	-	-	+	+
41	7	+O	+	-	-	-	-	-	-	-
42	11	+O	+	+	-	-	-	-	-	+
43	6	O3	+	-	+	-	+	+	-	+
44	1.5	+O	+	-	-	+	+	+	+	+
45	10	+O	+	-	-	+	+	+	+	+
46	9	+O	+	-	+	+	+	+	-	+
47	4	+O	+	+	+	+	+	+	+	+
48	3	O3	+	-	+	+	+	+	+	+
49	3	O3	+	-	-	-	-	-	-	-
50	3	+O	+	-	-	-	-	-	-	-

Enfeksiyonun 4 farklı yaş grubunda uygulanan testlere göre dağılımı Tablo 4.6.-4.9’da verildi.

Tablo 4.6. IgM varlığının yaş gruplarına göre dağılımı.

Yaş Grubu (Aylık)	IgM		Total
	(+)	(-)	
0 – 3	11 (%22)	11 (%22)	22 (%44)
4 – 6	8 (% 16)	3 (%6)	11 (%22)
7 – 9	5 (% 10)	4 (%8)	9 (%18)
10 – 12	5 (%10)	3 (%6)	8 (%16)
Total	29 (%58)	21 (%42)	50 (%100)

Tablo 4.7. IgG varlığının yaş gruplarına göre dağılımı.

Yaş Grubu (Aylık)	IgG		Total
	(+)	(-)	
0 – 3	19 (%38)	3 (% 0)	22 (%44)
4 – 6	11 (%22)	0 (% 0)	11 (%22)
7 – 9	9 (%18)	0 (% 0)	9 (%18)
10 – 12	8 (%16)	0 (% 0)	8 (%16)
Total	47 (%94)	3 (% 6)	50 (%100)

Tablo 4.8. Viral genom varlığının yaş gruplarına göre dağılımı.

Yaş Grubu (Aylık)	Viral Genom		Total
	(+)	(-)	
0 – 3	15 (%30)	7 (%14)	22 (%44)
4 – 6	6 (% 12)	5 (%10)	11 (%22)
7 – 9	6 (% 12)	3 (%6)	9 (%18)
10 – 12	4 (%8)	4 (%8)	8 (%16)
Total	31 (%62)	19 (%38)	50 (%100)

Tablo 4.9. Virus izolasyonunun yaş gruplarına göre dağılımı.

Yaş Grubu (Aylık)	CPE		Total
	(+)	(-)	
0 – 3	17 (%34)	5 (%10)	22 (%44)
4 – 6	10 (% 20)	1 (%2)	11 (%22)
7 – 9	6 (% 12)	3 (%6)	9 (%18)
10 – 12	6 (%12)	2 (%4)	8 (%16)
Total	39 (%78)	11 (%22)	50 (%100)

Enfeksiyon varlığının cinsiyete göre dağılımı Tablo 4.10 - 13'te verildi.

Tablo 4.10. IgM varlığının cinsiyete göre dağılımı.

Cinsiyet	IgM		Total
	(+)	(-)	
Erkek ♂	13 (%26)	9 (%18)	22 (%44)
Dişi ♀	16 (% 32)	12 (%24)	28 (%56)
Total	29 (%58)	21 (%42)	50 (%100)

Tablo 4.11. IgG varlığının cinsiyete göre dağılımı.

Cinsiyet	IgG		Total
	(+)	(-)	
Erkek ♂	20 (%40)	2 (%4)	22 (%44)
Dişi ♀	27 (% 54)	1 (%2)	28 (%56)
Total	47 (%94)	3 (%6)	50 (%100)

Tablo 4.12. Viral Genom varlığının cinsiyete göre dağılımı.

Cinsiyet	Viral Genom		Total
	(+)	(-)	
Erkek ♂	16 (%32)	6 (%12)	22 (%44)
Dişi ♀	15 (% 30)	13 (%26)	28 (%56)
Total	31 (%62)	19 (%38)	50 (%100)

Tablo 4.13. Virus İzolasyonunun cinsiyete göre dağılımı.

Cinsiyet	Virus İzolasyonu		Total
	(+)	(-)	
Erkek ♂	19 (%38)	3 (%6)	22 (%44)
Dişi ♀	20 (% 40)	8 (%16)	28 (%56)
Total	39 (%78)	11 (%22)	50 (%100)

Lökosit, idrar, rektal sürüntü, nasal ve oküler akıntı örneklerinde kullanılan One Step Real Time RT-PCR ve Virus İzolasyon testlerinin karşılaştırmaları Tablo 4.14 -18’de verildi.

Tablo 4.14. Lökosit örneklerinde yapılan One Step Real Time RT-PCR ve virus izolasyon testlerinin karşılaştırılması.

Lökosit	Virus İzolasyonu		
	(+)	(-)	Toplam
Viral (+)	20 (%40)	0	20 (%40)
Genom (-)	0	30 (%60)	30 (%60)
Toplam	20 (%40)	30 (%60)	50 (%100)
Sensitivite ; 20/20 (% 100)		Pozitif öngörü değeri ; % 100	
Spesifisite ; 30/30 (% 100)		Negatif öngörü değeri ; % 100	
Korelasyon (%100)		$(p<0.01)$	

Tablo 4.15. Nasal Akıntı örneklerinde yapılan One Step Real Time RT-PCR ve virus izolasyon testlerinin karşılaştırılması.

Nasal Sürüntü	Virus İzolasyonu		
	(+)	(-)	Toplam
Viral (+)	23 (%46)	0	23 (%46)
Genom (-)	0	27 (%27)	27 (%54)
Toplam	23 (%46)	27 (%27)	50 (%100)
Sensitivite ; 23/23 (% 100)		Pozitif öngörü değeri ; % 100	
Spesifisite ; 27/27 (% 100)		Negatif öngörü değeri ; % 100	
Korelasyon (%100)		$(p<0.01)$.	

Tablo 4.16. Oküler Akıntı örneklerinde yapılan One Step Real Time RT-PCR ve virus izolasyon testlerinin karşılaştırılması.

Oküler Akıntı	Virus İzolasyonu		
	(+)	(-)	Toplam
Viral (+)	22 (%44)	0	22 (%44)
Genom (-)	0	28 (%56)	28 (%56)
Toplam	22 (%44)	28 (%56)	50 (%100)
Sensitivite ; 22/22 (% 100)		Pozitif öngörü değeri ; % 100	
Spesifisite ; 28/28 (% 100)		Negatif öngörü değeri ; % 100	
Korelasyon (%100)		$(p<0.01)$.	

Tablo 4.17. Rektal Sürüntü örneklerinde yapılan One Step Real Time RT-PCR ve virus izolasyon testlerinin karşılaştırılması.

Rektal Sürüntü	Virus İzolasyonu		
	(+)	(-)	Toplam
Viral (+)	27 (%54)	0	27 (%54)
Genom (-)	4 (% 8)	19 (%56)	23 (%46)
Toplam	31 (%62)	19 (%38)	50 (%100)

Sensitivite ; 27/31 (% 87,09) Pozitif öngörü değeri ; % 100,
Spesifisite ; 19/19 (% 100) Negatif öngörü değeri ; % 82.60
Korelasyon (% 84.4) ($p<0.01$).

Tablo 4.18. İdrar örneklerinde yapılan One Step Real Time RT-PCR ve virus izolasyon testlerinin karşılaştırılması.

İdrar	Virus İzolasyonu		
	(+)	(-)	Toplam
Viral (+)	13 (%26)	0	13 (%26)
Genom (-)	8 (% 16)	29 (%58)	37 (%73)
Toplam	21 (%42)	29 (%58)	50 (%100)

Sensitivite ; 13/21 (% 61,90) Pozitif öngörü değeri = % 100
Spesifisite ; 29/29 (% 100) Negatif öngörü değeri = % 78.37
Korelasyon (% 69.7) ($p<0.01$).

Araştırmada örnekleme yapılırken gözlenen klinik semptomlar ve lezyonlar solunum sistemi, sindirim sistemi, deri, merkezi sinir sistemi bulguları olmak üzere 4 ana başlık altında değerlendirildi. CDV spesifik antikor veya viral nükleik asit varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilen örneklerin temin edildiği hayvanlarda gözlenen en belirgin klinik semptomlar Tablo 4.19’da gösterildi.

Tablo 4.19. Araştırmada CDV pozitiflik tespit edilen örneklere ait olgularda gözlenen klinik semptomlar.

Olgu No	Araştırmada Kullanılan Örnekler							Klinik Semptomlar				Yaş (Ay)
	IgG Serum	IgM	Real Time RT-PCR					SoS	SiS	DB	MSS	
			L	NS	OS	RS	İ					
1	+	+	+	+	+	+	+	✓	✓	x	x	2
2	+	+	+	+	-	+	-	✓	✓	x	x	2
3	+	+	+	+	+	+	+	✓	✓	✓	✓	1.5
4	-	+	+	+	+	+	+	✓	x	✓	✓	1.5
5	+	+	-	+	-	+	+	✓	x	✓	✓	1
6	+	+	+	+	+	+	+	✓	✓	✓	✓	1.5
7	+	+	+	+	+	+	+	✓	✓	✓	✓	5
8	-	+	+	+	+	+	+	✓	✓	✓	✓	2

Olgu No	Araştırmada Kullanılan Örnekler							Klinik Semptomlar				Yaş (Ay)
	IgG Serum	IgM	Real Time RT-PCR					SoS	SiS	DB	MSS	
			L	NS	OS	RS	İ					
9	+	+	+	+	+	+	+	✓	✓	✓	✓	2
10	+	+	+	+	+	+	-	✓	✓	x	✓	3
11	+	+	-	+	+	+	-	✓	✓	x	x	9
12	+	+	-	-	-	+	-	✓	✓	✓	x	4
13	+	+	-	+	+	+	-	✓	✓	✓	x	8
14	+	+	-	-	-	-	-	✓	x	x	x	1
15	-	-	-	-	-	-	-	✓	x	x	x	3
16	+	-	-	+	-	+	-	✓	✓	x	x	5
17	+	+	+	-	-	+	-	x	✓	x	✓	7
18	+	-	-	-	-	-	-	✓	x	x	x	10
19	+	-	-	-	-	-	-	✓	x	x	x	3.5
20	+	+	-	+	+	+	-	✓	✓	✓	✓	10
21	+	+	-	-	-	+	-	x	✓	x	✓	4
22	+	-	-	-	-	-	-	✓	x	x	✓	7
23	+	+	+	-	-	-	-	x	x	x	✓	11
24	+	+	+	+	+	+	-	✓	✓	x	✓	1
25	+	-	-	-	-	-	-	x	✓	✓	x	6
26	+	-	-	-	-	-	-	✓	x	x	x	3
27	+	+	+	+	+	-	-	✓	✓	✓	✓	8
28	+	+	-	-	-	-	-	x	✓	✓	x	5
29	+	+	-	-	-	-	-	x	✓	x	x	4
30	+	+	-	-	-	-	-	x	x	x	✓	4
31	+	-	+	+	+	+	-	✓	✓	✓	✓	2
32	+	-	+	+	-	+	-	x	✓	✓	✓	1
33	+	-	+	-	+	+	-	✓	x	x	✓	2
34	+	-	-	-	-	-	-	x	x	✓	x	8
35	+	-	-	-	-	-	-	✓	x	x	x	2.5
36	+	+	-	-	-	-	-	x	x	✓	x	5
37	+	+	-	-	+	-	-	x	x	✓	✓	9
38	+	-	-	-	-	-	-	x	x	✓	x	12
39	+	+	-	-	-	-	-	x	x	x	✓	12
40	+	+	-	-	-	-	+	x	x	x	✓	11
41	+	-	-	-	-	-	-	x	x	✓	x	7
42	+	+	-	-	-	-	-	x	x	x	✓	11
43	+	-	+	-	+	+	-	x	✓	✓	✓	6
44	+	-	-	+	+	+	+	✓	✓	✓	✓	1.5
45	+	-	-	+	+	+	+	x	x	✓	✓	10
46	+	-	+	+	+	+	-	✓	x	✓	✓	9
47	+	+	+	+	+	+	+	✓	x	✓	✓	4
48	+	-	+	+	+	+	+	✓	✓	✓	✓	3
49	+	-	-	-	-	-	-	✓	✓	x	x	3
50	+	-	-	-	-	-	-	✓	x	x	x	3

NS: Nasal Akıntı, OS: Oküler Akıntı, RS: Rektal Sürüntü, SoS: Solunum Sistemi Bulguları, SiS: Sindirim Sistemi Bulguları, DL: Deri Bulguları, MSS: Merkezi Sinir Sistem Bulguları

Çalışmada örneklemelerin yapıldığı hayvanlarda, CDV enfeksiyonunda görülen bazı klinik semptomlar Şekil 4.29.-32’de gösterildi.



Şekil 4.29. Solunum sistemi bulgusu (Olgu No 7).



Şekil 4.30. Burun ucunda hiperkeratoz (Olgu No 6).



Şekil 4.31. MSS bulgusu (Olgu No 9).



Şekil 4.32. Taban yastığında hiperkeratoz (Olgu No 28).

Araştırmada istatistiki yönden test sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 4.20 - 25'te gösterildi.

Tablo 4.20. ELISA IgG ve IgM testlerinin karşılaştırılması.

ELISA		IgM		
		(+)	(-)	Toplam
IgG	(+)	27 (%54)	20 (%40)	47 (%94)
	(-)	2 (% 4)	1 (% 2)	3 (% 6)
Toplam		29 (% 58)	21 (% 42)	50 (%100)
Sensitivite ; % 93.10		Pozitif öngörü değeri ; % 57.44		
Spesifisite ; % 4.76		Negatif öngörü değeri ; % 33.33		
Korelasyon tespit edilmedi		$(p>0.01)$.		

Tablo 4.21. ELISA IgM ile One Step Real Time RT-PCR testlerinin karşılaştırılması (Total olgu sayısında).

		One Step Real Time RT-PCR		
		(+)	(-)	Toplam
ELISA	(+)	22 (%44)	7 (%14)	29 (%58)
IgM	(-)	9 (%18)	12 (%24)	21 (%42)
Toplam		31 (%62)	19 (%38)	50 (%100)
Sensitivite ; % 70.96		Pozitif öngörü değeri = % 75.86		
Spesifisite ; % 63.15		Negatif öngörü değeri = % 57.14		
Korelasyon (%33.60)		$(p>0.01)$.		

Tablo 4.22. ELISA IgG ile One Step Real Time RT-PCR testlerinin karşılaştırılması (Total olgu sayısında).

		One Step Real Time RT-PCR		
		(+)	(-)	Toplam
ELISA	(+)	29 (%58)	18 (%36)	47 (%94)
IgG	(-)	2 (%4)	1 (%2)	3 (%6)
Toplam		31(%62)	19 (%38)	50 (%100)
Sensitivite ; % 93.54		Pozitif öngörü değeri = % 61.70		
Spesifisite ; % 5.26		Negatif öngörü değeri = % 33.33		
Korelasyon tespit edilmedi		$(p<0.01)$.		

Tablo 4.23. IgM ELISA testi ile Virus İzolasyon testlerinin karşılaştırılması (Total olgu sayısında).

		Virus İzolasyonu		
		(+)	(-)	Toplam
IgM Testi	(+)	29	0	29
	(-)	10	11	21
Toplam		39	11	50
Sensitivite ; % 74.35		Pozitif öngörü değeri ; % 100		
Spesifisite ; % 100		Negatif öngörü değeri ; % 52.38		
Korelasyon (%62.4)		$(p < 0.01)$.		

Tablo 4.24. IgG ELISA testi ile Virus İzolasyon testlerinin karşılaştırılması.

		Virus İzolasyonu		
		(+)	(-)	Toplam
IgG Testi	(+)	37	10	47
	(-)	2	1	3
Toplam		39	11	50
Sensitivite ; % 94.87		Pozitif öngörü değeri ; % 78.72		
Spesifisite ; % 100		Negatif öngörü değeri ; % 33.33		
Korelasyon tespit edilmedi		$(p > 0.01)$.		

Tablo 4.25. One Step Real Time RT-PCR testi ile Virus İzolasyon testlerinin karşılaştırılması.

		Virus İzolasyonu		
		(+)	(-)	Toplam
One Step	(+)	31	0	31
Real Time	(-)	8	11	19
RT-PCR				
Toplam		39	11	50
Sensitivite ; % 79.48		Pozitif öngörü değeri = % 100		
Spesifisite ; % 100		Negatif öngörü değeri = % 57.89		
Korelasyon (%67.8)		$(p < 0.01)$.		

One Step Real Time RT-PCR testiyle yapılan araştırmada; solunum sistemi semptomları gözlenen hayvanlarda en fazla pozitiflik % 68.75 oranında (22/32) rektal sürüntü örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 34.37 oranında (11/32) idrar örneklerinde tespit edildi. Sindirim sistemi semptomları gözlenen hayvanlarda en fazla pozitiflik % 80.76 oranında (21/26) rektal sürüntü örneklerinde ve en düşük pozitiflik

% 30,76 oranında (8/26) idrar örneklerinde tespit edildi. Deri bulguları gözlenen hayvanlarda en fazla pozitiflik % 69.23 oranında (18/26) rektal sürüntü örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 42.30 oranında (11/26) idrar örneklerinde tespit edildi. MSS semptomları gözlenen hayvanlarda en fazla pozitiflik % 72.41 oranında (21/29) rektal sürüntü örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 41.37 oranında (12/17) idrar örneklerinde tespit edildi.

Solunum ve sindirim semptomlarının birlikte gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 89.47 oranında (17/19) nasal akıntı örneklerinde, en düşük pozitiflik % 47.36 oranında (9/10) idrar örneklerinde tespit edildi. Solunum, sindirim ve deri bulgularının beraber gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 91.66 oranlarıyla (11/12) nasal ve oküler akıntı örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 58.33 oranında (7/12) idrar örneklerinde tespit edildi. Solunum, sindirim, deri ve MSS bulgularının hepsinin bir arada gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 100 oranlarıyla (10/10) nasal ve oküler akıntı örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 70 oranında (7/10) idrar örneklerinde tespit edildi. Solunum, deri ve MSS bulgularının beraber gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 100 oranında (14/14) nasal akıntı örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 71.42 oranında (10/14) idrar örneklerinde tespit edildi. Solunum, sindirim ve MSS bulgularının beraber gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 100 oranlarında (12/12) nasal ve oküler akıntı örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 58.33 oranında (7/12) idrar örneklerinde tespit edildi. Solunum ve MSS semptomlarının beraber gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 88.88 oranlarıyla (16/18) rektal sürüntü, oküler ve nasal akıntı örneklerinde, en düşük pozitiflik % 55.55 oranında (10/18) idrar örneklerinde tespit edildi.

Sindirim ve MSS semptomlarının beraber gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 93.75 oranında (15/16) rektal sürüntü örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 43.75 oranında (7/16) idrar örneklerinde tespit edildi. Sindirim ve deri bulgularının beraber gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 81.25 oranlarıyla (13/16) rektal sürüntü örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 43.75 oranında (7/16) idrar örneklerinde tespit edilmiştir. Sindirim, deri ve MSS bulgularının beraber gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 91.66 oranlarında (11/12) nasal ve oküler akıntı ve en düşük pozitiflik % 58.33 oranında (7/12) idrar örneklerinde tespit edildi.

Deri ve MSS bulgularının beraber gözleendiği hayvanlarda o en fazla pozitiflik % 88.88 oranlarıyla (13/16) rektal sürüntü, nasal ve oküler akıntı örneklerinde, ve en düşük pozitiflik % 43.75 oranında (7/16) idrar örneklerinde tespit edildi.

Virus izolasyon çalışmalarında; solunum sistemi semptomları gözlenen hayvanlardan elde edilen örneklerle yapılan en fazla pozitiflik % 65.62 oranlarında (21/32) nasal akıntı ve rektal sürüntü örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 40.62 oranında (13/19) idrar örneklerinde tespit edildi. Sindirim sistemi semptomları gözlenen hayvanlarda en fazla pozitiflik % 88.46 oranında (23/26) rektal sürüntü örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 38.46 oranında (10/16) idrar örneklerinde tespit edildi. Deri bulguları gözlenen hayvanlarda en fazla pozitiflik % 73.07 oranında (19/26) rektal sürüntü örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 50 oranında (13/26) lökosit örneklerinde tespit edildi. MSS semptomları gözlenen hayvanlarda en fazla pozitiflik % 79.31 oranında (23/29) rektal sürüntü örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 51.72 oranında (15/29) idrar örneklerinde tespit edildi.

Solunum ve sindirim semptomlarının birlikte gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 89.47 oranlarında (17/19) nasal akıntı ve rektal sürüntü örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 42.10 oranında (8/19) idrar örneklerinde tespit edildi. Solunum, sindirim ve deri bulgularının birlikte gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 91.66 oranlarında (11/12) rektal sürüntü, nasal ve oküler akıntı örneklerinde, ve en düşük pozitiflik % 58.33 oranında (7/12) idrar örneklerinde tespit edildi. Solunum, sindirim deri ve MSS bulgularının hepsinin bir arada gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 100 oranlarında (10/10) nasal ve oküler akıntı örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 70 oranında (7/10) idrar örneklerinde tespit edildi. Solunum, deri ve MSS bulgularının birlikte gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 100 oranlarında (14/14) nasal akıntı örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 71.42 oranında (10/14) idrar örneklerinde tespit edildi. Solunum, sindirim ve MSS bulgularının birlikte gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 100 oranlarında (12/12) nasal ve oküler akıntı örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 58.33 oranında (7/12) idrar örneklerinde tespit edildi. Solunum, sindirim ve MSS semptomlarının birlikte gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 93.75 oranlarında (15/16) rektal sürüntü örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 43.75 oranında (7/16) idrar örneklerinde tespit edildi. Solunum ve MSS

semptomlarının birlikte gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 88.88 oranlarında (16/18) rektal sürüntü, nasal ve oküler akıntı örneklerinde, ve en düşük pozitiflik % 55.55 oranında (10/18) idrar örneklerinde tespit edildi.

Sindirim ve MSS semptomlarının birlikte gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 93.75 oranlarında (15/16) rektal sürüntü örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 43.75 oranında (7/16) idrar örneklerinde tespit edildi. Sindirim ve deri bulgularının birlikte gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 87.50 oranlarında (14/16) rektal sürüntü örneklerinde ve en düşük pozitiflik % 50 oranında (8/8) idrar örneklerinde tespit edildi. Sindirim, deri ve MSS bulgularının birlikte gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 91.66 oranlarında (11/12) rektal sürüntü, nasal ve oküler akıntı örneklerinde, ve en düşük pozitiflik % 58.33 oranında (7/12) idrar örneklerinde tespit edildi.

Deri ve MSS bulgularının birlikte gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 88.88 oranlarında (16/18) rektal sürüntü, nasal ve oküler akıntı örneklerinde, ve en düşük pozitiflik % 61.11 oranında (11/18) idrar örneklerinde tespit edildi.

5. TARTIŞMA

Evcil ve yabani tüm *Canidae* sınıfında yaygın olarak görülen CD ülkemizde evde ve sokakta serbest olarak yaşayan köpeklerde yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir. Özellikle 1 yaşına kadar olan köpekler hastalığın risk grupları içerisinde ön plana çıkmaktadır. Aşılama programlarının düzgün uygulanabildiği yerlerde CDV prevalansının düşük olduğu bildirilmiştir (18, 62, 94). Ülkemizdeki mevcut özel veteriner kliniklerinde evcil köpeklere yönelik aşılama programları yaygın olarak uygulanmaktadır. Buna rağmen sokaklarda serbest olarak dolaşan köpeklere yönelik herhangi bir aşılama programı uygulanmadığı için aşılı veya aşısız bütün köpekler hastalık riskiyle karşı karşıya kalmaktadır. Üstelik ülkemizde yabani hayvanlarda CD'ye yönelik yapılmış kapsamlı bir çalışma olmadığı için hastalığın yaban hayattan geçiş riskinin olup olmadığı bilinmemektedir. Hastalık belirli mevsimsel dönemlerde görülmesine de, soğuk kış aylarında daha sık görülmektedir. Bu durum viral etkenin serin çevre şartlarında indirek yolla bulaşarak varlığını daha kolay idame ettirebilmesiyle açıklanabilir.

Son yıllarda ülkemizde köpek serum örneklerinde CDV spesifik IgM ve IgG varlığının araştırıldığı Çalışkan ve Burgu (19) tarafından yapılan araştırmada sırasıyla 30/47 (% 63.82) ve 19/47 (% 40.42) adet, yalnız IgG varlığının araştırıldığı Esin ve Yavru (30) tarafından yapılan çalışmada 70/116 (%60.34) adet pozitiflik tespit edildiği bildirilmiştir. Kuzeybatı Zimbabwe'de McRee ve ark. (66) tarafından CDV spesifik IgG yönünden incelenen 75/225 (%34) adet köpekte pozitiflik tespit edildiği bildirilmiştir. Buna göre elde edilen bulguların CDV hastalığının bulaşmasını önlemeye katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Kubo ve ark. (55) tarafından 192 köpekte yapılan retrospektif bir çalışmada CDV enfeksiyonu serolojik olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre yalnızca IgM ve IgG düzeylerine bakılarak CDV enfeksiyonunda kesin tanı koymanın zor olacağı belirtilmiştir. Bu çalışmada araştırılan 50 adet köpeğin kan serumunda CDV N proteinine özgü IgM ve IgG antikorlarının varlığı indirekt ELISA testi ile incelenerek birbirleriyle kıyaslandı. Sonuçlara göre toplam 27 (%54) olguda IgM ve IgG antikorlarının her ikisi birden, 22 (%44) olguda her iki antikordan en az biri tespit edilirken sadece 1 (%2) olguda hiçbir antikor tespit

edilemedi. Böylece CD'nin ön tanısı yapılarak enfeksiyonun akut, erken/geç konvalesan dönemleri belirlendi.

Araştırmada kan serum IgM varlığı yönünden en düşük 7-9 ve 10-12 aylık grupta 5'er adet, en yüksek 0-3 aylık grupta 11 (%22) adet tespit edildi. IgG varlığı yönünden en düşük 10-12 aylık grupta 8 (%16) adet, en yüksek 0-3 aylık grupta 19 (%38) adet pozitiflik tespit edildi. Viral genom varlığı yönünden en düşük 10-12 aylık grupta 4 (%8) adet, en yüksek 0-3 aylık grupta 15(%30) adet hayvanda pozitiflik tespit edildi. Virus izolasyonu yönünden en düşük 7-9 ve 10-12 aylık grupta 6 (%12) adet, en yüksek 0-3 aylık grupta 17 (%34) adet pozitiflik tespit edildi. Tüm testlerde özellikle 0-3 aylık grupta yüksek pozitiflikler bulundu. Sonuçlara göre özellikle 0-3 aylık köpekler CDV enfeksiyonu yönünden risk grubunda yer aldığı kanısına varıldı. Gray ve ark. (36)'ın 431 adet 5 aylıktan küçük barınak köpeklerinde yaptığı araştırmanın sonuçları bizim elde ettiğimiz sonuçlarla uyum göstermektedir.

Köpeklerde görülen bazı enfeksiyöz hastalıkların teşhisinde serolojik yöntemlerin tercih edilebilmektedir (68). ELISA ile tespit edilen CDV spesifik IgM'lerin enfeksiyon döneminin değerlendirilmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir (101). Ayrıca CDV spesifik IgM tespiti benzer klinik semptom gösteren hastalıklardan ayırt edilmesini de kolaylaştıracaktır. Ancak CDV enfeksiyonlarında immun sistem baskılandığından hastalığın serolojik olarak kesin teşhisi zordur. Bu nedenle IgM ve IgG'lerin kan serumundaki varlığına göre enfeksiyon değerlendirme tablosu (80) baz alındığında akut, erken/geç konvalesan dönem tayini yapılarak teşhis konulmaktadır. CD hastalığında akut veya konvalesan dönemlerinin belirlenmesinde tercih edilen virus suşuna ve konakçı immun durumuna göre enfekte köpeklerde IgM 5 haftadan 3 aya kadar kalabilmektedir (5). Çalışmamızda klinik bulgu gösteren aşılammamış hayvanların kan serumlarında IgM ve IgG tespiti yapıldı. Bu durumda hayvanların enfekte olduğu veya enfeksiyonu geçirmiş olduğu sonucuna varıldı. Kuvvetli antikor cevabı oluşturduğu için N proteini bütün mobillivirüslerde immunolojik olarak diğer proteinlere nazaran daha baskın olduğu bildirilmiştir (95). Bu durum CD hastalığında humoral bağışıklığın azaldığı dönemlerde H ve F proteinlerine özgü nötralizan antikorlara kıyasla N proteinine özgü antikorların tespit edilme şansının daha yüksek olduğunu göstermektedir. MSS'nin

etkilendiği bazı ileri düzey CD olgularında H ve F proteinlerine karşı sınırlı bir immün yanıtın oluşmasına rağmen N proteinlerine karşı oluşan immün yanıtın nispeten bozulmadığı bildirilmiştir (53, 81). CDV'ye spesifik antikorların tespiti için virus nötralizasyon testi (VNT) yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat VNT pahalı ve uygulaması zaman alıcı (en az dört gün) olması özellikle rutin teşhis laboratuvarları için dezavantaj oluşturmaktadır. Geliştirilen duyarlı ve güvenilir ELISA testlerinin VNT'ye alternatif ve etkili bir yöntem olduğu düşünülmektedir (95). Dolayısıyla N protein bazlı testlerin kullanımı virus nötralizasyon testine göre daha avantajlı olabilmektedir (29). Cinsiyete göre testlerin sonuçları dikkate alındığında; ELISA (IgM-IgG) ve virus izolasyonunda dişilerde, viral genom tespitine yönelik yapılan uygulamada, erkeklerde daha fazla pozitiflik belirlendi. Bizim elde ettiğimiz sonuçlardan farklı olarak Diaz ve ark. (26) tarafından, 83 köpekte, CDV seroprevalansının değerlendirildiği araştırmada pozitif olarak belirlenen 30 köpekten 17 (%57) adeti dişi, 13 (%49) adetinin ise erkek olduğu bildirilmiştir.

Akut enfekte köpeklerin nötralizan antikorlar oluşmadan ölme ihtimalinden dolayı CDV'ye spesifik nötralizan, presipitan vb. antikorların serolojik olarak tespit edilmesi tanı için tek başına yeterli olmamaktadır (5). Günümüze kadar çeşitli biyolojik materyallerde CDV nükleik asidinin varlığını ortaya koyabilmek için birçok RT-PCR yöntemi geliştirilmiştir (33, 88). Konvansiyonel RT-PCR yöntemlerinin diğer teşhis yöntemleri (ELISA, FAT, EM ve Virus İzolasyonu vb.)'ne göre sensitivitesi ve spesifisitesi yüksek ve hızlı sonuç vermesinden ötürü daha çok tercih edilmektedir. Ancak Elia ve ark. (28) tarafından yapılan çalışmada konvansiyonel RT-PCR tekniğinin teşhis için 4-8 saat sürebileceği bildirilmiştir. RT-PCR yönteminin duyarlılığı oldukça yüksek olmasına rağmen teşhis amacıyla kullanılan çoğu PCR yönteminde doğal enfekte ve aşılı hayvanlar arasında ayırım yapılamamaktadır. Bu nedenle hayvanın aşi geçmişinin bilinmesi ve ayırıcı metotlara ihtiyaç duyulmaktadır (37, 51).

Ülkemizde CDV genom varlığı yönünden PCR yöntemiyle incelenen köpek dişkı veya rektal sürüntü örneklerinde yapılan çalışmalarda Yeşilbağ ve ark. (104) 15/39 (%38.46) adet, Sahna ve ark. (83) tarafından 26/34 (%76.5) adet pozitiflik bildirilmiştir. Gustavsson ve ark. (40) tarafından gastrointestinal sistemde bulunan

viral etkenlerin hayvanlardan alınacak rektal sürüntü örnekleriyle Real Time PCR tekniğiyle tespitinin uygun olduğunu bildirmişlerdir. Ülkemizde One Step Real Time RT-PCR tekniğiyle CDV enfeksiyonunun teşhisine yönelik bilimsel bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız bu yönüyle ilk olma özelliği taşımaktadır.

Araştırması yapılan 50 olguya ait 250 farklı örnekte One Step Real Time PCR tekniğiyle toplamda 105 (%52) adet örnekte CDV'ye özgü nükleik asit saptandı. En fazla pozitiflik 27/50 (%54) adet rektal sürüntüde, en az pozitiflik ise 13/50 (%26) adet olmak üzere idrar örneklerinde tespit edildi. One Step Real Time RT PCR yönteminde gene özgü primerler cDNA'yı üretmek için tek seferde hem RT hem de PCR adımları aynı koşullar altında gerçekleşmektedir. Bu durum daha sonraki amplifikasyonlar için deneysel varyasyonun azaltılması, sınırlı pipet uygulaması ile olası hata ve çapraz kontaminasyonların önlenmesi gibi bir takım avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca reaksiyonda yer alan viral gene özgü florojenik problemler sayesinde değerlendirmenin duyarlı, spesifik, hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılmasına imkan sunmaktadır. Real Time PCR ürünlerinin ölçülmesinde interkalasyon yapan boyalar kullanıldığı durumlarda spesifik ve spesifik olmayan tüm PCR ürünlerinin toplamının tespit edilmesinden kaynaklanan dezavantaj ile karşılaşmaktadır (8). Bu yüzden araştırmada, TaqMan prob ile çalışan real time sistemi tercih edildi. Bu sistemlerde Taq DNA polimerazın 5' nükleaz aktivitesinin florejenik etiketlenebilen problemlerde kullanılmasının tanımlanmasıyla Real Time RT-PCR olarak geliştirilmiştir (27). Florojenik problemlerin yalnızca spesifik PCR ürünlerini tespit etmesi özelliğinden yararlanılarak, araştırmada tespit edilen pozitifliklerin daha özgül ve güvenilir olması hedeflendi. Bu doğrultuda CD hastalığı için araştırması yapılan her köpeğin lökosit, idrar, nasal, oküler ve rektal sürüntü örnekleri viral nükleik asit varlığı yönünden aynı anda incelenerek doğru, güvenilir ve aynı zamanda hızlı hastalık teşhisi konması amaçlandı.

Ülkemizde Esin ve Yavru (30) köpeklerde CDV enfeksiyonu araştırmasında Vero hücre kültürlerine lökosit örneklerinin inokulasyonu sonucu 45 (%38) adet örnekte CPE varlığı tespit etmişlerdir. Tan ve ark. (92) tarafından Çin'de yapılan bir araştırmada, MDCK hücre kültüründe CDV'ye özgü CPE oluşumlarının gözlemlendiği ve elde edilen izolatların DIF yöntemiyle doğrulandığını rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda ileri(+++), orta(++) ve düşük(+) seviye CPE meydana getiren örnek sayıları sırasıyla 37 (%14.8), 31 (%12.4) ve 50 (%20) olarak belirlendi. Toplamda CPE meydana getiren 118 (%47.2) örnek tespit edildi. İleri seviye CPE tespit edilen örneklerden en çok dikkati çeken rektal sürüntü (%56.7) ve idrar örnekleri (%29.7) oldu. En fazla düşük(+) seviye CPE'lerin görüldüğü örneklerin lökosit örnekleri (%34) olduğu belirlendi.

L, NS ve OS örneklerinin One Step Real Time RT-PCR ile Virus İzolasyon testlerinin karşılaştırılması sonucu %100 korelasyon tespit edildi. Testler arası karşılaştırmada istatistiki açıdan önem ($p<0.01$) bulundu. Ancak RS örneklerinde %84.4, İ örneklerinde %69.7 korelasyon belirlendi. Her iki testin örneklemeleri için yapılan istatistiki analizde önem bulundu. Pawar ve ark. (76) tarafından yapılan bir çalışmada, bizim çalışmamızdaki benzer tekniklerin kullanılarak oküler swap örneğinden CDV izolasyonunun yapıldığı rapor edilmiştir.

One Step Real Time RT-PCR testi ile Virus İzolasyon testlerinin karşılaştırılması sonucunda korelasyon %67.8 bulunmuş olup, istatistiki açıdan ($p<0.01$) önem tespit edildi. ELISA (IgM) testi ile Virus İzolasyon testlerinin karşılaştırılması sonucunda korelasyon %62.4 bulunmuş olup istatistiki açıdan önem ($p<0.01$) tespit edildi. Ancak ELISA (IgG) testi ile virus izolasyon testlerinin karşılaştırılması sonucunda korelasyon düşük bulundu ve istatistiki açıdan önem ($p>0.01$) belirlenmedi. Elde edilen verilere göre CDV enfeksiyonunda tanı koyulurken yapılan serolojik testlerin özgül moleküler ve virus izolasyon çalışmalarıyla desteklenmesi doğru bir yaklaşımdır.

Akut ve subakut faza ulaşmış CDV enfeksiyonu lenfositik apoptosisi indükleyerek immunsupresyona neden olduğu bildirilmektedir (86). İmmun sistemin zayıfladığı durumlarda serolojik teşhislerin tek başına yeterli olmayacağı bilinmektedir. (51). Viral genom tespit edilmesinde kullanılan PCR gibi moleküler yöntemlerin de bir takım dezavantajları bulunmaktadır (71, 79). Bu doğrultuda çalışmamızda hücre kültürü ve DIF teknikleriyle doğrulama ve kesin tanı yapılması tercih edildi. PCR çalışmalarında bir takım çevresel faktörler polimeraz enzim aktivitesini engelleyebilmektedir. Bu durum bazen yanlış-negatif sonuçların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (32). Çalışmada, viral genom tespit edilmeyen 8 olguya

ait toplam 12 örnekten virus izolasyonunun yapılması, PCR inhibitörlerinin olumsuz etkisinin olabileceği sonucuna varıldı.

Spesifik laboratuvar testleri, klinisyen veteriner hekimler için kolay ulaşılabilir olmamaktadır. Bu nedenle çoğu veteriner hekim CDV enfeksiyonu şüpheli köpeklerin spesifik olmayan semptomlarına bakıp sadece klinik olarak teşhis etmeye çalışmaktadır. Fakat diğer patojenlere atfedilebilen bir çok hastalık durumu, güç ve hırıltılı solunum, göz ve burun akıntısı, öksürük de dahil olmak üzere benzer semptomlara neden olabilmektedir (78). Bunlardan en önemlileri *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus zooepidemicus*, Canine influenza virus (H3N8), Canine herpesvirus, Canine adenovirus-2, Canine parainfluenza virus -2 olarak bilinmektedir (46). Bu yüzden köpeklerde görülen bir çok enfeksiyonun CD ile benzer semptomlar meydana getirebileceği ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır. Doğru ve güvenilir bir teşhis için özgülüğü ve duyarlılığı yüksek, ayırt edici yöntemlerin tercih edilmesi daha doğru bir yaklaşım olacaktır.

CDV hastalığında moleküler teşhis ve virus izolasyonu amacıyla klinik belirtilere göre bir çok örnek materyali kullanılabilmektedir (73). One Step Real Time RT-PCR testi ile yapılan araştırmada; sindirim sistemi semptomlarının gözleendiği köpeklerde en fazla pozitiflik % 80.76 oranında rektal sürüntü örneklerinde, sindirim ve MSS semptomlarının birlikte gözleendiği köpeklerde en fazla pozitiflik % 93.75 oranında yine rektal sürüntü örneklerinde tespit edildi. Virus izolasyon çalışmalarında; solunum, sindirim ve MSS semptomlarının birlikte gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 93.75 oranında rektal sürüntü örneklerinde, sindirim sistemi ve MSS semptomlarının birlikte gözleendiği hayvanlarda en fazla pozitiflik % 93.75 oranında yine rektal sürüntü örneklerinde tespit edildi. Bu verilere dayanarak, olguların genelinde gözlenen sindirim sistemi semptomlarıyla rektal sürüntü örneklerindeki yüksek pozitifliklerin paralel seyrettiği görüldü. Elde ettiğimiz veriler daha önce yapılan çalışmalar ile benzerlik gösterdi (40, 83, 104). Klinik semptomların tek tek ya da birlikte görüldüğü bütün olgularda en düşük pozitiflik elde edilen örnek materyalinin idrar (%30.76 – 71.42) olduğu tespit edildi. Buna rağmen örneklerin meydana getirdiği CPE seviyesi dikkate alındığında 21 (%56.7) adet rektal sürüntü, 11 (%29.7) adet idrar örneğinde ileri(+++) seviyede CPE gözleendi. Bu durumda elde

ettiğimiz sonuçların Elia ve ark. (28)'ın yaptığı bir araştırma ile benzerlik göstermesi nedeniyle örnek materyallerindeki viral yükün yüksek olabileceği yorumu yapıldı.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Batı Akdeniz Bölgesi'nde aşılammamış ve klinik semptomlu köpeklerde CDV enfeksiyonunun serolojik, moleküler ve virolojik olarak varlığı ortaya kondu. Bu amaçla, moleküler ve virus izolasyonu çalışmalarında RS örneklerinin kullanılmasının uygun olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca, DIF tekniğiyle doğrulanarak yapılan virus izolasyon çalışmalarının moleküler çalışmaların dezavantajlarını giderebileceği de belirlendi.

Aşısız köpeklerde CDV spesifik IgM ve IgG varlığının birlikte araştırılarak enfeksiyonun ön tanısının yapılmasını, serolojik araştırmalar için N proteinine spesifik Ig tespiti yapan testlerin kullanılmasını, elde edilen serolojik verilerin özgül moleküler tekniklerle desteklenmesini ve yaygın olarak kullanılan PCR tekniklerinden özgül olanların tercih edilmesini tavsiye etmekteyiz.

CD hastalığında moleküler ve virus izolasyon çalışmaları için özellikle klinik olarak sindirim sistemi semptomları gözlenen köpeklerin dikkate alınmasını, sindirim sistemi semptomlarıyla seyreden miks bulguların gözleendiği vakalarda virolojik yönden özellikle rektal sürüntü örneklerinin incelenmesini ve virus izolasyon çalışmalarında idrar örneklerinin de tercih edilebileceğini önermekteyiz.

Aşılammamış ve klinik semptom gösteren CDV ile enfekte köpeklerin vücut sekret/ekskretleriyle virus saçılabilceğinden öncelikle hijyen, karantina ve dezenfeksiyon uygulamalarına dikkat edilmesinin, sokak hayvan barınakları ve rehabilitasyon merkezlerinde uygulanan rutin koruma ve kontrol programlarına CD aşısının da dahil edilmesinin ve ülkemizde CDV'nin yaban hayvanlarındaki varlığı ve epidemiyolojisine dayalı araştırmaların yapılmasının faydalı olacağı kanaatini taşımaktayız.

7. KAYNAKLAR

1. **Abraham G, Rhodes DP, Banerjee AK** (1975): The 5' terminal structure of the methylated mRNA synthesized in vitro by vesicular stomatitis virus. *Cell*, **5**, 51-58.
2. **Afonso CL, Amarasinghe GK, Bányai K, Bào Y, Basler CF, Bavari S, Bejerman N, Blasdel KR, Briand F-X, Briese T** (2016): Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch Virol.*, **161**, 2351–2360.
3. **Anderson DE, von Messling V** (2008): Region between the canine distemper virus M and F genes modulates virulence by controlling fusion protein expression. *J. Virol.*, **82**, 10510-10518.
4. **Anderson DE, Wang L-F** (2011): *The Biology of Paramyxoviruses*, Caister Academic Press, Norfolk, p: 435-459.
5. **Appel M, Summers B** (1999): Canine distemper: current status, Recent Advances in Canine Infectious Diseases. *Ivis.*, 68-72.
6. **Appel MJ, Gillespie JH** (1972): *Canine distemper virus*, Springer-Verlag, Wien, pp: 1-96.
7. **Appel MJ, Summers BA** (1995): Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Veterinary microbiology*, **44**, 187-191.
8. **Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR** (2005): Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.*, **5**, 209-219.
9. **Avila M, Alves L, Khosravi M, Ader-Ebert N, Origgi F, Schneider-Schaulies J, Zurbriggen A, Plemper RK, Plattet P** (2014): Molecular determinants defining the triggering range of prefusion F complexes of canine distemper virus. *J. Virol.*, **88**, 2951-2966.
10. **Barrett T, Mahy B** (1986): Genome organisation and genetic relationships among the morbilliviruses (antigen structure, distemper virus, Measles virus). *Revue Scientifique et Technique*, **2**, 395-405.
11. **Beineke A, Puff C, Seehusen F, Baumgartner W** (2009): Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet Immunol Immunopathol.*, **127**, 1-18.
12. **Blancou J** (2004): Dog distemper: imported into Europe from South America?. *Hist Med Vet.*, **29**, 35-41.

13. **Blixenkron-Möller M, Svansson V, Appel M, Krogsrud J, Have P, Örvell C** (1992): Antigenic relationships between field isolates of morbilliviruses from different carnivores. *Arch Virol.*, **123**, 279-294.
14. **Bussell RH, Karzon DT** (1962): Canine distemper virus in chick embryo cell culture: Plaque assay, growth, and stability. *Virology*, **18**, 589-600.
15. **Bussell RH, Karzon DT** (1965): Canine distemper virus in ferret, dog and bovine kidney cell cultures. *Archiv f. Virusforschung.*, **17**, 163-182.
16. **Bussell RH, Karzon DT** (1965): Canine distemper virus in primary and continuous cell lines of human and monkey origin. . *Archiv f. Virusforschung.*, **17**, 183-202.
17. **Calain P, Roux L** (1993): The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J. Virol.*, **67**, 4822-4830.
18. **Chappuis G** (1995): Control of canine distemper. *Veterinary microbiology* **44**, 351-358.
19. **Çalışkan E, Burgu İ** (2007): Köpek gençlik hastalığı virusunun prevalansı ve seroepidemiolojisi. *Etlik veteriner mikrobiyoloji derg.*, **18**, 5-10.
20. **Deem SL, Spelman LH, Yates RA, Montali RJ** (2000): Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. *J Zoo Wildl Med.*, **31**, 441-451.
21. **Demeter Z, Palade EA, Rusvai M** (2009): Canine distemper: still a major concern in Central Europe. *Lucrari Stiintifice Medicina Veterinara*, **42**, 136-150.
22. **Demeter Z, Palade EA, Hornyák Á, Rusvai M** (2010): Controversial results of the genetic analysis of a canine distemper vaccine strain. *Veterinary microbiology*, **142**, 420-426.
23. **Devaux P, von Messling V, Songsunthong W, Springfield C, Cattaneo R** (2007): Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation. *Virology*, **360**, 72-83.
24. **Di Sabatino D, Savini G, Lorusso A** (2015): Canine distemper and endangered wildlife: Is it time for mandatory vaccination of dogs?. *Vaccine*, **33**, 6519.
25. **Diallo A** (1990): Morbillivirus group: genome organisation and proteins. *Veterinary microbiology*, **23**, 155-163.
26. **Diaz NM, Mendez GS, Grijalva CJ, Walden HS, Cruz M, Aragon E, Hernandez JA** (2016): Dog overpopulation and burden of exposure to canine distemper virus and other pathogens on Santa Cruz Island, Galapagos. *Prev Vet Med.*, **123**, 128-137.

27. **Dorak MT** (2007): *Real-time PCR*, Taylor & Francis, Newcastle, p: 1-329.
28. **Elia G, Decaro N, Martella V, Cirone F, Lucente MS, Lorusso E, Di Trani L, Buonavoglia C** (2006): Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J Virol Methods.*, **136**, 171-176.
29. **Elia G, Camero M, Losurdo M, Lucente MS, Larocca V, Martella V, Decaro N, Buonavoglia C** (2015): Virological and serological findings in dogs with naturally occurring distemper. *J Virol Methods.*, **213**, 127-130.
30. **Esin E, Yavru S** (2013): Köpeklerde Canine Distemper Virus enfeksiyonunun araştırılması. *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, 1-55.
31. **Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA** (2005): *Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 1st edition, Academic Press, USA, p: 1162.
32. **Fong TT, Lipp EK** (2005): Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **69**, 357-371.
33. **Frisk AL, König M, Moritz A, Baumgartner W** (1999): Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J Clin Microbiol.*, **37**, 3634-3643.
34. **Fujita K, Miura R, Yoneda M, Shimizu F, Sato H, Muto Y, Endo Y, Tsukiyama-Kohara K, Kai C** (2007): Host range and receptor utilization of canine distemper virus analyzed by recombinant viruses: Involvement of heparin-like molecule in CDV infection. *Virology*, **359**, 324-335.
35. **Gowtage-Sequeira S, Banyard AC, Barrett T, Buczkowski H, Funk SM, Cleaveland S** (2009): Epidemiology, pathology, and genetic analysis of a canine distemper epidemic in Namibia. *Journal of wildlife diseases*, **45**, 1008-1020.
36. **Gray LK, Crawford PC, Levy JK, Dubovi EJ** (2012): Comparison of two assays for detection of antibodies against canine parvovirus and canine distemper virus in dogs admitted to a Florida animal shelter. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **240**, 1084-1087.
37. **Greene CE** (2013): *Infectious diseases of the dog and cat*, 4th edition, Saunders, p: 1376.

38. **Gröne A, Engelhardt P, Zurbriggen A** (2003): Canine distemper virus infection: proliferation of canine footpad keratinocytes. *Vet Pathol.*, **40**, 574-578.
39. **Gröne A, Doherr MG, Zurbriggen A** (2004): Canine distemper virus infection of canine footpad epidermis. *Veterinary dermatology*, **15**, 159-167.
40. **Gustavsson L, Westin J, Andersson L-M, Lindh M** (2011): Rectal swabs can be used for diagnosis of viral gastroenteritis with a multiple real-time PCR assay. *J Clin Virol.*, **51**, 279-282.
41. **Haas L, Martens W, Greiser-Wilke I, Mamaev L, Butina T, Maack D, Barrett T** (1997): Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. *Virus research*, **48**, 165-171.
42. **Harder TC, Osterhaus ADME** (1997): Canine distemper virus — A morbillivirus in search of new hosts?. *Trends in Microbiology*, **5**, 120-124.
43. **Headley SA, Sukura A** (2009): Naturally occurring systemic canine distemper virus infection in a pup. *Braz J Vet Pathol.*, **2**, 95-101.
44. **Hiscox JA** (2006): *Viruses and the Nucleus*, Wiley
45. **Hsu EC, Iorio C, Sarangi F, Khine AA, Richardson CD** (2001): CDw150 (SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology*, **279**, 9-21.
46. **Kapil S, Neel T** (2015): Canine distemper virus antigen detection in external epithelia of recently vaccinated, sick dogs by fluorescence microscopy is a valuable prognostic indicator. *J Clin Microbiol.*, **53**, 687-691.
47. **Keawcharoen J, Theamboonlers A, Jantaradsamee P, Rungsipipat A, Poovorawan Y, Oraveerakul K** (2005): Nucleotide sequence analysis of nucleocapsid protein gene of canine distemper virus isolates in Thailand. *Veterinary microbiology*, **105**, 137-142.
48. **Keeble SA** (1962): Attenuated canine distemper vaccine. *Proc R Soc MED.*, **55**, 847-849.
49. **Kennedy S, Kuiken T, Jepson PD, Deaville R, Forsyth M, Barrett T, Van de Bildt M, Osterhaus A, Eybatov T, Duck C** (2000): Mass die-Off of Caspian seals caused by canine distemper virus. *Emerging infectious diseases*, **6**, 637.

50. **Kim D, Jeoung SY, Ahn SJ, Lee JH, Pak SI, Kwon HM** (2006): Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, **68**, 877-879.
51. **Kim YH, Cho KW, Youn HY, Yoo HS, Han HR** (2001): Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *J. Vet. Sci.*, **2**, 59-63.
52. **Knipe D, Lamb R, Parks G** (2007): *Paramyxoviridae: the viruses and their replication*, 5th education, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p: 1449–1496.
53. **Krakovka S, Olsen R, Confer A, Koestner A, McCullough B** (1975): Serologic response to canine distemper viral antigens in gnotobiotic dogs infected with canine distemper virus. *The Journal of infectious diseases*, **132**, 384-392.
54. **Kubo T, Kagawa Y, Taniyama H, Hasegawa A** (2007): Distribution of Inclusion Bodies in Tissues from 100 Dogs Infected with Canine Distemper Virus. *J. Vet. Med. Sci.*, **69**, 527-529.
55. **Kubo T, Kagawa Y, Taniyama H, Hasegawa A** (2008): Retrospective serological analysis of spontaneous CDV infection in 192 dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, **70**, 475-477.
56. **Kumagai K, Yamaguchi R, Uchida K, Tateyama S** (2004): Lymphoid apoptosis in acute canine distemper. *J. Vet. Med. Sci.*, **66**, 175-181.
57. **Lan N, Yamaguchi R, Inomata A, Furuya Y, Uchida K, Sugano S, Tateyama S** (2006): Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Veterinary microbiology*, **115**, 32-42.
58. **Lan NT, Yamaguchi R, Furuya Y, Inomata A, Ngamkala S, Naganobu K, Kai K, Mochizuki M, Kobayashi Y, Uchida K, Tateyama S** (2005): Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain 007Lm, a new isolate in dogs. *Veterinary microbiology*, **110**, 197-207.
59. **Lesko J, Veber P, Dusekova E** (1993): Canine distemper virus replication in cells on microcarriers. *Acta virol.*, **37**, 412-416.
60. **Li T, Chen X, Garbutt KC, Zhou P, Zheng N** (2006): Structure of DDB1 in complex with a paramyxovirus V protein: viral hijack of a propeller cluster in ubiquitin ligase. *Cell*, **124**, 105-117.
61. **Li Z, Zhang Y, Wang H, Jin J, Li W** (2013): Sandwich-dot enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine distemper virus. *CVJR.*, **77**, 303-308.

62. **Maclachlan NJ, Dubovi EJ, Fenner F** (2016): *Fenner's veterinary virology*, 6th edition, Academic press, USA, p: 602.
63. **Mahy BW, Van Regenmortel MH** (2010): *Desk Encyclopedia Animal and Bacterial Virology*, 1st edition, Academic Press, USA, p: 646.
64. **Martella V, Cirone F, Elia G, Lorusso E, Decaro N, Campolo M, Desario C, Lucente MS, Bellacicco AL, Blixenkronne-Moller M, Carmichael LE, Buonavoglia C** (2006): Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Veterinary microbiology*, **116**, 301-309.
65. **McCarthy AJ, Shaw M-A, Goodman SJ** (2007): Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. *Proc Biol Sci.*, **274**, 3165-3174.
66. **McRee A, Wilkes RP, Dawson J, Parry R, Foggini C, Adams H, Odoi A, Kennedy MA** (2014): Serological detection of infection with canine distemper virus, canine parvovirus and canine adenovirus in communal dogs from Zimbabwe. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **85**, 1110.
67. **Müller CF, Fatzer RS, Beck K, Vandeveld M, Zurbriggen A** (1995): Studies on canine distemper virus persistence in the central nervous system. *Acta neuropathologica*, **89**, 438-445.
68. **Nelson RW, Couto CG** (2014): *Small Animal Internal Medicine*, 5th edition, Mosby, USA, p: 1504.
69. **Nermut M, Steven A** (1987): *Animal virus structure*, Vol: 3, 1st edition, USA, p: 441.
70. **Nielsen L, Sogaard M, Karlskov-Mortensen P, Jensen TH, Jensen TD, Aasted B, Blixenkronne-Moller M** (2009): Humoral and cell-mediated immune responses in DNA immunized mink challenged with wild-type canine distemper virus. *Vaccine*, **27**, 4791-4797.
71. **Nuanualsuwan S, Cliver DO** (2002): Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *J Virol Methods.*, **104**, 217-225.
72. **Origi F, Plattet P, Sattler U, Robert N, Casaubon J, Mavrot F, Pewsner M, Wu N, Giovannini S, Oevermann A** (2012): Emergence of canine distemper virus strains with modified molecular signature and enhanced neuronal tropism leading to high mortality in wild carnivores. *Veterinary pathology*, **49**, 913-929.

73. **Özkul A, Arda Sancak A, Güngör E, Burgu I** (2004): Determination and phylogenetic analysis of canine distemper virus in dogs with nervous symptoms in Turkey. *Acta Veterinaria Hungarica*, **52**, 125-132.
74. **Panzer Y, Calderon MG, Sarute N, Guasco S, Cardeillac A, Bonilla B, Hernandez M, Francia L, Bedo G, La Torre J, Perez R** (2012): Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. *Virus research*, **163**, 401-404.
75. **Pardo MC, Tanner P, Bauman J, Silver K, Fischer L** (2007): Immunization of Puppies in the Presence of Maternally Derived Antibodies Against Canine Distemper Virus. *Journal of Comparative Pathology*, **137**, 72-75.
76. **Pawar RM, Raj GD, Gopinath VP, Ashok A, Raja A** (2011): Isolation and molecular characterization of canine distemper virus from India. *Trop Anim Health Prod.*, **43**, 1617-1622.
77. **Perrone D, Bender S, Niewiesk S** (2010): A comparison of the immune responses of dogs exposed to canine distemper virus (CDV) — Differences between vaccinated and wild-type virus exposed dogs. *CJVR.*, **74**, 214-217.
78. **Priestnall SL, Mitchell JA, Walker CA, Erles K, Brownlie J** (2014): New and emerging pathogens in canine infectious respiratory disease. *Vet Pathol.*, **51**, 492-504.
79. **Richards GP** (1999): Limitations of molecular biological techniques for assessing the virological safety of foods. *J. Food Prot.*, **62**, 691-697.
80. **Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG** (2009): *Clinical virology*, 4th edition, ASM Press, Washington, p: 1489.
81. **Rima BK, Duffy N, Mitchell WJ, Summers BA, Appel MJ** (1991): Correlation between humoral immune responses and presence of virus in the CNS in dogs experimentally infected with canine distemper virus. *Arch Virol.*, **121**, 1-8.
82. **Rockborn G** (1959): An attenuated strain of canine distemper virus in tissue culture. *Nature.*, **12**, 184(Suppl 11)- 822.
83. **Sahna K, Gencay A, Atalay O** (2008): Viral aetiology of diarrhoea in puppies from a same shelter in Turkey: presence of mixed infections. *Revue Méd. Vét.*, **159**, 345.
84. **Samal SK** (2011): *The biology of paramyxoviruses*, Caister Academic Press, USA, p: x+470.

85. **Sawatsky B, Von Messling V** (2010): Canine distemper viruses expressing a hemagglutinin without N-glycans lose virulence but retain immunosuppression. *J. Virol.*, **84**, 2753-2761.
86. **Schobesberger M, Summerfield A, Doherr MG, Zurbriggen A, Griot C** (2005): Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, **104**, 33-44.
87. **Seki F, Ono N, Yamaguchi R, Yanagi Y** (2003): Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. *J. Virol.*, **77**, 9943-9950.
88. **Shin YJ, Cho KO, Cho HS, Kang SK, Kim HJ, Kim YH, Park HS, Park NY** (2004): Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. *Aust Vet J.*, **82**, 83-86.
89. **Stettler M, Beck K, Wagner A, Vandevelde M, Zurbriggen A** (1997): Determinants of persistence in canine distemper viruses. *Veterinary microbiology*, **57**, 83-93.
90. **Sugai A, Kooriyama T, Sato H, Yoneda M, Kai C** (2009): Epitope mapping of Canine distemper virus phosphoprotein by monoclonal antibodies. *Microbiology and immunology*, **53**, 667-674.
91. **Taguchi M, Namikawa K, Maruo T, Orito K, Lynch J, Sahara H** (2011): Antibody titers for canine parvovirus type-2, canine distemper virus, and canine adenovirus type-1 in adult household dogs. *Can Vet J.*, **52**, 983-986.
92. **Tan B, Wen Y-J, Wang F-X, Zhang S-Q, Wang X-D, Hu J-X, Shi X-C, Yang B-C, Chen L-Z, Cheng S-P** (2011): Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain ZJ7 isolate from domestic dogs in China. *Virol J.*, **8**, 1.
93. **Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y** (2001): Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol.*, **75**, 5842-5850.
94. **Temilade BE, Solomon OO-O, Ezekiel OO, Omezuruike OI** (2015): Seropositivity of Canine Distemper Virus (CDV) in Dogs Presenting at Abeokuta, Nigeria. *Health Research*, **5**, 109-119.
95. **von Messling V, Harder TC, Moennig V, Rautenberg P, Nolte I, Haas L** (1999): Rapid and sensitive detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.*, **37**, 1049-1056.

96. **von Messling V, Zimmer G, Herrler G, Haas L, Cattaneo R** (2001): The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J Virol.*, **75**, 6418-6427.
97. **von Messling V, Cattaneo R** (2003): N-linked glycans with similar location in the fusion protein head modulate paramyxovirus fusion. *J Virol.*, **77**, 10202-10212.
98. **von Messling V, Springfield C, Devaux P, Cattaneo R** (2003): A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J Virol.*, **77**, 12579-12591.
99. **von Messling V, Oezguen N, Zheng Q, Vongpunsawad S, Braun W, Cattaneo R** (2005): Nearby clusters of hemagglutinin residues sustain SLAM-dependent canine distemper virus entry in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol.*, **79**, 5857-5862.
100. **von Messling V, Svitek N, Cattaneo R** (2006): Receptor (SLAM (CD150)) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. *J Virol.*, **80**, 6084-6092.
101. **Waner T, Mazar S, Nachmias E, Keren-Kornblatt E, Harrus S** (2003): Evaluation of a dot ELISA kit for measuring immunoglobulin M antibodies to canine parvovirus and distemper virus. *Vet Rec.*, **152**, 588-591.
102. **Welter J, Taylor J, Tartaglia J, Paoletti E, Stephensen CB** (2000): Vaccination against canine distemper virus infection in infant ferrets with and without maternal antibody protection, using recombinant attenuated poxvirus vaccines. *J Virol.*, **74**, 6358-6367.
103. **Wiener D, Plattet P, Cherpillod P, Zipperle L, Doherr MG, Vandeveld M, Zurbriggen A** (2007): Synergistic inhibition in cell-cell fusion mediated by the matrix and nucleocapsid protein of canine distemper virus. *Virus Res.*, **129**, 145-154.
104. **Yesilbag K, Yilmaz Z, Ozkul A, Pratelli A** (2007): Aetiological role of viruses in puppies with diarrhoea. *Vet Rec.*, **161**, 169-170.
105. **Zuckerman AJ** (2009): *Principles and practice of clinical virology*, 4th edition, John Wiley&Sons, Ltd, p: 1-889.

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Kararı

MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
09.03.2016	28	174

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 09 MART 2016 tarihinde Saat 15.30'da toplanarak aşağıdaki kararları almıştır:

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Mehmet KALE'nin yürütücü ve Arş. Gör. Hasbi Sait SALTIK'ın yardımcı araştırmacı olarak görev aldığı "Klinik Semptomlu Köpeklerden Elde Edilen Kan, İdrar, Rektal Sürüntü, Nasal ve Okular Akıntı Örneklerinde Canine Distemper Virus enfeksiyonunun Real Time RT-PCR ile Araştırılması" başlıklı çalışma,

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Köpek (<i>Canis familiaris</i>)	D+E	50	1 yaş ve altı

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından oy birliği ile UYGUN görülmüştür.

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN BAŞKAN	Doç. Dr. Tülay İLERİ BÜYÜKOĞLU BAŞKAN YARDIMCISI	Doç. Dr. Asım KART ÜYE
		
Doç. Dr. Dilek ÖZTÜRK ÜYE	Doç. Dr. Deniz İNNAL ÜYE	Yard.Doç. Dr. Yusuf Sinan SİRİN ÜYE
		
Yard. Doç. Dr. Savaş Volkan GENÇ ÜYE	İbrahim MORALIOĞLU ÜYE	Ömer ONGUN ÜYE
		

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Hasbi Sait SALTİK

Doğum Yeri ve YILI : SAMSUN – 1987

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce



Eğitim Durumu

Lise : Samsun Tülay Başaran Anadolu Lisesi, 2005

Lisans : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2012

Çalıştığı Kurum: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, 2012 - ...

Yayınları

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler (SCI):

1. HASIRCIOGLU S, Özmen Ö, Kale M, Saltık HS (2017). Pestivirus infections in kids of wild goats (*Capra hircus aegagrus*). *Indian Journal of Animal Research*, 51(4), 752-755.

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. SALTİK HS, Kale M. Mavidil Virus Hastalığı (Bluetongue Virus Disease). 5(1): 32-44, 2017.
2. KALE M, Yıldırım Y, Avcı O, Şahinduran Ş, Hasırcıoğlu S, Saltık HS, Sevgisunar NS. Burdur Yöresindeki Gastroenteritisli Köpeklerde Canine Parvovirus Enfeksiyonunun Virolojik Araştırılması. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* 12(3): 315-319, 2017.
3. SÖKEL S, Kale M, Hasırcıoğlu S, Yıldırım Y, Saltık HS (2016). Zika Virus. 3(36): 52-56, 2016.
4. SALTİK HS, Kale M. Mers Virusü. *Ayrıntı Dergisi* 3(22): 53-58, 2015.
5. SALTİK HS, Kale M, Hasırcıoğlu S. Ebola Virus Hastalığı. *Ayrıntı Dergisi*, 2(20): 36-40, 2014.
6. SALTİK HS, Kale M, Hasırcıoğlu S, Yavru S. Schmallenberg Virus. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.* 1(2):106-116, 2013.