



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



GASTROENTERİTİS SEMPTOMLU KÖPEKLERDE
CANİNE PARVOVİRUS TİP 2'NİN TESPİTİ VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

Sepandar GARGARİ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet Taner KARAOĞLU

2015-ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GASTROENTERİTİS SEMPTOMLU KÖPEKLERDE
CANİNE PARVOVİRUS TİP 2'NİN TESPİTİ VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

Sepandar GARGARI

VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet Taner KARAOĞLU

Bu tez Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından
BAP-13L3338007 proje numarası ile desteklenmiştir.

2015-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Viroloji Doktora Programı

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11/09/2015

Prof. Dr. Yılmaz AKÇA

Ankara Üniversitesi

Jüri başkanı

Prof. Dr. Hakan YARDIMCI

Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Mehmet ÇABALAR

Harran Üniversitesi

Prof. Dr. Mehmet Taner KARAOĞLU

Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Soydal ATASEVEN

Mustafa Kemal Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	1
1.2. Etiyoloji	2
1.3. Yapısal ve Yapısal Olmayan Proteinler	4
1.4. Döner saç tokası (Rolling-hairpin) mekanizması	6
1.5. Köpek parvovirus tip-2'nin kökeni ve evrimi	10
1.6. Konakçı aralığı ve patojenik potansiyeli	12
1.7. Patogenez, patoloji ve immunoloji	14
1.8. Klinik Belirtiler	19
1.9. Tanı ve ayırıcı tanı	20
1.9.1. Klasik yöntemler	20
1.9.2. Moleküler yöntemler	22
1.10. Nekropsi	23
1.11. Tedavi	24
1.12. Korunma	24
1.13. Tezin Amacı ve Önemi	28
2. GEREÇ VE YÖNTEM	29
2.1. Gereç	29
2.1.1. Örneklenen hayvanlar ve numuneler	29
2.1.2. Hücre kültürü	31

2.2. Yöntem	32
2.2.1. Örneklerin hazırlanması	32
2.2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)'da kullanılacak örneklerin DNA Ekstraksiyonu	33
2.2.3. Primer çifti ve Polymerase Chain Reaction (PCR)	34
2.2.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi	35
2.2.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	36
2.2.6. Sekans ve filogenetik analiz	37
2.2.7. Virus İzolasyonu	38
2.2.8. Direkt İmmunofloresan (IF) Testi	39
3. ANALİZ ve BULGULAR	40
3.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)	40
3.2. Sekans ve filogenetik değerlendirme	43
3.3. Virus izolasyonu	51
3.4. Direkt IF testi	53
4. TARTIŞMA	55
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
6. GELECEĞE İLİŞKİN ÖNGÖRÜLEN KATKILAR	63
ÖZET	64
SUMMARY	65
KAYNAKLAR	66
EK-1: Örneklerin yeni nesil sekans İGV programıyla görüntüsü ve fasta formatlarındaki dizinleri	89
EK-2: Hayvan deneyleri yerel etik kurulu kararı	104
ÖZGEÇMİŞ	106

ÖNSÖZ

Parvoviruslar insanlarda ve hayvanlarda farklı hastalıklara ve enfeksiyonlara neden olan önemli viral etkenlerdir. Canine parvovirus enfeksiyonu, dünyada köpeklerde yaygın olarak görülebilen bulaşıcı hastalıklardan birisidir. Canine parvovirus enfeksiyonu ilk kez 1970'li yıllarda 4-8 haftalık köpek yavrularında bildirilmiş, daha sonra dünyanın pek çok bölgesinde (Appel ve ark., 1979; Morais ve ark., 2007) ve Türkiye'de hastalık tanımlanmıştır. Dünyada yaygın olarak görülen ve Türkiye'de varlığı 1970'li yılların sonlarından itibaren tespit edilen enfeksiyon köpeklerde akut, fibrinli, nekrotik veya hemorajik enteritis ile seyreden bulaşıcı, viral bir enfeksiyondur (Appel ve ark., 1979). Hastalıkta parvoviral enteritis alışlagelen form olmakla birlikte, özellikle yeni doğan köpek yavrularında non-suppuratif myokarditis ile karakterize myokardiyal form da görülebilmekte, dört-sekiz haftalık köpek yavrularında gözlenen kalp formunda, ani ölümler şekillenebilmektedir (Kelly 1978; Carmichael 1994).

Dünyada ve Türkiye'de varlığı bilinen canine parvovirusun bu çalışma ile gastroenteritisli köpeklerde tesbiti ve VP2 gen bölgesi düzeyinde moleküler karakterizasyonunun yapılması hedeflenmiş, ayrıca sirküle olan virusa yönelik veriler elde edilmiştir. Bu çalışmada ilk kez enfeksiyona sebep olan virusun hücre kültüründe izolasyonu da gerçekleştirilmiştir. Sahada sirküle olan virusun izolasyonu ile birlikte serolojik temelli testlerde kullanılacak virusun elde edilmesi gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda hastalığın serolojisine yönelik çalışmaların yapılabilir hale gelmesinin de önü açılmıştır.

Bu çalışma süresince özveri, sabır ve yapıcı eleştirilerinden dolayı, danışman hocam Prof. Dr. Mehmet Taner KARAOĞLU' na, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nın tüm olanaklarından faydalanmamı sağlayan Prof. Dr. İbrahim BURGU'ya, Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yılmaz AKÇA'ya, tez çalışmam süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen, Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr Feray ALKAN'a, Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a, Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP'e ve Prof. Dr. Tuba Çiğdem OĞUZOĞLU'na ve tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. Hakan YARDIMCI'ya, doktora programım boyunca birlikte çalıştığım doktora öğrencisi ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma, her zaman destek ve anlayışları için aileme ve eşim Mona'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	Adenozin Trifosfat
BCL2	B Cell CLL/Lymphoma (Apoptosis Regulator)
Bp	Base pair
BVDV	Bovine Viral Diarrhea Virus
Caspases	Cysteine aspartic proteases or cysteine dependent aspartate directed proteases
CMV	Canine Minute Virus
CPE	Cytopathic Effect
CPV	Canine Parvovirus
CRFK	Crandell Rees Feline Kidney
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoksinukleotid Triphosphat
dsDNA	Double stranded Deoxyribonucleic acid
DΨm	Depolarization of The Mitochondrial Transmembrane Potential
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
ELISA	Enzyme linked Immuno Sorbent Assay
ERK	Extracellular signal Regulated Kinases
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate

FPV	Feline Panleukopenia Virus
HI	Hemagglutination Inhibition
IC	Immunochromatography
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IF	Immunofluorescence
KD	Kilodalton
μl	Mikrolitre
MgCl ₂	Magnesium Chlorur
MLV	Modified Live Virus
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NSp	Non Structural Protein
OD	Optical density
ORF	Open Reading Frame
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
ssDNA	Single stranded Deoxyribonucleic Acid
TAE	Tris Asetat Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
Taq	Thermus aquaticus
TfRs	Transferin Reseptors
VI	Virus Isolation
WPBS	White Phosphate Buffered Saline
WRC	Walter Reed Canine Cell Culture

ŞEKİLLER

Şekil 1.1: Köpek Parvovirus X Ray kristalografisi	3
Şekil 1.2: Döner saç tokası (Rolling-hairpin) mekanizması	7
Şekil 1.3: Köpek parvovirusun farklı antijenik varyantlarının Avrupa'da dağılımı	11
Şekil 1.4: Mitokondrilerin immunfloresan mikroskop görüntüsü	17
Şekil 1.5: CPV ile enfekte olan mitokondri morfolojisi	18
Şekil 1.6: Maternal antikor titresinin zamanla bağlantısı	25
Şekil 1.7: Maksimum immun yanıt için aşılama önerisi	27
Şekil 3.1: PCR ürünlerinin elektoroforez görüntüsü	40
Şekil 3.2: Araştırmada elde edilen 15 olguya ait VP2 geni düzeyinde nükleotid dizilerinin karşılaştırılması	44
Şekil 3.3: Araştırmada elde edilen 15 olguya ait VP2 geni düzeyinde amino asit dizilerinin karşılaştırılması	48
Şekil 3.4: Araştırmada saptanan dizinlerin VP2 bölgesi yönünden Neighbour joining metodu ile filogenetik analizi	50
Şekil 3.5: CRFK hücre kültüründe CPE gösteren izolatlar	53
Şekil 3.6: CRFK hücre kültüründe CPE gösteren izolatların direkt IF testi ile canine parvovirus-2 olarak doğrulanması	54

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1: Parvovirus sınıflandırması	4
Çizelge 1.2: Köpek parvovirus'un farklı tipleri ve kedi FLP'de, VP2 bölgesinde saptanan değişiklikler	10
Çizelge 2.1: Araştırmada kullanılan örneklerin dağılımı	29
Çizelge 2.2: Araştırmada örneklenen hayvanların yaş dağılımı	30
Çizelge 2.3: Araştırma kapsamında olan hayvanlardaki klinik bulgular	30
Çizelge 2.4: VP-1 ve VP-2 genine yönelik olarak kullanılan primer çifti	35
Çizelge 2.5: Hücre kültürü izolasyon doğrulanması için kullanılan PCR primerleri	39
Çizelge 3.1: PCR pozitif örneklerin dağılımı	41
Çizelge 3.2: Çalışmada pozitif olguların yaş dağılımı	41
Çizelge 3.3: Çalışmada pozitif olguların dağılımının klinik tanı ile bağlantısı	42
Çizelge 3.4: Örnekleme tarihleri	42
Çizelge 3.5: CRFK hücre kültüründe izolasyon çalışması sonuçları	52

1.GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Köpeklerin minute virusu (CMV) ya da köpek parvovirus type-1 (CPV-1) ilk kez 1967 yılında sağlıklı köpeklerin dışkılarından izole edilmiş ve bu virus günümüzdeki köpek parvovirusundan (CPV-2) farklı olarak tanımlanmıştır (Binn ve ark., 1970).

CPV-2 antijenik olarak CPV-1'den farklıdır ve dünyada pandemik şekilde köpeklerde hemorajik enteritislere ve myokarditlere sebep olmaktadır (Carmichael 1999; Mochizuki ve ark, 2002).

Sadece yavru köpeklerin CMV ile enfeksiyona duyarlı olduğu bilinmektedir. Duyarlı yavrular doğal oro-nasal yol ile enfekte olurlar. Bunun dışında direkt bulaşma söz konusu değildir. (Carmichael ve ark., 1999). CPV-1 yavru köpeklerde hafif seyirli enteritislere, lenfadenitlere ve pnömonilere sebep olabilmektedir (Mochizuki ve ark., 2002; Pratelli ve ark., 1999; Hashimoto ve ark., 2001). İsviçre'de 1996 yılında yenidoğan köpeklerde solunum sistemi problemleri olan köpeklerde CPV-1 tespit edilmiştir (Jarplid ve ark., 1996).

Canine parvovirus-2 ilk kez 1978 yılında Amerika'da ortaya çıkmıştır (Apple ve ark., 1979) ve CPV tip 2 (CPV-2) olarak adlandırılmıştır. CPV-2'nin ortaya çıkışından sonra çok hızlı bir şekilde tüm dünya'da görülmüş ve CPV virüsü endemik bir şekilde evcil ve vahşi köpek popülasyonu için önem kazanmıştır (Parrish

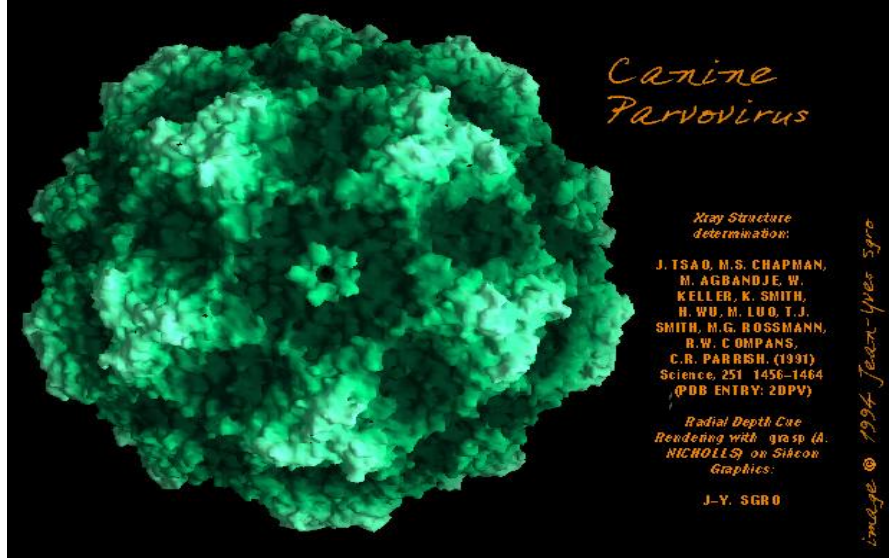
ve ark., 1988). CPV izolatlarının monoklonal antikor ve enzimler yardımıyla analizi sonucunda CPV'nin yeni antijenik özelliklerini taşıyan bir suş (CPV-2a) 1979'lu yıllarda Amerika'da ortaya çıkmış ve 1980-1981 yıllarında da sürekli rastlanmıştır (Parrish ve ark., 1985). Köpeklerden izole edilmiş viruslar üzerinde daha sonraki yıllarda yapılan araştırma sonucunda, başka bir antijenik variant, CPV-2b 1984'de ortaya çıkmış ve 1986 yılında Amerika'nın birçok bölgesinde CPV-2a'nın yerini almıştır (Parrish ve ark., 1991). Daha sonraki yıllarda İtalya'da CPV-2c ilk kez görülmüştür (Buonavoglia ark., 2001). CPV-2'nin aynı şekilde yayılması ve yeni antijenik varyantların ortaya çıkması Danimarka, Almanya, Fransa, İspanya, Japonya, Avustralya ve Afrika'da da tespit edilmiştir. Ancak bu bölgelerde CPV-2a, CPV-2b ve CPV-2c'lerin varlığı birbiriyle farklılık göstermektedir (Parrish ve ark., 1988; Mochizuki ve ark., 1993; Ybanez ve ark., 1995; Truyen ve ark., 1996; Buonavoglia ve ark., 2001; Steinel ve ark., 1998). Çin'de ise CPV enfeksiyonu ilk kez 1982 yılında sporadik vakalar şeklinde görülmüştür (Yanbing ve ark., 2013).

1.2. Etiyoloji

Etken parvoviridae familyasında, parvovirinae alt familyası içinde parvovirus cinsinde yer alan 21 virus türünden biri olup (Anonim¹: [http://www.ictvonline.org/virus Taxonomy.asp](http://www.ictvonline.org/virus_Taxonomy.asp)) canine parvovirus olarak isimlendirilmektedir.

Etken lipoprotein yapıda, zarfsız, DNA taşıyan, tek iplikçikli, negatif polariteli, 52Kb uzunluğunda bir virustur. Kapsid 26 nm ikosahedral simetriye sahiptir (Reed ve ark., 1988). Feline panleukopenia ve mink enteritis virusu ile antijenik olarak ilişkilidir. CPV virusu ilk kez, kedi hücre kültüründen izole edilmiştir (Kelly ve ark., 1978; Apple ve ark., 1979; Burtonboy ve ark., 1979;

Johnson ve ark., 1979). Bu izole edilen virus köpek parvovirus tip-2 olarak adlandırılmıştır, çünkü genetik olarak CMV ya da köpek parvovirus tip-1'den farklıdır (Carmichael ve ark., 1981; Carmichael ve ark., 1994).



Şekil 1.1: Köpek Parvovirus X Ray kristalografisi (Anonim²: https://web.stanford.edu/group/virus/parvo/2000/cat-dog_parvovirus.html)

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) tarafından bildirilen taksonomiye göre parvoviridae familyası (00.050) Parvovirinae (00.050.1) ve Densovirinae (00.050.2) olarak 2 alt familyaya ayrılmaktadır (Anonim²: http://ictvdb.bio-mirror.cn/Ictv/fs_parvo.htm).

Parvovirinae alt familyası, parvovirus (00.050.1.01), Erythrovirus (00.050.1.02), Dependovirus (00.050.1.03), Amdovirus (00.050.1.04) ve Bocavirus (00.050.1.05) cinslerine ve Densovirinae familyası (00.050.2), Densovirus (00.050.2.01), Iteravirus (00.050.2.02), Bredivensovirus (00.050.2.03), Pefudensovirus (00.050.2.04) ve tanımlanmamış türler (00.050.2.00) cinslerine ayrılmaktadır. Köpek parvovirusu (00.050.1.01.007.00.005), Parvovirinae alt

familyasında (00.050.1), parvovirus cinsinde (00.050.1.01) yer almaktadır (Anonim³: http://ictvdb.bio-mirror.cn/Ictv/fs_parvo.htm. Tattersall ve ark., 2005).

Cins	Alt cins	Konakçı aralığı
Parvovirinae		
Parvovirus	Mice minute virus	Vertebrates
Erythrovirus	B19 virus	Vertebrates
Dependovirus	Adeno-associated virus	Vertebrates
Densovirinae		
Densovirus	Junonia coenia densovirus	Invertebrates
Iteravirus	Bombyx mori densovirus	Invertebrates
Contravirus	Aedes aegypti densovirus	Invertebrates

Çizelge 1.1:Parvovirus sınıflandırması
(Anonim⁴: <http://www.mcb.uct.ac.za/cann/335/Parvoviruses.html>)

Parvoviruslar 255~Å çapındadır ve moleküler ağırlığı 5.5×10^3 ile 6.2×10^3 KDa arasında değişmektedir (Tattersall ve ark., 1990). Köpek parvovirusu, kedi ve minkten hazırlanan hücre kültürlerinde üreyebilmekte, ayrıca köpek hücrelerinde etkili bir şekilde enfeksiyona neden olabilmektedir (Parrish, 1992).

1.3. Yapısal ve Yapısal Olmayan Proteinler

Enfeksiyöz köpek parvovirus virionlarında protein türleri ratta olduğu gibi temel olarak VP proteinleri (yapısal proteinler) ve NS proteinleri (yapısal olmayanlar)'den oluşmaktadır. VP proteinleri sağ taraftaki transkripsiyon ünitesinden ve NS proteinleri sol taraftaki transkripsiyon ünitesinden oluşmaktadır (Reed ve ark., 1988). VP proteinleri VP-1, VP-2 ve VP-3'den oluşmaktadır. VP-1 ve VP-2 proteinleri

viral DNA'dan alternatif yöntemle yapılan messenger RNA'nın ürünleridir (Jongeneel ve ark., 1986). VP-3 proteini ise tüm DNA'da, kapsit kısmında (cleavage) 15-20 amino asitten oluşmaktadır ve bu da temel olarak VP-2'den köken almaktadır. VP-3 proteini VP-2 proteinin bir kısmı olduğu söylenebilmektedir. Kapsitin tamamı 60 kopya sayısı VP-2, VP-3 ve az miktarda VP-1 den oluşmuştur, bu da bu virusun Caspar ve Klug (1962'de) tarafından söylendiği gibi ikosahedral simetriye sahip olmasına sebep olmuştur (Caspar 1984, Muzyczka ve ark., 2001).

Virusun *invivo* ve *invitro* koşullarda yayılması sonucunda boş virus partikülleri üretilmesine sebep olmakta (%50) ve bu partiküllerde çok miktarda VP-2 ve kısmen VP-1 görülürken, VP-3 proteini ise görülmemektedir. VP-1 ve VP-2 proteinleri bu boş partiküllerde tripsine dayanıklıdır. Tam partiküllerin (enfeksiyöz) son kısmında az miktarda VP-3 görülmektedir. Tam partikülde *invitro* sistemlerde fazla VP-2'ler tripsin muamelesiyle VP-3'e dönüşmektedir (Clinton 1976, Tattersall 1977, Muzyczka ve ark., 2001). Bu da VP-2 proteininin amino terminalinin boş partikülde içeride ve tam partikülde ise dışarıda yer aldığını göstermektedir.

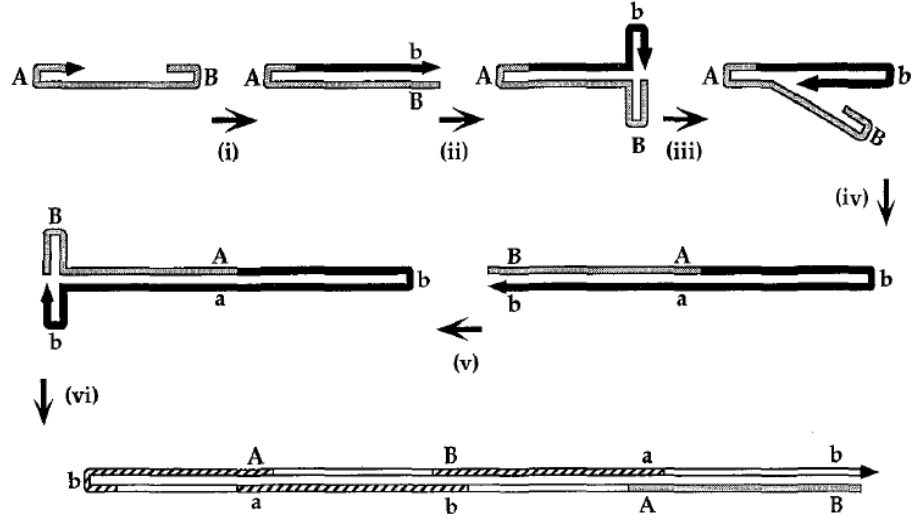
Ayrıca bu yapısal olan proteinlerin yanında (VP proteinleri) virusun DNA genomu iki adet yapısal olmayan proteini de (NS1 ve NS2) kodlamaktadır. NS1 proteini kovalent bağ yardımıyla yeni sentezlenmiş DNA'nın 5' ucuna bağlanır ve virusun paketlenmesi sırasında viral kapsitin dış kısmında yer almaktadır (Cotmore, 1989). Ancak enfeksiyonun daha sonraki aşamalarında bu bağlantı hücre dışı nükleazlar tarafından bozulur. Tüm genomun sekansı yapılmış olan bir adeno virus ilişkili parvovirus ile köpek parvovirusu arasındaki önemli bir fark, köpek parvovirusunda VP 2 bölgesinin glisin (GSGNGSGGGGGGGSGGVG) yönünden zengin olduğunu ortaya koymuştur (Ranz ve ark., 1989; Rhode 1985; Reed ve ark., 1989).

Yapısal olmayan proteinler içinde sadece NS1 proteini CPV’da gerekli olan proteindir (Wang ve ark., 1998). Viral genomun replikasyonu ve viral proteinlerin üretiminde NS1 gerekli ve önemli bir faktördür. N-terminal ve helikal domain de NS1 de bu işlemler için önemli olan kısımlardır. Buna ek olarak NS1’in C ve N terminal kısımları CPV promotorunun (P38) aktive olması için gereklidir (Einari ve ark., 2013). Her iki yapısal ve yapısal olmayan proteinler için ORF aynı DNA zincirinde yer almaktadır. Genom döner saç tokası (rolling-hairpin) mekanizması yolu ile replike olmaktadır (Anonim⁵: <http://viralzone.expasy.org/all>).

1.4. Döner saç tokası (Rolling-hairpin) mekanizması

Parvoviral DNA replikasyonu, pek çok yönden daha önce karakterize edilen tek iplikçikli kolifaj ve bazı bakteriyal plasmidlerdeki tek iplikçik spesifik Rolling circle mekanizmasına benzer (Kornberf, 1991). Viral parçacıklar, ilk işlem olarak ikiye kopyalanan sırasız linear DNA genomunun tek bir kopyasını içerir. Viral DNA’daki nispeten daha uzun olan tek iplikçikli kodlama bölgesi saç tokası dubleks katlanabilen kısa (121–412 base) palindromik terminal sekanslar tarafından kesilir. Bu telomerler viral replikasyonda önemli bir rol oynarlar, replikasyon ve inkapsidasyon için gerekli cis-acting bilgisinin çoğunu taşırlar ve kompleksiteleri ve farklı viral genlerde farklı şekilde bulunmaları, yaşam döngüsünde pek çok göreve sahip olabileceklerinin göstergesidir (Tjissen 1990, Berns ve ark., 1995). Saç tokaları, içeri giren virion DNA’sının terminal 3’ nükleotidi ile bir internal bazı eşler, böylece konakçı polimeraz enzimi ilk tamamlayıcı DNA iplikçliğini sentezlemesine izin veren bir DNA primerinin oluşmasına yardımcı olur. Ökaryotik replikasyon için olağandışı bir durum olsa da, tek iplikçikli çentikler ile eşlenen DNA primerlerinin yaratılması prokaryotik Rolling circle mekanizmalarının ayırıcı bir özelliğidir. Parvovirusların palindromik terminal sekansları bu mekanizmanın linear tek iplikçikli progeny DNA’ya uyarlanmasını sağlar. Daha önceki bir konak hücrede

bölge spesifik çentik serbest 3' hidroksil grubu geri katlanarak progeny viral genomdaki internal bir bazla eşleşir.



Şekil 1.2: Döner saç tokası (Rolling-hairpin) mekanizması

Bazı virüslerde (örn. AAV2), bu çapraz bağlantılı 3' yapısının oluşturduğu replikasyon orijini terminal çözünme adı verilen bir işlemde Rep öncü endonükleaz ile aktive edilebilir. Bazılarında ise, örneğin MVM, bu yapı replikasyon orijini olarak işlev görmez. İki durumda da viral DNA amplifikasyon işlemi rolling hairpin sentezi olarak adlandırılan tek yönlü, tek iplikçik spesifik mekanizma ile bir seri konkatemerik çiftlenmeler sayesinde ilerler. Prokaryotik rolling circle sistemlerdeki gibi sirküler kalıp etrafında devam etmek yerine, rolling hairpin sentezinde tek yönlü replikasyon geriye dönüp linear genomun üzerinden devam etmekte, sekansa göre ve palindromik viral terminallerin düzenlenmesi nedeniyle yön değiştirmektedir. Güncel modeller bu işlem sırasında terminal saç tokalarının önce açılıp iplikçik yer değişimi ile kopyalanarak yeni bir tek DNA iplikçığı içeren uzamış form terminalleri elde ettiğini, daha sonra bunların daha fazla linear sekans sentezi için gerekli 3' nükleotidleri sağlamak için eriyerek, yeni saç tokası tavşan kulağı yapıları oluşturduğunu öne sürmektedir. Sonuç olarak, virusun kodlama sekansları terminallerden iki kat daha sık kopyalanır ve palindromik dimerik ve tetramerik konkatemerler içlerindeki dubleks genomlar sol uç: sol uç, sağ uç: sağ uç şeklinde birleştikçe çoğalır.

Parvovirusun genomu konakçı hücre çekirdeğinde çıplak olur. Hücre mitoz bölünmesinin S fazında konakçı hücrenin replikasyon organelleri, viral genomun ters terminal tarafından replike olmasına yardımcı olur. İlk olarak tek sarmallı virus DNA'sı (ss DNA), kovalent çift sarmalı (ds DNA) replikatif forma dönüşür. Daha sonra NS1 proteini üretilmesi başlar ve bu protein viral genom replikasyonunu kontrol eder. NS1 76.7-kDa ağırlığında çok fonksiyonlu nükleer bir fosfo-proteindir ve virusun yaşam döngüsünde önemli bir rol almaktadır. Parvoviral NS1 proteinleri, SF3 süperfamilya helikaz proteinleri altındadır (Gorbalenya 1993; Gorbalenya 1990). Korunmuş bir ATP bağlanma yeri bu helikaz domainde, polipeptid zincirinin ortalarında yer almaktadır (Wilson ve ark., 1991). Replikasyon bağlanma helikaz domainin N terminali, ve promotor helikaz domainin C terminalinin transaktivasyonudur (Legendre ve ark., 1994; Mouw ve ark., 1998). NS1 bir çok fonksiyonları DNA etkileşimlerine bağımlıdır. Viral replikasyon, iki (ORI) replikasyon bağlanma yapılmasına sebep olur. Bunlar, genomun sol tarafından (OriL) ve genomun sağ (OriR) tarafından yapılmaktadır. Spesifik sekans analizinde, bu iki komplekste, NS1 dsDNA'ya yapışmaktadır. Bu endojen proteinler üç parçalı kompleksler oluşturur: OriL'deki glikokortikoid modülatör eleman bağlayıcı proteinler ve OriR'deki yüksek hareketli grup proteinleridir. İki durum da dsDNA genomunun iplikçik ve bölge spesifik bağlamda işaretlenmesine ve NS1'in oluşan 5' ucuna kovalent bağlanmasına yol açar (Christensen ve ark., 1997; Cotmore ve ark., 1998).

Parvovirus sadece mitoz bölünmenin S fazında bulunan konakçı hücrelerde replike olabilir (Cotmore ve ark., 1987) ve bu nedenle in vivo olarak hedef organları aktif olarak bölünen hücreler oluşturur. Birincil viral replikasyon, viral partiküllerin orofarenkse girmesinden hemen sonra, farengial lenfoid dokularda başlar. Kan akışıyla virus bu lenfoid dokulardan, canlının başka organlarına ve dokularına yayılır. Mitoz bölünmenin, S fazındaki uygun reseptöre sahip hücreler enfekte edilir. Ökaryot hücre siklusu M (mitoz) G₁, S ve G₂ fazlarından oluşmaktadır. Bu süreçte hücre uyarımı ve büyüme meydana gelir. Hücre siklusunda G₁-S geçişinde, G₂-M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde kontrol noktaları bulunmaktadır (Cabadak,

2008). Sürekli bölünen hücrelerde mitozdan sonra siklus G_1 -S- G_2 (interfaz) ve M (mitoz) şeklinde tekrarlanır. G_1 , S, G_2 fazları (interfaz) hücre siklusunun % 90'ını kapsar ve 16-24 saat sürer. Mitoz bölünme ise 1-2 saat sürmektedir. G_1 fazında hücreler kendi çevrelerini kontrol eder, sinyalleri alır ve büyümeyi indükler. Bu fazda DNA sentezi (replikasyonu) için hazırlık yapılır. RNA ve protein sentezi olur. S fazında ise DNA sentezlendikten sonra, G_2 fazında hücre büyümeye devam eder aynı zamanda RNA sentezi ve protein sentezinden sonra hücre mitozu hazırlanır. S fazı ise 2-6 saat arasında değişmektedir (Lodish ve ark., 2000; Bellamy 1996; Vermeulen ve ark 2003). S fazının önemini aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

- 1-DNA' nın eşlendiği ve kromatin sayısının iki katına çıktığı evredir.
- 2-Protein sentezinin en yoğun şekilde gerçekleştiği evredir.
- 3-Sentrozomların eşleşmesi emri bu evrede verilir.
- 4-Bu evrenin sonunda hücrenin kromozom yapısı $2n4c$ dir (takım sayısı 2, kromatid sayısı 4) (Vermeulen ve ark 2003).

CPV'nin konakçı hücreye girişinin bir kısmının belli olduğu bilinmektedir. CPV konakçı hücreler yüzeyindeki siyalik asit reseptörüne bağlanmaktadır. CPV kapsidinin hücreye girişi kaladrin aracılığıyla endositoz yoluyla gerçekleşir (Parker ve ark., 2000). Hücreye endositoz ile girdikten sonra kapsitler sitoplazmaya yavaş bir şekilde penatre olurlar. Hücrelerin sitoplazmasına verilen antikapsit antikorları virus inokulasyonundan 6 saat sonraya kadar bile hücreyi enfeksiyondan koruyabilmektedir; bu durum kapsitlerin hücreye alındıktan sonra endositik kompartmanlarda birkaç saat boyunca kaldığını göstermektedir (Vihinen-Ranta ve ark., 2000). CPV insan, kedi ve köpek transferin reseptörlerini (TfRs) kullanarak hücrelere girebilir ve enfeksiyona sebep olabilir (John ve ark., 2001).

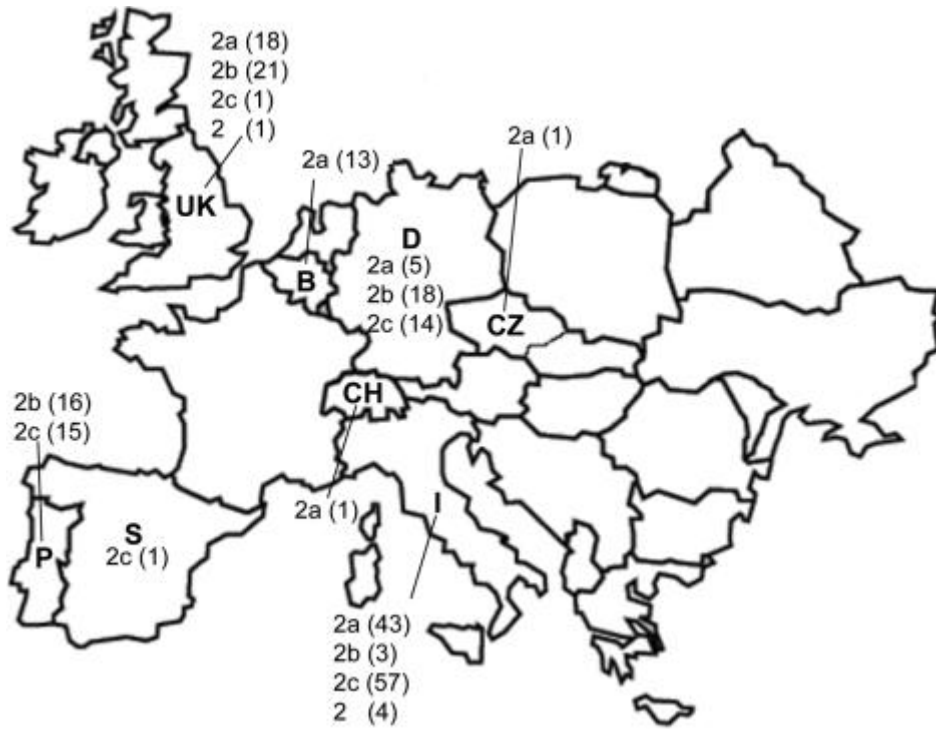
1.5. Köpek parvovirus tip-2'nin kökeni ve evrimi

1970'lı yılların sonunda CPV köpeklerde patojen ajan olarak ortaya çıkmıştır ve bu virusun FPV'den ya da FPV'ye benzer bir etçil parvovirustan ayrıldığı öne sürülmektedir. Gerçi bu hipotez için kesin bir kanıt yoktur ama bu virusun kediler, köpekler ve başka carnivor türleri arasında sirküle olması, CPV-2'nin evriminin ve ortaya çıkışının anlaşılmasını kolaylaştırmaktadır (Truyen, 2006). Bu yeni ortaya çıkan CPV-2 tipi, daha önce tanımlanan CPV-1'den farklıdır (Truyen, 2006). FPV ve CPV-2 arasında 6 ya da 7 amino asitte farklılık tespit edilmiştir, CPV-2a ve CPV-2b'de 5 ya da 6 amino asitte farklılık görülmektedir (Çizelge 1.2) (Decaro ve ark., 2012). Bu değişiklikler VP-2 proteininde meydana gelmektedir ve VP-2 domaini konak hücre transferin reseptörü (TfR) ile birleşmektedir. Bu meydana gelen değişiklikler bu virusun köpeklerde transferin reseptörüne, FPV'ye ya da FPV benzeri carnivorlardaki virüslara bağlanmasına yardımcı olur (Shackelton ve ark., 2005). CPV'nin FPV'ye göre başka bir önemli farkı da, bu virusun FPV'ye göre çok daha hızlı gelişmesidir (Battilani ve ark., 2006; Decaro ve ark., 2008 c; Decaro ve ark., 2009 b).

Aa kalıntısı	80	87	93	101 ^b	103	232	297	300	305	323	375	426 ^c	555	564	568
Nt pozisyonu	3024-3026	3045-3047	3063-3065	3087-3089	3093-3095	3480-3482	3675-3677	3684-3686	3699-3701	3753-3755	3909-3911	4062-4064	4449-4451	4476-4478	4488-4490
Gözlenen kodon	AAA (Lys) AGA (Arg)	ATG (Met) TTG (Leu)	AAA (Lys) AAC (Asn) AAT (Asn)	ATT (Ile) ACT (Thr)	GUA (Val) GCA (Ala)	GTA (Val) ATA (Ile)	TCT (Ser) GCT (Ala)	GCT (Ala) GGT (Gly)	GAT (Asp) TAT (Tyr)	GAC (Asp) AAC (Asn)	AAT (Asn) GAT (Asp)	AAT (Asn) GAT (Asp)	GTA (Val) ATA (Ile) GAA (Glu)	AAT (Asn) AGT (Ser)	GCT (Ala) GGT (Gly)
FPV	Lys	Met	Lys	Ile	Val	Val	Ser	Ala	Asp	Asp	Asp	Asn	Val	Asn	Ala
CPV-2	Arg	Met	Asn	Ile	Ala	Ile	Ser	Ala	Asp	Asn	Asn	Asn	Val	Ser	Gly
CPV-2a	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ser	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asn	Ile	Ser	Gly
CPV-2b	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ser	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asn	Val	Ser	Gly
New CPV-2a	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asn	Val	Ser	Gly
New CPV-2b	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asp	Val	Ser	Gly
Asp-300 (2a/2b)	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ala	Asp	Tyr	Asn	Asp	Asn (2a) Asp (2b)	Val	Ser	Gly
CPV-2c	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Glu	Val	Ser	Gly

Çizelge 1.2: Köpek parvovirusun farklı tipleri ve kedi FLP'de, VP2 bölgesinde saptanan değişiklikler (Decaro ve ark., 2012).

CPV-2'den ayrılan, CPV-2a ve CPV-2b antijenik varyantları yaygın olarak Dünyada görülmektedir (Truyen, 2006). CPV'un üçüncü antijenik varyantı CPV-2c, ilk başta Glu-426'ncı amino asidin mutantı adıyla, ilk kez 2000 yılında İtalya'da görülmüştür (Buonavoglia ve ark., 2000). CPV-2'nin son antijenik varyantı CPV-2c, CPV-2'nin diğer tipleriyle (2-a ve 2-b) beraber İtalya'da sirküle olduğu görülmüştür (Martella ve ark., 2004; Decaro ve ark., 2006).



Şekil 1.3: Köpek parvovirusun farklı antijenik varyantlarının Avrupa'da dağılımı. Farklı Avrupa ülkelerinden, CPV pozitif dışkı örnekleri veya viral izolatlardan moleküler yöntemlerle tanımlanması, (CPV-2, 2a, 2b veya 2c). Parantez içerisindeki rakamlar farklı ülkelerden tespit edilen CPV varyantlarının sayısını göstermektedir. Veriler 2005-2006 yıllarına aittir (İtalya 2006 ve Almanya 1996-2005 hariç). UK: İngiltere, B: Belçika, D: Almanya, CH: İsviçre, S: İspanya, P: Portekiz, CZ: Çek cumhuriyeti ve I: İtalya. (Decaro ve ark., 2007)

Ayrıca, CPV-2c Nakamura ve arkadaşları tarafından Vietnam'da (Nakamura ve ark., 2004), Salikli ve arkadaşları tarafından da Amerika'da tespit etmiştir. Günümüzde ise CPV-2'nin antijenik varyantları orijinal CPV-2'nin yerine köpek popülasyonlarında yaygın olarak görülmektedir (Mochizuki ve ark., 1993; Ybanez ve

ark., 1995; Greenwood ve ark., 1996; Truyen ve ark., 1996, Truyen ve ark., 2000; Sagazio ve ark., 1998; Buonavoglia ve ark., 2000, Pereira ve ark., 2000).

Antijenik varyantların, orijinal CPV-2 ile farkı sadece bir kaç amino asitte VP2 proteini bölgesinde görülmesidir, ancak bunların arasındaki genetik farklılık zincir uzunluğunda sadece 426'ncı pozisyonda CPV-2a (Asn), CPV-2b (Asp) ve CPV-2c (Glu)'de görülmektedir (Parrish ve ark., 1991, Martella ve ark., 2006).

CPV-2a ve CPV-2b söylendiği gibi sadece 5 ya da 6 amino asitte farklılık göstermekte ve bu farklılık 2b'de 426'nci pozisyonda Asn-Asp'ye ve 2a'da 555'nci pozisyonda Ile-Val mutasyonu sonucunda gerçekleşmektedir. Mutasyon oranı CPV'de kendi replikasyonunu konakçı hücrenin DNA Polimerazı yardımıyla gerçekleştirdiği için çok az oranda tespit edilmiş (Tattersall 1987) ve tahminen mutasyon oranı CPV'de 1×10^{-4} ile 4×10^{-4} mutasyon/nukleotid/yıl şeklindedir (Parrish 1991; Truyen ve ark., 1995).

1.6. Konakçı aralığı ve patojenik potansiyeli

FPV ve CPV arasında 6 ya da 7 amino asitte ve CPV-2 ve CPV-2a/b arasında en az 5 ya da 6 amino asitte farklılık bulunmaktadır (Çizelge 1.2). Bunlar VP-2 sekansında, FPV ve CPV-2 ve CPV-2a/b aralarındaki önemli biyolojik ve antijenik değişikliklerdir, ki bu da konak aralığının değişimine sebep olmakta ve CPV'nin evrimini incelemek için önemli bir model olmaktadır (Hueffer, 2003).

İn vitro olarak FPV sadece kediden yapılan hücre kültüründe etkili bir şekilde çoğalırken, CPV hem kedi hem de köpek hücre kültürlerinde çoğalmaktadır. İn vivo olarak FPV köpeklerde timusta ve kemik iliğinde çoğalır, ancak dışkıda bulunmaz.

CPV-2 kedide çoğalmazken CPV-2a/b kedilerde çoğalabilmektedir (Truyen, 2006). Bu konu üzerinde çalışmalar şunu göstermektedir ki FPV sadece kedi Tfr reseptörlerine ve CPV-2 ve varyantları, kedi ve köpek Tfr reseptörlerine bağlanabilmektedir (Palermo ve ark., 2006). VP-2 proteininde amino asitlerin değişimi CPV-2 ve onun varyantlarının patojenik etkisinin artmasına neden olmaktadır (Carmichael, 2005). Maternal antikor farklı düzeylerde olan köpeklerde, deneysel CPV-2b enfeksiyonu sonucunda, bu köpeklerin dışkıında çok yüksek miktarda virus bulunmaktadır. Ayrıca bu annelerden dünyaya gelen yavrualarda, (HI) hemaglutinasyon inhibisyon titreleri 1/160 olanlarda bile hastalık görülmektedir (Decaro ve ark., 2005 a). CPV-2c ile ilgili olarak bir çalışmada iki adet Alman çoban köpeğinde doğal enfeksiyon tespit edilmiştir ve parvovirusa ait klinik belirtiler (mukoid veya sulu ishal ve geçici lökopeni) şeklinde gözlenmiştir. Ancak hemorajik ishal veya kusma görülmemiş ve köpekler birkaç gün içinde iyileşmiştir (Spibey ve ark., 2008).

CPV enfeksiyonu genellikle maternal antikor düşük olan 4-12 haftalık yavru köpeklerde görülmektedir (Greene ve ark., 2006). Yetişkin köpekler bu enfeksiyona daha dirençlidir ve bu da spesifik bağışıklığın, aşılama ve daha öncesinde subklinik seyreden doğal enfeksiyonların sonucudur. CPV enfeksiyonu genellikle genç köpeklerde çok görülmesine rağmen, son zamanlarda yetişkin köpeklerde de bir sorun haline gelmiştir (Kapil ve ark., 2007). Yetişkin köpeklerde CPV varlığı ile ilgili birkaç bilimsel rapor bulunmaktadır ki bu da çoğunlukla CPV-2c ile ilişkilidir (Cavalli ve ark., 2001; Decaro ve ark., 2009a, Decaro ve ark., 2008a). CPV-2c ile enfeksiyon 12 yaşında bir köpekte, ateş (40.5° C), nabız ve solunum hızlanması, kusma ve kanlı ishal ve lenfopeni şeklinde görülmüştür. Ancak birkaç gün içerisinde söz konusu köpek kendi kendine iyileşmiştir (Decaro, 2009 a). CPV-2 ve varyantlarından kaynaklı olan panleukopenia, dünyanın farklı yerlerinden evcil ve yabani kedilerde rapor edilmiştir (Truyen, 2006).

1.7. Patogenez, patoloji ve immunoloji

Parvovirüslerde enfeksiyonun ilk aşaması virusun hücre yüzeyine tutunması ile başlamakta (Basak, 1989) ve bunun da hücrede sialik asit reseptörü ve virus proteininin (VP1) “n” terminalindeki glikoprotein tarafından gerçekleştiği tahmin edilmektedir (Tattersall, 1988). CPV’un replikasyonu bağırsak kriptlerinde ve lenfoid organlarda gerçekleşmektedir. Ayrıca virusun beyin dahil olmak üzere, tüm dokulara yayılması mümkündür (Pollock 1982; Elia ve ark., 2007; Decaro ve ark., 2009 a). Virusun oro-nasal yolla penetrasyonundan sonra virus, gastroenterik ve lenfoid dokularda replike olmaya başlar ve bunun ardından enfekte lökositler tarafından ince barsakların kriptlerine yerleşir ve ishale neden olur. Enfekte lenfositlerin lenfoid dokularda dolaşımı sonucunda akut lenfopeni (genellikle nötropeni ile birlikte) meydana gelir (Pollock, 1982). İki ya da üç haftalık seronegatif yavrularda, CPV kalp hücrelerinde replike olma yeteneğine sahiptir ve ölümcül miyokarditlere sebep olur. Bununla birlikte bu yavrular anneleri tarafından üretilen antikolar (maternal anikor) tarafından CPV’ye karşı korunmaktadırlar (Greene ve ark., 2006).

Doğal bir enfeksiyon sırasında, CPV aktif şekilde lenfopoetik sistem ve bağırsak kriptlerinde çoğalmaya başlar (Parrish ve ark., 1995). İlk viral replikasyon orofarengeal lenfoid dokularda meydana gelir ve daha sonra virus kan dolaşımıyla diğer lenfoid organlara ve bağırsaklara yayılır.

Histopatolojik olarak ince bağırsaklar, multifokal kriptlerde nekrozdan etkilenir ve dalak ile timusda lenfositlerin azalması görülmektedir (Greene ve ark., 2006).

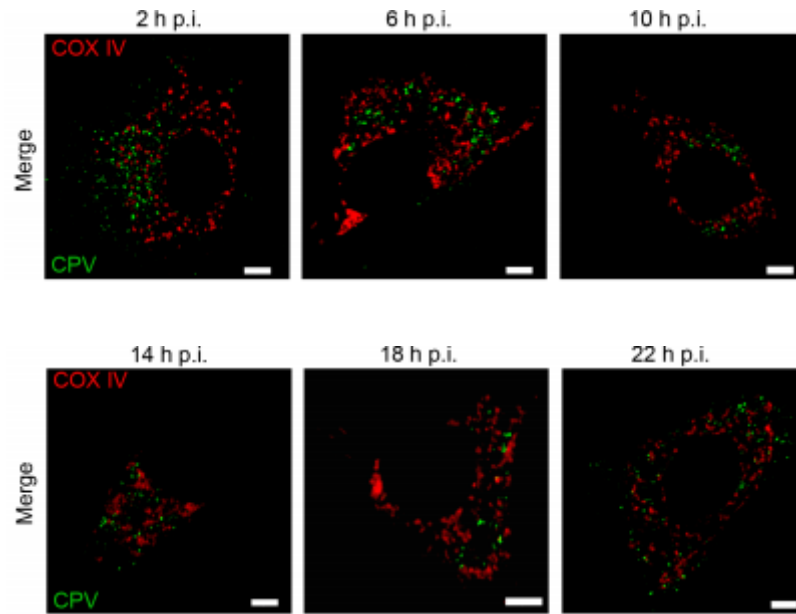
Lökopeni kanın tüm beyaz hücrelerini kapsamaktadır (lenfosit, nötrofil, mōnosit ve trombositler). Lenfoid organlarda (timus, kemik iliği, lenf bezi, dalak ve peyer plakları) bölünme fazında bulunan hücreler virusla enfekte olurlar. Ayrıca, virusun hücre yüzeyine bağlanmasının varlığı, onları sitotoksik lizis için, hedef haline getirir (Pollock, 1982).

Köpek parvovirus enfeksiyonunun patogenezi ile kedi feline parvovirus enfeksiyonları arasında büyük benzerlik vardır. Köpeklerde serebral hipoplazi görülmez ve miyokarditis sendromunun sonuçları kedilere göre farklıdır. Hızla bölünen kalp hücreleri viral enfeksiyona duyarlıdır. Miyokarditis sendromunda pulmoner ödem belirgin bir bulgudur. Histolojik değerlendirmede kalp kası hücrelerinde, intranükleer bazofilik inklüzyon cisimcikleri ve bağ doku kaybıyla birlikte fokal miyokardiyal nekroz görülür. İyileşen bazı hayvanlarda, miyokardiyomada yaygın lenfositik infiltrasyon ve fibrozis görülür. Enteritis sendromunda, intestinal konjesyon yavru köpeklerde ölüme neden olur. Daha uzun yaşayan yavru köpeklerin ince barsakları kalınlaşır ve sertleşir. Ayrıca ince barsaklar, serozal yüzey granüler bir görünüme bürünür. Hızla bölünen lieberkühn kriptlerindeki barsak epitelleri enfeksiyona çok duyarlıdır. Histolojik olarak, lieberkühn kriptlerindeki intestinal epitelyum hücrelerinin nekrozunun yanı sıra, timik atrofi, dalak ve lenf nodüllerindeki lenfoid foliküllerde azalma görülebilir (Muphy ve ark., 1999).

CPV enfeksiyonunun patogeneğinde mitokondriler önemli rol almaktadır. Mitokondrilerin hücrelerde enerji üretmek, redoks dengesini düzeltmek ve Ca^{+2} hemostazisini yapmak gibi görevleri vardır. Bazı durumlarda farklı hücresel sinyaller ortaya çıkmakta ve mitokondrilerin bu hücresel sinyallere yanıtı farklılık göstermektedir. Bu farklılık hücrenin canlı kalmasından ölümüne neden olacak kadar değişik olabilmektedir (Rasola 2007; Murgia ve ark., 2009; Galluzzi ve ark., 2012). Viral enfeksiyonlarda mitokondriler doğal bağışıklığın meydana gelmesinde (ki bu da interferonun üretilmesinden kaynaklanmaktadır) rol alırlar (Seth, 2005).

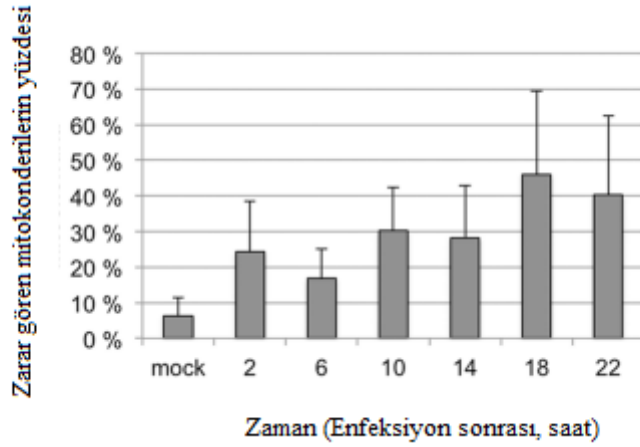
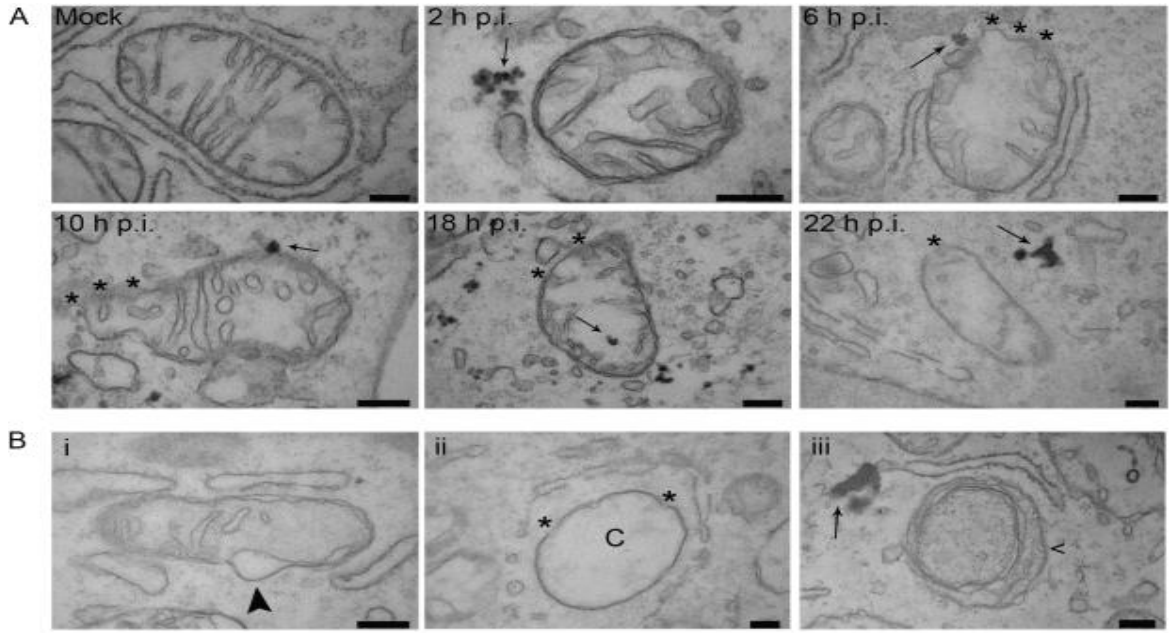
Mitokondri işlevlerinde disfonksiyonlar nörodejeneratif hastalıklar, diyabet ve kanser gibi hastalıklara neden olabilir (Huttemann 2008; Lin 2006; Sivitz 2010; Chowdhury ve ark., 2013; Modica-Napolitano 2004; Chen 2012; He X, Zhou ve ark., 2013). Birçok viral protein mitokondri tarafından hedef haline gelip, onların fonksiyonları yardımıyla interfere olur ve viral hastalıkların patolojisinde rol alırlar (Ohta, Nishiyama 2010; Williamson ve ark., 2012). Viruslar mitokondrilerin fonksiyonlarını kendi yararları için kullanıp onlara büyüme sinyalleri göndererek, metabolik faaliyetlerini artırmak suretiyle etkilerler (El-Bacha, Da Poian 2013; Munger ve ark., 2006). Viral enfeksiyonlar esnasında ERK1/2 (extracellular regulated kinases 1 and 2) aktif olarak, hücrede apoptozisin önüne geçmek suretiyle viral genomun hücre içinde replike olmasına yardımcı olur. Genellikle parvoviral enfeksiyonların patolojisi doğrudan enfeksiyonun sitotoksik doğasıyla bağımlıdır. Enfeksiyon sonrasında enteritis, myokarditis ve retikülositopeni meydana gelmektedir (Macartney ve ark., 1984; Pollock, Carmichael 1990; Heegaard, Brown 2002). Bu hücre ölüm mekanizmalarının apoptozis, nekroz ve hücre iskeleti yeniden düzenlenmesinin sonucudur (Poole ve ark., 2004; Nuesch, Rommelaere 2007; Abdel-Latif ve ark., 2006; Ikeda ve ark., 1998; Moffatt ve ark., 1998; Rayet ve ark., 1998). CPV enfeksiyonunun ileri aşamalarında ve viral replikasyondan sonra hücrelerde apoptozis görülür. (Nyky ve ark., 2010). Apoptozis CPV ile enfekte hücrelerde caspase 3 ve 5'in aktive olmasının sonucudur ki bu da $\Delta\Psi_m$ (depolarization of the mitochondrial transmembrane potential) yayılmasından meydana gelir. Kaspazlar enfeksiyonun erken dönemlerinde aktif hale gelirler ki bu da nükleer DNA'ya zarar verir ve $\Delta\Psi_m$ depolarizasyonu viral replikasyon başlarken şekillenir. Başka bir bildiri de CPV'nin NS1 proteininin ekspresyonu, p53 ve Bcl-2'de bağımsız apoptozise neden olduğu bildirilmiştir (Nyky ve ark., 2010; Saxena 2013). Bugüne kadar yapılan çalışmalar CPV ile enfekte olan hücrelerin apoptozisinin enfeksiyonun erken aşamalarında meydana geldiğini göstermektedir. CPV'nin mitokondrilere direkt yakınlığı ve bağımlılığı konakçı hücrelerin erken dönemlerde apoptotik yolla ölümüne sebep olabilir. Alternatif olarak NS1 proteininin ekspresyonu ve bunun ardından meydana getirdiği sitopatik etkileri, virusun konakçı hücrenin ölümüne neden olur. Bu iki olasılığı göz önünde tutarak, CPV ve mitokondrinin karışımı, konakçı hücrenin erken (apoptozis) ve geç olaylarına (CPE) neden olur. Bu virus ve

mitokondri arasındaki bağ her zaman konakçı hücrede erken dönemlerde apoptozisin olmasına neden olmaz, bazı durumlarda daha sonraki dönemlerde NS1 proteininin ekspresyonu ve bunun ardından meydana getirdiği sitopatik etkiler, konakçı hücrenin ölümüne neden olur. CPV ve mitokondrinin işbirliği sonucu oluşan oksidatif stres, mitokondride meydana gelen oksidatif stresten daha ağır ve çöktür. İlginç şekilde bir çift fazlı DΨm uzlaşması söz konusudur. Daha da önemlisi, CPV enfeksiyonunda ERK 1 ve 2'nin sinyallerinin konakçı hücrede aktive hale gelmesidir (Nyky ve ark., 2014). Konakçı hücre sitoplazmasındaki CPV, enfeksiyondan sonraki 2-22 saat arasında mitokondrilerin istilasına neden olur.



Şekil 1.4: Mitokondrilerin immunfloresan mikroskop görüntüsü. Mitokondriler anti-COX IV antikoruna ile işaretli (kırmızı) ve CPV anti kapsit antikoruna ile işaretli (yeşil). (Çekirde bu resimden kaldırılmış) (Nyky ve ark., 2014)

Mitokondri ve CPV'nin birleşmesi konakçı hücre sitoplazmasında beyaz lekeler halinde görülmektedir (Nyky ve ark., 2014). CPV ile enfekte hücrelerde mitokondrilerde hasar görülmektedir. Enfeksiyon mitokondri membranının parçalanması ile meydana gelmektedir.



Şekil 1.5: CPV ile enfekte olan mitokondri morfolojisi. **A:** Farklı zamanlarda, enfeksiyon sonrası, EM yardımıyla çekilen resimler. **B:** Bir CPV enfeksiyonunu takiben mitokondri hasarı (Resimler 22 saat enfeksiyondan sonra çekilmiş. **İ**, ok; membranın şişmesi. **İİ**, **; membranın zarar görmesi ve C; kristanın kaybolması. **İİİ**; hasarlı mitokondri içinde otofagosom gibi yapılar görüldü. **C:** Zarar gören mitokondrilerin yüzdesi ve zamanla bağlantısı (Nyky ve ark., 2014)

1.8. Klinik Belirtiler

Klinik belirtiler virusun inkubasyon periyodundan sonra (3-7 gün arası) meydana gelir. Bu semptomlar anoreksi, depresyon, kusma ve mukoid veya kanlı ishal, sık sık dehidratasyon ve ateşten ibarettir. Lökopeni sabit bir bulgudur ve beyaz kan hücreleri (WBS) sayımı ile ölçülür ve bu hastalıkta 2000-3000 hücre/ml kan altındadır. Ancak bazı zamanlarda beyaz kan hücreleri normal değerde bulunur ki bu da virus kaynaklı olan lenfopeni ve fırsatçı bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların sonucunda nötrofilden kaynaklanır. Eşzamanlı akciğer enfeksiyonları solunum sisteminde problemlere sebep olur. Subklinik ve belirgin olmayan enfeksiyonlar, yetişkin köpekler ve maternal antikör titresi düşük olan yavrualarda sık sık görülmektedir (Decaro ve ark., 2005 a). Mortalite oranları yavrualarda % 70'e kadar olabilmekte ancak yetişkin köpeklerde % 1'in altında kalmaktadır. İnce bağırsaklarda hemorajik enteritler, mezenterik lenf düğümlerinde ve peyer plaklarında büyümeler ve kanamalar, CPV ile enfekte ve ölen köpeklerde görülmektedir. Hemorajik enterit CPV'nin karakteristik ve belirgin klinik formudur ve bu da enfeksiyonun hangi aşamada olduğuna ve maternal antikör titresine bağlı olarak görülmektedir (Greene ve ark., 2006).

Hastalığın klinik belirtileri hayvanı predispoze kılan faktörlere (yaş, stres, çevre koşulları ve bakteriyel enfeksiyon) göre değişiklik gösterir. Bazı köpek ırkları (Rottweilers ve Doberman gibi) hastalığa karşı daha duyarlıdır (Morais ve ark., 2007). Bazen hastalık hiçbir klinik semptom göstermeden subklinik olarak seyredebilir Sekiz haftalıktan küçük yavrualarda miyokarditis ve ani kalp yetmezliği görülür. Genellikle fokal miyokarditis ve solunum güçlüğüne bağlı olarak kısa sürede ölümle sonuçlanır (Yılmaz, 1998).

Şimdiye kadar yaşa bağlı olarak, köpeklerde farklı sendromlar tanımlanmıştır. Miyokarditis yavru köpeklerde, ani ölüm ve hiçbir klinik semptom göstermeden

meydana gelir. Bazı yavru köpekler bu durumu atlattığı başarılar ama ömür boyu kardiyal problemlerle karşı karşıya kalırlar. Miyokarditis ağırlıklı olarak 4-8 haftalık yavru köpeklerde tespit edilmektedir (Pollock, 1982).

1.9. Tanı ve ayırıcı tanı

CPV enfeksiyonunda tanının hızlı bir şekilde konulması ve hasta köpeklerin barınaklarda ve hayvan yetiştirme yerlerinde diğer köpeklerden ayrılması, sekonder enfeksiyonları önlemek açısından çok önemlidir. CPV enfeksiyonunun teşhisinde klinik belirtilere dayanarak ve bu klinik belirtilerin köpeklerde ishal neden olan diğer viral patojenlerle, (örneğin koronaviruslar, adenoviruslar, morbilliviruslar, rotaviruslar, reoviruslar ve noroviruslar) benzerlik göstermesi nedeniyle zordur (Greene ve ark., 2006). Klinik olarak şüpheli vakalarda laboratuvar testlerinin yapılması gerekmektedir. Bu amaçla CPV enfeksiyonunun laboratuvar tanısı için, bir çok yöntem geliştirilmiştir. Genellikle bu testler şüpheli hayvanın dışkısı ve eğer hayvan ölü ise bağırsak ve bağırsak içeriği üzerinde yapılır. Enfeksiyonun daha ileri dönemlerinde kanda viremi tespiti amacıyla EDTA'lı kan örneği kullanılır (Decaro ve ark., 2005 a).

1.9.1. Klasik yöntemler

CPV enfeksiyonunun klasik tanısında, günümüzde var olan tek yöntem, viral antijenlerin, antikor esaslı testlere dayanarak, tesbitidir (Greene ve ark., 2006). Bununla birlikte, bu testlerin duyarlılığının, diğer geleneksel ve klasik tanı yöntemlerinin, moleküler yöntemlere göre az olduğu, kanıtlanmıştır. İmmunokromatografi (IC) tekniğinin, moleküler testlerle karşılaştırıldığında, duyarlılığının nükleik asit bazlı teste göre % 50'nin altında olduğu görülmektedir.

Ancak IC testinin spesifitesi %100'dur. IC testinin duyarlılığının az olduğu ve bunun yanı sıra virus miktarının enfeksiyonun daha sonraki aşamalarında, dışkıda az olması veya CPV enfeksiyonuna karşı bağırsak lumeninde, antikor titresinin yüksek olması, bir çok yanlış sonuçlara yol açabilir (Desario ve ark., 2005). Bir başka çalışmada, eş zamanlı antikor temelli 3 farklı ticari kitin, PCR ve immunoelektron mikroskopu yöntemiyle yapılması, bu tür testlerin yüksek özgüllük ve düşük hassasiyete sahip olduğunu bir kez daha ortaya koymuştur (Schmitz ve ark., 2009).

CPV ve diğer carnivor parvovirusları arasında yakın genetik ilişki nedeniyle, CPV için kullanılan teşhis amaçlı testler, FPV'de de aynen kullanılmaktadır (Neuerer ve ark., 2008). Bunlara ek olarak HI testi ve virus izolasyonu da yapılabilmektedir. Ancak bu testlerin yapılabilmesi için özel laboratuvarlar gerekmektedir. HI testi için domuzdan alınmış taze eritrositlere ihtiyaç vardır. Domuz eritrositleri yanında, kedi ve maymun eritrositleri de kullanılabilir. Ancak bu materyallerin yeterli miktarda HI testinin yapılabilmesi için hazırlanmasının zor ve pahalı olduğu da unutulmamalıdır. HI testinden daha verimli ve kaliteli şekilde sonuç almak için, bu testte kullanılan eritrositlerin, hasta olmayan ve stresten uzak olan hayvanlardan alınması gereklidir (Desario ve ark., 2005). Buna ek olarak bir çalışmada, CPV-2'nin bazı varyantlarının HI testine daha az duyarlı olduğu da bildirilmiştir (Cavalli ve ark., 2001).

Virus izolasyon çalışmaları için hücre kültürü laboratuvarları yanında yetişmiş uzman personel de gerekmektedir. Ayrıca uzun süreli inkubasyon koşullarına (5-10 gün) ve bu izolasyonun identifikasyonu için, IF veya HI gibi doğrulama testine ihtiyaç vardır. Bu iki testin dezavantajı, CPV enfeksiyonu şüpheli hayvandan alınan materyalin içinde CPV'ye karşı antikor bulunması (antikor titresini de önemli) ve bunun ardından HI (Hemaglutinasyon İnhibisyon) ve VI (virus izolasyon) testinde bu antikorun virus reseptörlerine bağlanarak, yanlış sonuçlara yol açmasıdır (Desario ve ark., 2005). Bu olay doğal (Decaro ve ark., 2005b) ve deneysel enfeksiyonlarda tespit edilmiştir (Decaro ve ark., 2005a).

Parvovirus morfolojisinin elektron mikroskop yöntemi ile incelenmesinin de az duyarlı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca viral partiküllerin, immunohistokimya yöntemiyle, bağırsak, beyin ve dil üzerinde varlığı tesbit edilmiştir (Greene ve ark., 2006). Serumda CPV antikorlarının belirlenmesi, ayrıca ELISA'ya dayandırılan ticari tanısal test kitleri, son yıllarda serolojik CPV spesifik IgM-IgG antikorlarının kullanımını devreye sokmuştur. Bu testler oldukça duyarlı yöntemlerdir.

1.9.2. Moleküler yöntemler

Moleküler yöntemler genellikle konakçının immun yanıtından etkilenmezler, ancak bu testler için özel laboratuvarlara, yetişmiş uzman elemanlara ve yeterli zamana ihtiyaç vardır. CPV enfeksiyonuyla ilgili bir nükleik asit hibridizasyon analizi 1990'lı yılların başından beri uygulanmaktadır (Remond ve ark., 1992). Daha sonra, bu yöntem geliştirilmiş ve eski PCR yöntemleriyle karşılaştırıldığında duyarlılığının yüksek olduğu tesbit edilmiştir (Desario ve ark., 2005). Son yıllarda, CPV enfeksiyonu tanısında, izotermal amplifikasyon ve çoğaltma döngüsü, PCR yerine önerilmiştir (Cho ve ark., 2006). Belirten bu yöntemlerde virusun kantitasyon özelliği yoktur ve örnek sayısı fazla olduğunda, bu tür çalışmalarda kontaminasyon riski artmaktadır.

Daha sonraki yıllarda TaqMan teknolojisine dayalı, Real Time PCR testi geliştirilmiştir. Bu test hızlı, spesifik ve yüksek hassasiyete sahip bir testtir (Decaro ve ark., 2005d). Real Time PCR'da kantitasyon özelliği sayesinde hasta köpeklerin enfeksiyonun hangi aşamasında olduğu ortaya konulmakta ve bu hastalığın barınaklarda ve hayvan yetiştirme yerlerinde önüne geçilmesini ve bunun ardından hastalığın prognozu ve tedavisi ile ilgili olarak önemli adımlar atılmasını sağlamaktadır. Bu yöntemin başarısı hem doğal enfeksiyonlar hem de (Decaro ve ark., 2005b) deneysel enfeksiyonlar sırasında tespit edilmiştir (Decaro ve ark., 2005a). Ayrıca virus miktarının varlığı ve dağılımı farklı dokularda tespit

edilebilmektedir (Decaro ve ark., 2007c). Real Time PCR tekniği yardımıyla CPV, transkript RNA'sının (mRNA) varlığı ve replikasyonu, merkezi sinir sisteminde lokalizasyonu tespit edilmiştir (Elia ve ark., 2007). Son yıllarda TaqMan dayalı Real Time PCR yerine, Syber Green dayalı Real Time PCR tekniği önerilmektedir. Bu yöntemde kantitasyon 10 kopya DNA'yı bile gösterebilmektedir (Kumar, Nandi 2010).

1.10. Nekropsi

Lezyonlar çoğunlukla gastrointestinal kanalda ve lenforetiküler dokularda sınırlı olarak kalır. Midede genellikle şeffaf renkte yapışkan mukus ve safra vardır. Barsak lumeni boş, barsak duvarı ödemli ve lastik boru görünümündedir. Barsak mukozasında duodenumdan jejunuma kadar, yer yer hiperemi ve erozyonlar vardır. Bazen de yaygın şekilde sarımtırak boz renkte bir eksudatla örtülüdür. Kolonlarda, çoğu olgularda kanamalara rastlanır. Peyer plakları belirgin, mezenterial lenf düğmeleri büyük, kesit yüzeyleri nemli-hiperemik, bazen de kanamalı olarak gözlenir (Pollock, 1982).

Mikroskopik olarak, barsaklardaki mukozal lezyonlar jejunum bölgesinde, diğer ince barsak kısımlarına oranla daha belirgindir. Kimi olgularda ise, her iki barsak segmentindeki lezyonlar şiddetlidir. Villöz epitel örtü tamamen dökülmüş ve çoğunlukla atrofik görünümündedir. Bazı olgularda villuslarda kütleşme ve kaynaşma, bazılarında ise nekrotik bozukluklar görülebilir. Olaylarda en belirgin değişiklikler, kriptlerde meydana gelmektedir. Lümenlerde normal ya da genişlemiş olarak bulunan büyük, düzensiz kriptlerin bazofilik epitelyum hücrelerinde dejenerasyon, nekroz ve deskuamasyon görülür. Yine kript epitel hücrelerinde mikotik faaliyetlere ve intranükleer inklüzyon cisimciklerine rastlanmıştır (Muphy ve ark., 1999).

1.11. Tedavi

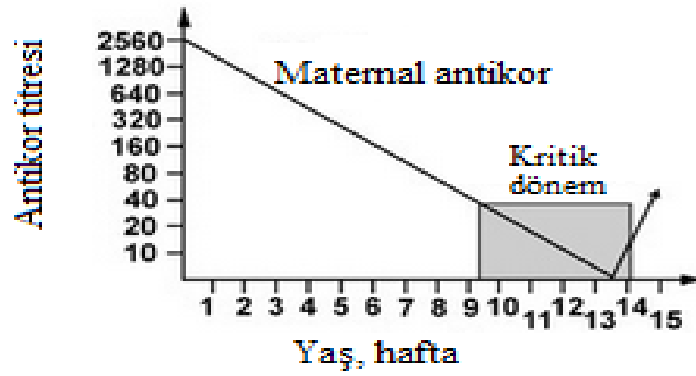
Hastalığın spesifik bir tedavisi yoktur. Ancak CPV'nin meydana getirdiği gastroenteritisin tedavisi semptomatik olarak yapılmaktadır. Geniş spektrumlu antibiyotikler sekonder bakteriyel enfeksiyonlara karşı etkilidir. Bu amaçla aminoglikozid, gentamycin, kanamycin uygulanabilir ve penisilin oral veya parenteral olarak yüksek dozda kullanılabilir. Ayrıca CPV'de endotoksik şoka karşı hidrokortizon ve flunixin meglumin önerilmektedir (Yılmaz 1998). Sürekli olarak kusan köpeklerde antiemetikler kullanılır. Antidiyaretik ilaçlar çok dikkatli kullanılmalıdır. Çünkü barsak hareketlerinin yavaşlaması sonucunda endotoksinlerin emilimi artar. Hipovolemik köpeklerde su kaybını karşılamak amacıyla parenteral sıvı uygulamaları plazma ya da tam kan transfüzyonları endikedir. Destekleyici tedavi olarak da hemostatikler ve vitamin preparatları kullanılır (Yılmaz 1998).

1.12. Korunma

CPV enfeksiyonunun korunmasında aşılama en önemli uygulamadır. İnaktive aşılarda kullanımda kısa süreli kazanılan bağışıklıktan dolayı, modifiye edilmiş canlı virus aşılı (MLV) daha çok tercih edilmektedir. Hastalıktan korunmada, yavru köpeklerin hastalardan ayrılması ve özellikle enfekte köpeklerin dışkıladıkları yerlerden uzak tutulmaları gerekir. Barınakların dezenfeksiyonunda sodyum hipoklorit solüsyonlarının kullanımı yarar sağlamaktadır.

Doğal CPV enfeksiyonunun ardından, hızla immun yanıt oluşur. Enfeksiyonun 3-5. günlerinde nötralizan antikorlar tespit edilir ve kısa sürede çok yüksek titrelere ulaşabilir. Doğal enfeksiyon sonrası bağışıklık yaşam boyu devam edebilir. Maternal antikorun bir kısmı transplasental olarak aktarılabilirken, büyük

bir kısmı da kolostrum yoluyla aktarılır. Yavru köpeklerdeki doğal pasif antikor titresi, maternal antikor titresiyle paralellik gösterir ve bu yüzden oldukça değişkendir. Maternal antikorlar birkaç haftadan en fazla 20 haftaya kadar sürebilen bir koruma sağlar Şekil 1.6. (10-15 haftalar arası kritik dönem). Sitotoksik T hücreleri hem enfeksiyon, hem de aşılama sonrası üretilebilir (Pollock, Carmichael 1982).



Şekil 1.6: Maternal antikor titresinin zamanla bağlantısı.
(Pollock, Carmichael 1982)

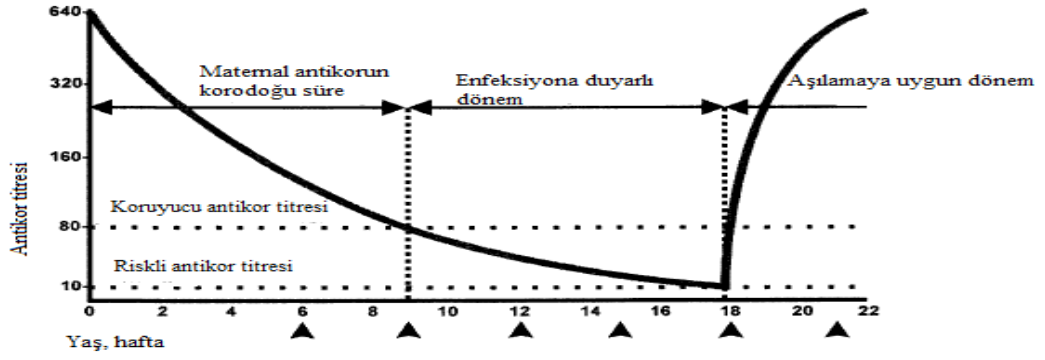
Enfeksiyona karşı geliştirilmiş aşılar büyük önem kazanmıştır. Bu amaçla uygulanan homolog inaktif aşilar, enfeksiyonları kontrol altına alır. Fakat, bu aşilar canine parvoviral miyokarditisten korunmada etkili değildir. Ayrıca feline panleukopenia oluşturan virus ile, CPV arasında benzerlik nedeniyle canlı FPL aşısı da enfeksiyondan korunmada kullanılabilir. Aynı zamanda yüksek titreli CPV antikor taşıyan serumlar 1-2 mg/kg dozunda sağlıklı yavrulara uygulandığında pasif immunité sağlamaktadır (Pollock 1982, Muphy ve ark., 1999).

Yavrular annelerinden aldıkları maternal antikor titresine bağılı olarak 6-18 hafta ya da daha fazla süre korunabilirler. Yavruların % 25'i altı haftalık, % 40'ı dokuz haftalık, % 60'ı onüç haftalık, % 80'i onaltı haftalık, % 95 ve daha fazlası

onsekiz haftalık olduklarında aktif bağışıklık kazanırlar. Bir yavrunun antikor seviyesini bilmeden pratik bir aşılama programı tavsiye etmek güçtür (Pollock 1982).

Sütten kesilmiş yavru köpeklerde, aşılama sırasındaki pasif olarak kazanılan antikorun yüksekliği, aşılama yetersizliğinin en yaygın nedenidir. Yavru köpekler maternal antikorun yaklaşık % 10'unu transplasental yolla alırken, % 90'ını kolostrum yoluyla alırlar. Pasif olarak kazanılan maternal antikorlarla, yavrular en duyarlı oldukları dönem boyunca korunduğu için günümüzde miyokarditis sendromu nadir olarak görülür. Köpek IgG'lerinin yarılanma süresi 10 gündür. Hemaglutinasyon inhibisyon testinde antikor titresinin 1/80 ve daha yüksek olmasının koruyucu olması belirlenmiştir, bu yüzden düşük antikor titreli annelerden doğan yavrular, doğum sonrası 4-6 hafta gibi kısa bir sürede virusa duyarlı olabilirler. Oysa ki yüksek titreli annelerden doğan yavrular 12-20 hafta sürece enfeksiyona karşı bağışık olabilirler. Seronegatif annelerden doğan yavrular, doğum sonrası enfeksiyona karşı duyarlıdırlar. Maternal olarak kazanılan immunité yavruları vahşî virus enfeksiyonuna karşı 2-10 hafta boyunca korur. Tam olarak maternal antikor düzeyinin düşük ve yavruların enfeksiyona duyarlı olduğu, serolojik testlerle belirlenebilir. Ancak bu yöntem pahalı ve bir çok durumda pratik değildir (Muphy ve ark., 1999).

Murphy ve ark. (1999) doksanlı yıllarda CPV profilaksisi için yavruların doğum sonrası 6, 9, 12, 15 ve 18. haftalarda ilk bağışıklamalarının yapılması ve takiben yıllık olarak aşılanmasını önermiştir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7: Maksimum immun yanıt için aşılama önerisi (Murphy ve ark., 1999)

Günümüzde ise klasik aşılama, yavrularda 6-8 haftalık yaşta başlayıp, 18-20 haftaya kadar devam eden süreçte 2-3 hafta aralıklarla, bir seri aşılama yapılması yönündedir. Son yaklaşım titresi yüksek olan virus içeren aşuların kullanılmasıdır. Böylece virus konakta daha fazla replike olabilmekte ve yüksek titrede bağışıklık oluşabilmektedir. Aşılama stratejileri ile birlikte, duyarlı oldukları süre boyunca enfekte olma olasılığını azaltmak için yavruları izole etmek önemlidir (Mittal ve ark., 2014; Pollock 1982). CPV enfeksiyonundan iyileşen köpekler ise hayat boyu bağışık kalırlar.

1.13. Tezin Amacı ve Önemi

Türkiye’de bugüne kadar yapılan çalışmalar içinde yerel parvovirusun moleküler karakterizasyonu çalışmaları son derece kısıtlıdır ve virusun izolasyonuna yönelik çalışmalara rastlanmamıştır. Bu çalışma, yapılacak olan moleküler karakterizasyonu ile birlikte virusun VP2 geni düzeyinde genetik orijininin ve sirküle olan dominant parvovirus tipinin belirlenmesi açısından önemlidir.

Bu genel yaklaşım doğrultusunda, ilk basamakta gastroenteritis semptomlu köpeklerde, enfeksiyona sebep olan virusun tespiti yapılacaktır. Tespit edilen virusa ait moleküler düzeydeki çalışmalar ile virusun moleküler karakterizasyonun yapılması ve filogenetik analizi ile sirküle olan virusa yönelik veriler elde edilecek, sirküle olan dominant yerel parvovirus tipinin (CPV 2a, CPV 2b, CPV 2c) belirlenmesi ve özellikle Avrupa’da görülen tiplerle olan ilişkisi ortaya konulacaktır. Ayrıca enfeksiyona sebep olan virusun hücre kültüründe izolasyon çalışması tezin bir diğer önemli amacını oluşturmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Örneklenen hayvanlar ve numuneler:

Ankara’da yerleşik özel veteriner kliniklerinden ve/veya muayenehanelerden klinik olarak gastroenteritis semptomu gösteren, parvovirus enfeksiyonu ön tanısı konulmuş ve/veya parvovirus şüpheli 100 hayvana ait çeşitli örnekler viral tanı amacıyla alınmış, örnek dağılımı Çizelge 2.1’de sunulmuştur.

Örnek	Sayı
Gaita	5
Rektal swab	35
Kan	57
Nazal swab	3
Toplam	100

Çizelge 2.1: Araştırmada kullanılan örneklerin dağılımı

Söz konusu örnekler alınmadan önce, hasta sahipleri alınan örneklerin parvovirus yönünden tanısının yanında ileri tetkik sonuçlarının da yukarıda adı geçen tez projesinde kullanılabilmesi yönünde bilgilendirildi ve “Aydınlatılmış Onam Form’ları okutularak onayları alındı. Örnekler 2013 yılında üç farklı dönemde toplandı. Birinci dönem 03.03.2013 ve 20.04.2013 tarihleri arasında olmak üzere toplam 27 adettir. İkinci dönem 10.05.2013 ve 30.07.2013 tarihleri arasında olup toplam 45 adet örnek temin edilmiştir. Üçüncü dönem ise

14.09.2013 ve 27.12.2013 tarihleri arasını kapsamakta ve 28 adet örneği içermektedir. Örneklenen hayvanların yaş aralıkları ise çizelge 2.2’de sunuldu.

Yaş grubu	Örnek sayısı
0-3 Ay	17
3-6 ay	25
6>	26
Bilinmeyen	32

Çizelge 2.2: Araştırmada örneklenen hayvanların yaş dağılımı

Diğer taraftan araştırmada örneklenen hayvanlardan 42 adedinde ishal, 24 adedinde kanlı ishal ve kusma, 34 adedinde ise ılımlı seyirli ishal ilk klinik bulgu olarak tespit edildi (Çizelge 2.3).

Klinik belirti	Örnek sayısı
Şiddetli ishal	42
Kanlı ishal ve kusma	24
İlmlı seyirli ishal	34

Çizelge 2.3: Örneklenen köpeklerin klinik belirtileri

2.1.2. Hücree kùltürü

Virus izolasyonu amacıyla CRFK (Crendall Rees Feline Kidney) hücre kùltürü kullanıldı. Söz konusu hücre kùltürü Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakùltesi, Viroloji Anabilim Dalı hücre koleksiyonundan sağlandı. CRFK hücre kùltürünün devamlığı DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ve % 10 FBS (fetal bovine serum) ve antibiyotik (100 unite/ml penicillin G potassium ve 0.5 mg/ml streptomycin sulfate) kullanılarak sağlandı. İzolasyon çalışmasında kullanılan hücre hattı ve hücrenin devamlılığında kullanılan fòtal dana serumu nonsitopatojen BVDV varlığı yönünden test edildi ve virus negatif seriler kullanıldı.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Örneklerin hazırlanması

Parvovirus enfeksiyonu ön tanı veya parvovirus enfeksiyonu şüpheli hayvanlardan alınan örnekler, viral nükleik asit tespiti ve virus izolasyonu için ön hazırlığa tabi tutuldu.

Gaita, bu amaçla laboratuvara getirilen gaita örnekleri 1/10 olacak şekilde steril PBS ile sulandırıldı ve vorteks'lenmek suretiyle örneklerin iyice karışması sağlandı. Daha sonra gaita örnekleri 3000 devirde +4°C'de 30 dakika süreyle santrifüje tabi tutuldu ve santrifüj sonrasında üstte kalan sıvı (süpernatant), bir porsiyonu viral nükleik asit tespiti amacıyla PCR (polymerase chain reaction) testine tabi tutulmak üzere, bir porsiyonu ise virus izolasyonunda kullanılmak üzere 2 tüpe ayrıldı. Virus izolasyonu amacıyla kullanılacak olan porsiyon PCR sonucu çıkıncaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı. Viral nükleik asit varlığını tesbit etmek amacıyla ayrılan örneğe ise PCR uygulandı.

Rektal swap, Dışkıyı alınamayan ve benzer ön tanı veya şüpheli yaklaşıl köpeklerden rektal swap örnekleri alındı. Alınan swaplar, içinde 3 ml steril PBS bulunan tüplere taşındı ve bu PBS içinde vortekslenerek karışmaları sağlandı. Swap çubukları tüpün kenarına sıyrılarak uzaklaştırıldı ve elde edilen gaita-PBS karışımı 3000 devirde +4°C'de 30 dakika süreyle santrifüje tabi tutuldu. Süre sonunda tüp içindeki supernatant, PCR ve virus izolasyonu amacıyla 2'ye bölündü. Virus izolasyonu amacıyla bölünmüş porsiyon -80°C dondurucuda saklanırken, moleküler tanı amacıyla ayrılan örnek PCR'a alındı.

Tam kan, Gaita veya rektal swap örnekleme yapılamayan ve benzer ön tanı veya şüpheli yaklaşıl köpeklerden alındı. Antikoagulanı (EDTA-ethylen diamine tetra-acetic asit) tüplere alınan kanlar laboratuvarında 2000 devirde 10 dakika santrifüje tabi tutuldu. Tüp içinde tabakalanan kan hücrelerinden lökosit tabakası bir pastör pipeti ile çekildi ve 3 ml steril PBS içine aktarıldı. Burada pipete edilerek karıştırılan lökositler 3 kez yıkandıktan sonra 2 ml PBS içinde

süspanse edildi. Elde edilen lökosit süspanسیونu yine viral nükleik asit tespiti ve virus izolasyonu amacıyla 2'ye bölündü. Viral nükleik asit tespiti amacıyla kullanılacak olan örnek PCR'a tabi tutuldu, virus izolasyonuna tabi tutulacak porsiyon ise PCR sonucu çıkıncaya kadar -80°C dondurucuda saklandı.

Nasal swab, Gaita ve kan örneği alınamayan ancak benzer ön tanı veya şüpheyle yaklaşılan ve burun akıntısı olan 3 adet köpekten nasal swap alındı ve 3'er ml steril PBS içeren tüplere aktarıldı. Vortekslendikten sonra swap çubukları tüpün kenarına sıyrıldı ve uzaklaştırıldı. Mevcut karışım 3000 devirde +4°C'de 30 dakika süreyle santrifüje tabi tutuldu. Süre sonunda tüp içindeki süpernatant 2 porsiyona ayrıldıktan sonra bir adedi moleküler tanı amaçlı kullanıma alındı diğeri ise virus izolasyon çalışmasında kullanılmak üzere -80°C'de donduruldu.

2.2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)'da kullanılacak örneklerden viral DNA Ekstraksiyonu

Viral nükleik asit varlığını tespit etmek için yapılacak PCR'da kullanılmak üzere ön hazırlığı yapılan tanı materyallerine konvansiyonel yöntem ile DNA ekstraksiyonu yapıldı. Bu amaçla;

- Şüpheli örnekten 325 µl bir ependorf tüpe alındı.
- Üzerine eşit hacimde (325 µl) solüsyon D ilave edildi ve 15 saniye vortekslendi.
- Karışım üzerine 325 µl alkali fenol ve 325 µl kloroform/izoamil alkol (24:1) konuldu ve 15 saniye vortekslendi.
- Karışım 12000 devirde 10 dakika santrifüje tabi tutuldu.
- Santrifüj sonunda 700 µl süpernatant yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 700 µl izopropil alkol eklendi.
- 3 M Na asetattan 1:10 oranında (140µl) karışımın üzerine eklendi ve 10 saniye vortekslendi.
- Karışım 1 saat -80°C'de bekletildi.
- Süre sonunda oda derecesinde çözüldü ve 12000 devirde 10 dakika santrifüje tabi tutuldu.

- Üsteki sıvı çekildi ve pelet, 300 µl % 70 Etanol ile yıkandı ve tekrar 12000 devirde 2-3 dakika santrifüje tabi tutuldu.
- Etanol çekildikten sonra, 37 °C’de kurutulan pelet 20µl distile su ile sulandırıldı.

2.2.3. Primer çifti ve Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR, laboratuvarda ön hazırlığı yapılan örneklerle ait ekstratlardaki olası viral nükleik asidin, laboratuvar ortamında primer denilen sentetik oligonükleotid diziler yardımıyla çoğaltılması işlemidir. Çalışmada konvansiyonel PCR yöntemi ile CPV nükleik asit tespiti amacıyla kullanılan reagent’lar ve kullanılan cihazlar ile ilgili bilgiler aşağıda sunulmuştur.

- Pfu Taq DNA Polymerase, Fermentas, Litvanya
- DNA Ladder, 100-3000 bp, Fermentas, Litvanya
- Termal Cyclers TC – 3000, Techne, UK
- Termal Cyclers TC – 312, Techne, UK
- Jel Görüntüleme Sistemi 100, Kodak, Japonya

Konvansiyonel PCR tekniğinde Özkul ve ark. (Özkul ve ark., 2001)’nın VP-1 ve VP-2 genine yönelik olarak bildirdikleri primer çifti kullanıldı ve primer dizinleri Çizelge 2.4’te gösterildi.

Primer	Sekans (5'-3')	Pozisyon
CPV-P1 (Forward)	ATggCACCTCCggCAAAG	2285-2303
CPV-P2 (Reverse)	TTTCTAggTgCTAgTTgAg	4512-4530

Çizelge 2.4: VP-1 ve VP-2 genine yönelik olarak kullanılan primer çifti (Özkul ve ark., 2001)

PCR aşamaları ve bu aşamalarda uygulanacak derece (°C)/süre değerleri aşağıda sunulduğu şekilde gerçekleştirildi.

1- Başlangıç denatürasyonu	94°C'de	6 dakika	
2- Denatürasyon	94°C'de	60 saniye	} 35 siklus
3- Annealing (bağlanma)	52°C'de	60 saniye	
4- Extension (uzama)	72°C'de	150 saniye	
5- Final extension	70°C'de	10 dakika	

2.2.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

Amplikonların jelde görüntülenmesi amacıyla, %1'lik agaroz (Prona, EU) 0,5X TAE, (Tris Asetat - Ethylene Diamine Tetra Acetic acid) solüsyonu içerisinde

çözüldü ve mikrodalga fırınında kaynatıldı. Uygun sıcaklık değerine gelmesinden sonra üzerine 0,5µg/ml konsantrasyonundaki ethidium bromide (Sigma, ABD) ilave edilerek tarağı yerleştirilmiş jel taşıyıcısına döküldü. Yaklaşık 20 dakika sonra soğuyan agarozdaki taraklar çıkarılıp, jel taşıyıcısı elektroforez tankına yerleştirildi. PCR ürünleri 6X yükleme boyası (6x Loading Dye, Fermentas, Litvanya) ile pipete edilerek kuyucuklara yüklendi. Spesifik ürünün belirlenmesi için 1µl 100-3000 bp'lik DNA merdiveni (Fermentas, Litvanya) her iki baştaki kuyucuklara yüklendi. 0,5×TAE solüsyonu içerisindeki jele 30 mAmp elektrik akımı, 20 dakika uygulanarak DNA göçü sağlandı ve jel görüntüleme sistemi (Kodak, Gel Logic 100, ABD) kullanılarak PCR sonrasında oluşan bantlar (2245 bp) görüntülendi.

2.2.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

CPV nükleik asiti yönünden PCR'da pozitif olarak tespit edilen ürünlerden en kuvvetli bant oluşturan 15 adedi sekans işlemine tabi tutulmak üzere saflaştırıldı. Bu amaçla 50µl PCR ürünü ve 10µl 6 × yükleme boyası olacak şekilde karıştırılıp %1 lik jelde hazırlanan kuyucuklara 100-3000 bp'lik DNA merdiveni ile birlikte yüklendi. DNA göçü sonrasında görüntülenen 2245 bp'lik DNA bantları steril bir bistüri yardımıyla jelden kesilerek ayrıldı ve 1,5 ml'lik ependorf tüplere konuldu. Elde edilen jel parçaları ticari bir pürifikasyon kiti (High Pure PCR Clean/extraction kit, Roche, Almanya) ile üretici firmanın önerdiği yöntem kullanılarak saflaştırıldı. Elde edilen saflaştırılmış DNA'lar, dizin analizinde kullanılmak üzere - 20°C' de saklandı.

2.2.6. Sekans ve filogenetik analiz

Saflaştırılmış 15 adet DNA hizmet alımı ile (İntergen genetik merkezi, Çankaya, Ankara) yeni nesil sekans analizine SBS yöntemi (Sequencing By Synthesis) ve Miseq (Illumina Inc kiti) yeni nesil DNA dizileme cihazı kullanılarak tabi tutuldu. Analiz sonrası elde edilen veriler National Center Biotechnology Information (NCBI) servisinin BLAST web sayfasında (Anonim 6: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) sağlanan Gen bankası hizmetinden yararlanılarak tanımlandı. Dataların analizi için referans olarak parvovirusun tüm genomu, M19296 (Reed ve ark., 1988) kullanıldı. Dizinler BioEdit ve Clustral W (Hall TA 1999) yazılımı kullanılarak kendi aralarında karşılaştırıldı. Fasta formatına çevrilen tüm verilere Neighbor-Joining metoduna göre bootstrap analizi (1000 tekrar) yapıldı (Saitou and Nei, 1987). Evrimsel mesafeler Tamura-Nei method (Tamura and Nei, 1993) yöntemi kullanılarak hesaplandı. Evrimsel analiz MEGA 6 (Tamura ve ark., 2013) ile gerçekleştirildi. Evrimsel analiz için tercih edilen değerlendirme kriterleri aşağıda sunuldu:

Analiz

Analiz..... Filogeni Yapılandırması
Kapsam..... Seçilen Tüm dizinler
İstatiksel Metod Neighbor-Joining metod

Filogeni Test

Filogeni testi Bootstrap Metodu
Bootstrap Replikasyon sayısı 1000

Substitüsyon Modeli

Substitüsyon Tipi..... Nükleotid
Model/Metod..... Maksimum Karma Benzerlik

Oranlar ve Kalıplar

Bölgeler arasındaki oranlar..... Değişmeyen oranlar
Suşlar arasındaki kalıplar..... Aynı (Homojen)

Kullanılan veri grupları

Boşluklar/ Eksik Veri İşlemi..... Tamamen Silme
Dahil kodonlar..... 1inci+2inci+3üncü+Non-koding

2.2.7. Virus İzolasyonu

PCR'da pozitif olarak tespit edilen örneklerin, hücre kültürü inokulasyonu ve izolasyon çalışması için derin dondurucuya kaldırılan eş porsiyonları çözülerek 0.2 nm'lik filtrelerden (Orange scientific, Cat.No:1520012, Belçika) geçirilmek suretiyle hücre kültürüne inokulasyona hazır hale getirildi (Parthiban ve ark., 2011; Waner ve ark., Cavalli ve ark., 2008).

Monolayer tabakalanmış CRFK hücre kültürü Tripsin-versen (Sigma. Lot: 022K7268) ile kaldırıldıktan ve 120.000 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu haline getirildikten sonra 24 gözlü makropleytlere (Corning, No: 25820.) her gözüne 1'er ml. konuldu. Yaklaşık 2-4 saat içinde pleyt gözlerinin içindeki vasatlar çekildi ve PCR pozitif olarak tespit edilen her örnek için 2'şer göze 200'er mikrolitre adsorbsiyonlu yöntemle inokulasyon yapıldı. İnokulasyondan bir saat sonra tüm pleyt gözlerine 1'er ml DMEM konuldu ve pleytler %5 CO₂'li etüvlere kaldırıldı. Hergün doku kültürü mikroskopunda (Olympus CKX 41. Japan) morfolojik hücre değişiklikleri yönünden kontrolleri yapıldı. Hücre kültürlerinde CPE oluşup oluşmamasına bakılmaksızın 4 veya 5. günde hücreler toplanarak 5 kez kör pasajları yapıldı (Hirayama ve ark., 2005; Hirayama ve ark., 2004; Mohan ve ark., 2010; Parthiban ve ark., 2006). İzolasyon çalışmalarında, her pasaj sıvısına PCR testi

uygulanarak virus üremesinin takibi yapıldı. Bu amaçla 427 bp'lik bir primer kullanıldı (Cesar ve ark., 2000) Çizelge 2.5'te primer dizileri sunuldu.

Primer	Sekans (5'-3')	Pozisyon
CPV-P1 (Forward)	CTTTAACCTTCCTGTAACAG	4043-4062
CPV-P2 (Reverse)	CATAGTTAAATTGGTTATCTAC	4449-4470

Çizelge 2.5: Hücre kültürü izolasyon doğrulanması için kullanılan PCR primerleri (Cesar ve ark., 2000)

Ayrıca, hücre kültürlerinde seri pasajları yapılan örneklerin 5. pasaj sıvıları Canine Parvovirus-2'nin varlığı yönünden direkt immunofloresan (DIF) testine tabi tutuldu.

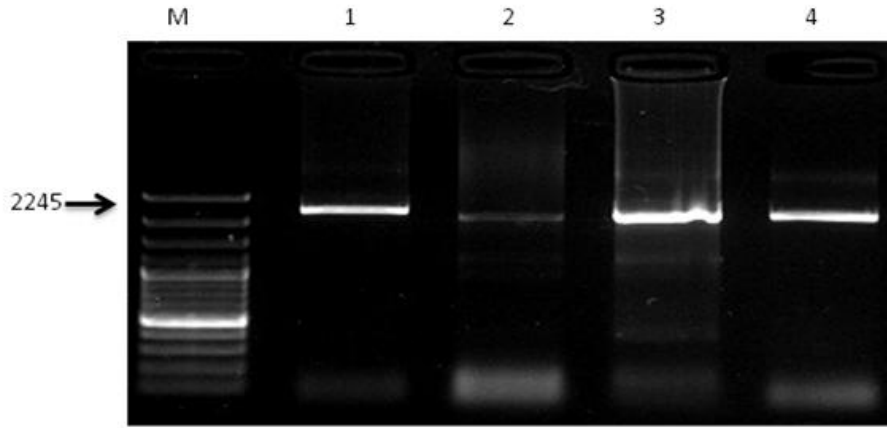
2.2.8. Direkt İmmunofloresan (IF) Testi:

PCR pozitif olarak tesbit edilen ve hücre kültürlerinde 5 seri pasajları yapılan örnekler DIF testine tabi tutuldu. Bu amaçla fluorescein isothiocyanat (FITC) ile işaretli anti-CPV mouse monoclonal antikoru, (VMRD, direkt FA konjugat, catalog no: 210-11-CPV USA) konjugat olarak kullanıldı. Söz konusu konjugat sadece CPV-2 ile reaksiyon vermekte, CPV-1 ile reaksiyona girmemektedir. Son pasajı yapılan ve inokulasyonun 4-5. gününde olan 24 gözlü pleytlerdeki hücrelerin üzerine % 3.7 formaldehit ilave edilerek hücrelerin fikzasyonu sağlandı. Pleyt gözlerindeki içerik 20 dakika sonra çekildi ve üzerine 1/10000'lik tween'li WPBS (White PBS) konuldu. Otuz dakika sonra WPBS'le iki kez yıkama yapıldı. Hücre yüzeyleri kurutuldu ve üzerine 100 µl konjugat konuldu ve 37°C'lik etüvde, çalkalayıcı üzerinde 40 dakika bekletildi. Süre sonunda konjugat çekildi ve hücre yüzeyleri WPBS'ile iki kez yıkandı. Tüm gözlere mounting buffer (50/50 FA mounting fluid +FA rinse buffer) damlatılarak floresan mikroskopta (Nikon, Eclipse TS 100) incelendi.

3. ANALİZ VE BULGULAR

3.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Çalışmada gaita, rektal swap, kan ve nasal swab örneklerine VP-1 ve VP-2 gen bölgesine yönelik olarak yapılan PCR sonucunda 2245 bp büyüklüğündeki bantların varlığı o örnek için CPV yönünden pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 3.1: PCR ürünlerinin elektroforez görüntüsü
M: 100-3000 bp DNA merdiven
1,2,3: CPV pozitif örnekler, 4: CPV pozitif kontrol.

Toplam 100 köpeğe ait örnekten 52 adedi CPV yönünden pozitif olarak tespit edildi (% 52) PCR pozitifliğinin test edilen örneklere göre dağılımı ise Çizelge 3.1' de sunuldu.

Örnek	Örnek sayısı	PCR (+)	PCR(+) %
Gaita	5	3	60
Rektal swap	35	20	57.1
Kan	57	28	49.1
Nasal swap	3	1	33.3
Toplam	100	52	52

Çizelge 3.1: PCR pozitif örneklerin dağılımı

PCR uygulaması sonucunda CPV genotip DNA'sı yününden pozitif olduğu tespit edilen 52 adet olgunun yaş ve klinik seyir özellikleri itibarıyla dağılımları incelendi. Buna göre pozitif olguların 10 adetinin 3 aydan küçük, 15 adetinin 3-6 ay arasında ve 9 adetinin de 6 aydan büyük hayvanlara ait olduğu tespit edildi. Onsekiz adet pozitif olguya yaş tepiti yapılmadı (Çizelge 3.2).

Yaş grubu	Örnek sayısı	PCR pozitif
0-3 Ay	17	10
3-6 ay	25	15
6>	26	9
Bilinmeyen	32	18

Çizelge 3.2: Çalışmada pozitif olguların yaş dağılımı

CPV genotip DNA'sı pozitif olarak bulunan olguların 7 adedinde klinik tanımlama yapılmamış iken; şiddetli, kanlı ve ılımlı ishal tablosu sergileyen CPV pozitif hayvan sayıları sırasıyla 19,16 ve 10 olarak kaydedildi (Çizelge 3.3).

Klinik belirti	Örnek sayısı	PCR pozitif
Şiddetli ishal	35	19
Kanlı ishal ve kusma	20	16
İlımlı seyirli ishal	28	10
Tanımlanmamış	17	7

Çizelge 3.3: Çalışmada pozitif olguların dağılımının klinik tanı ile bağlantısı

Örneklemlerin 2013 yılı içinde 3 farklı dönemde gerçekleştiği noktadan hareketle yapılan değerlendirme sonuçları Çizelge 3.4 de sunuldu.

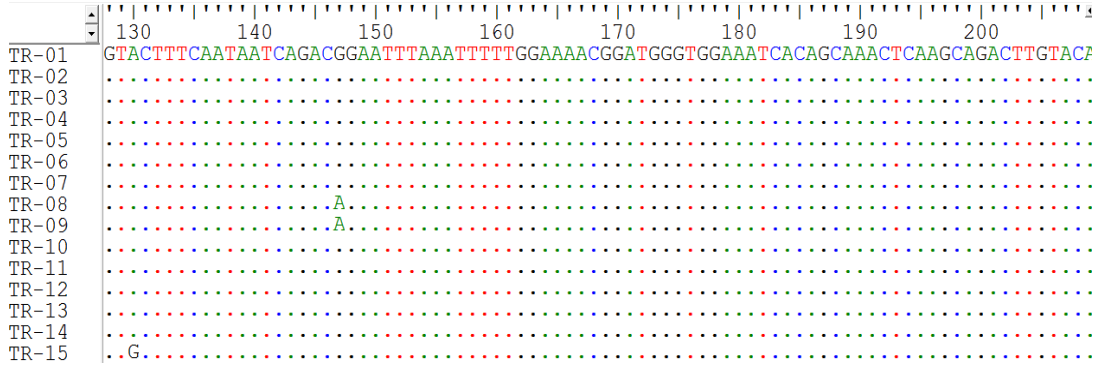
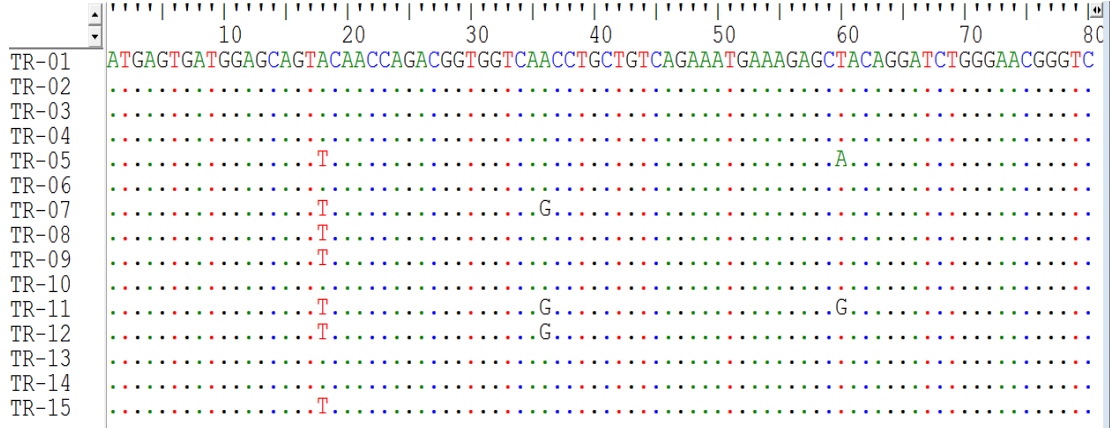
Dönem	Tarih aralığı	Sayı	
		Olgu	PCR + (% dönem pozitifliği)
1	03.03-20.04. 2013	27	11 (%40.7)
2	10.05-30.07. 2013	45	27 (%60)
3	14.09-27.12. 2013	28	14 (%50)

Çizelge 3.4: Örnekleme tarihleri

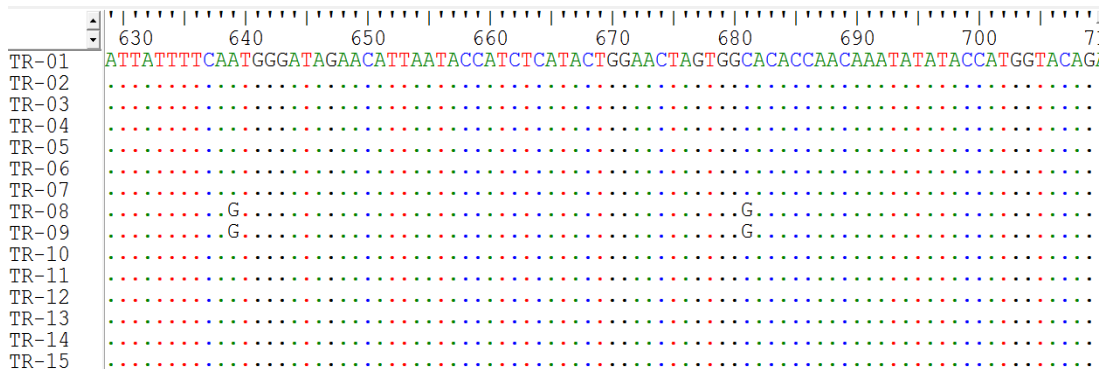
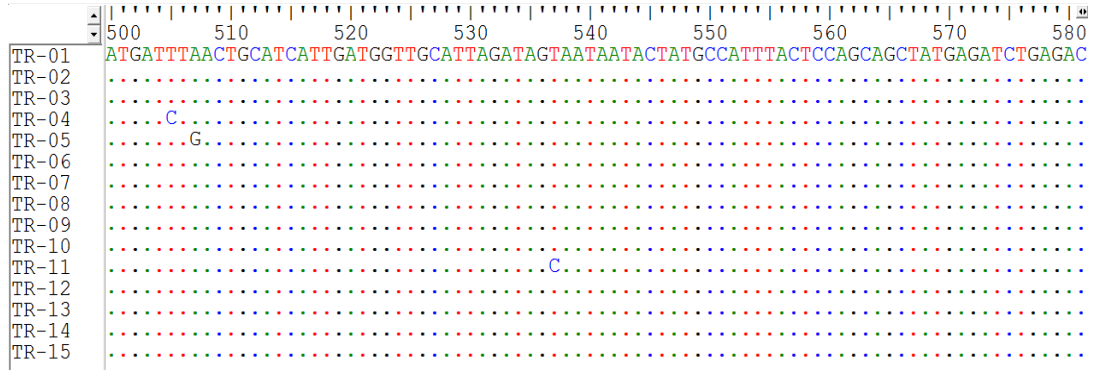
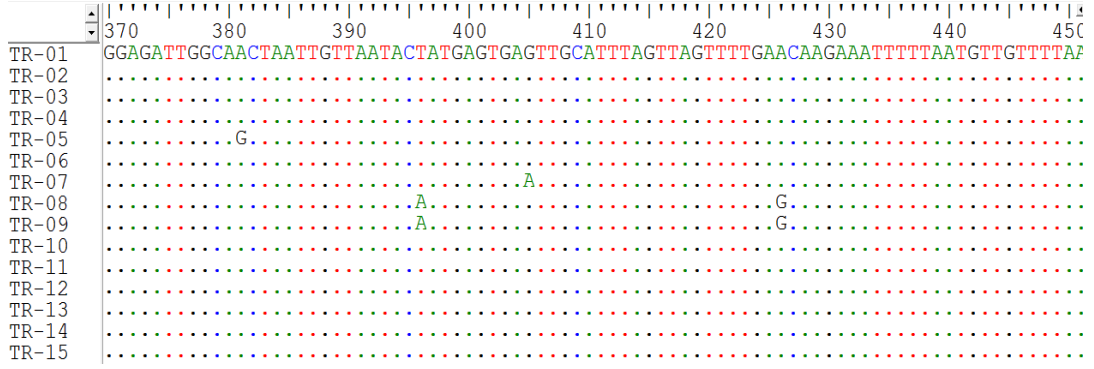
3.2. Sekans Analizi ve Filogenetik Değerlendirme

Toplam 52 adet CPV pozitif örnekten kuvvetli PCR bantı oluşturan 15 adedi öncelikle nükleik asit saflaştırma işlemine sonrasında ise yeni nesil sekans analizine tabi tutuldu. Yeni nesil sekans analizinde okuma işlemi 5-9974 kez arasında değişmekte, bu da okuma işleminde elde edilen verilerin hata oranının son derece düşük olmasına neden olmaktadır. Okuma sonrasında elde edilen verilerin analizi için referens olarak parvovirusun tüm genom sekansı (M19296) (Reed 1988) ve İGV 2.3 programı kullanıldı (James ve ark., 2011). İGV 2.3 programından elde edilen verilerin bam dosyasından fasta'ya çevirmek için Unipro UGENE Version 1.15.0 programı kullanıldı. Bu verileri göz önünde bulundurarak 15 adet farklı ürün için hedef alınan 2245 bp'lik bölge kesildi. Bu kesilen bölgeden 1755 bp'lik VP-2 bölgesi tekrar kesilerek elde edilen dizinler ek-1'de sunuldu.

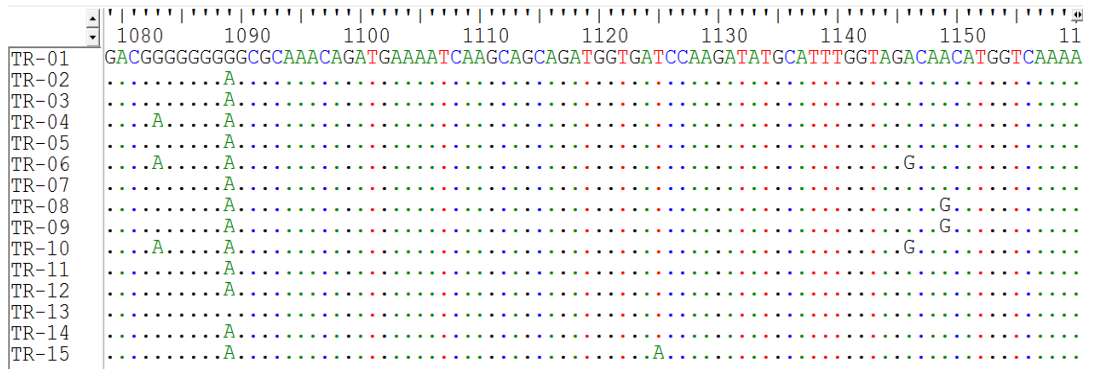
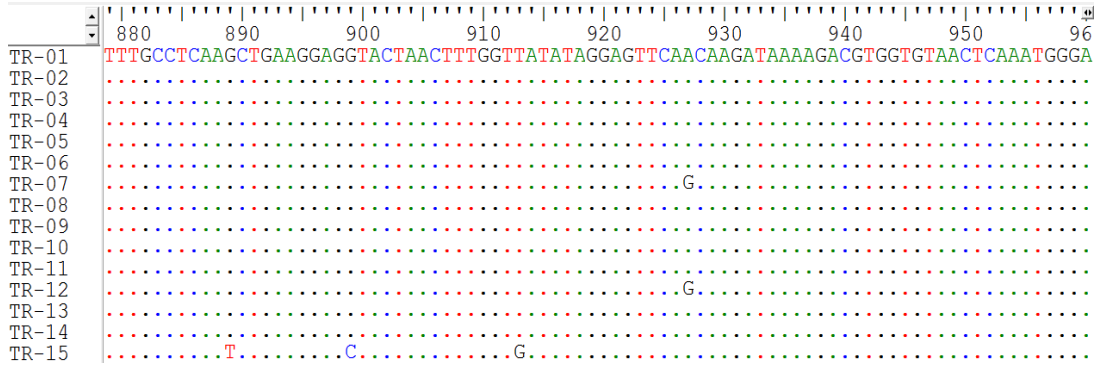
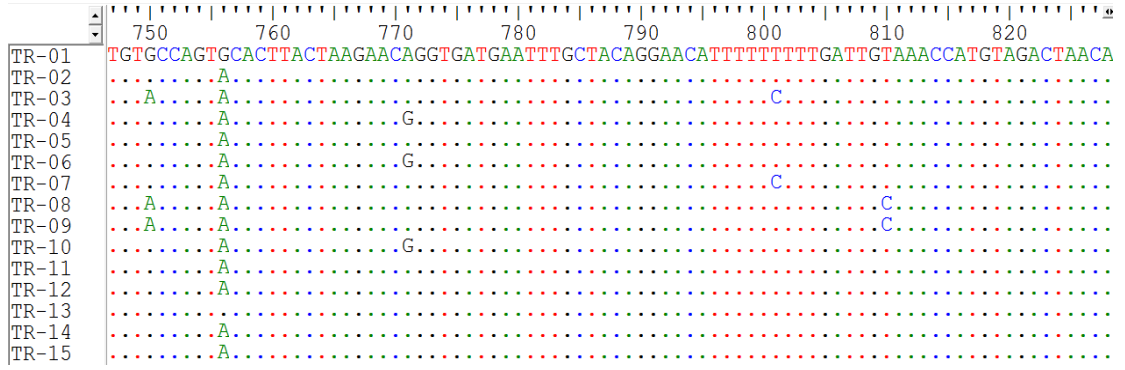
Araştırmamızda elde edilen 15 adet nükleotid sekanslar BioEdite Sequence Alignment Editor (Hall TA 1999) programıyla hizalandı. Nükleotid değişimi gözlenmeyen identik bölgeler sekans hizalandırmasından çıkararak Şekil 3.2'de gösterildi.



Şekil 3.2: Araştırmada elde edilen 15 olguya ait VP2 geni düzeyinde nükleotid dizilerinin karşılaştırılması



Şekil 3.2: Araştırmada elde edilen 15 olguya ait VP2 geni düzeyinde nükleotid dizilerinin karşılaştırılması (devam)

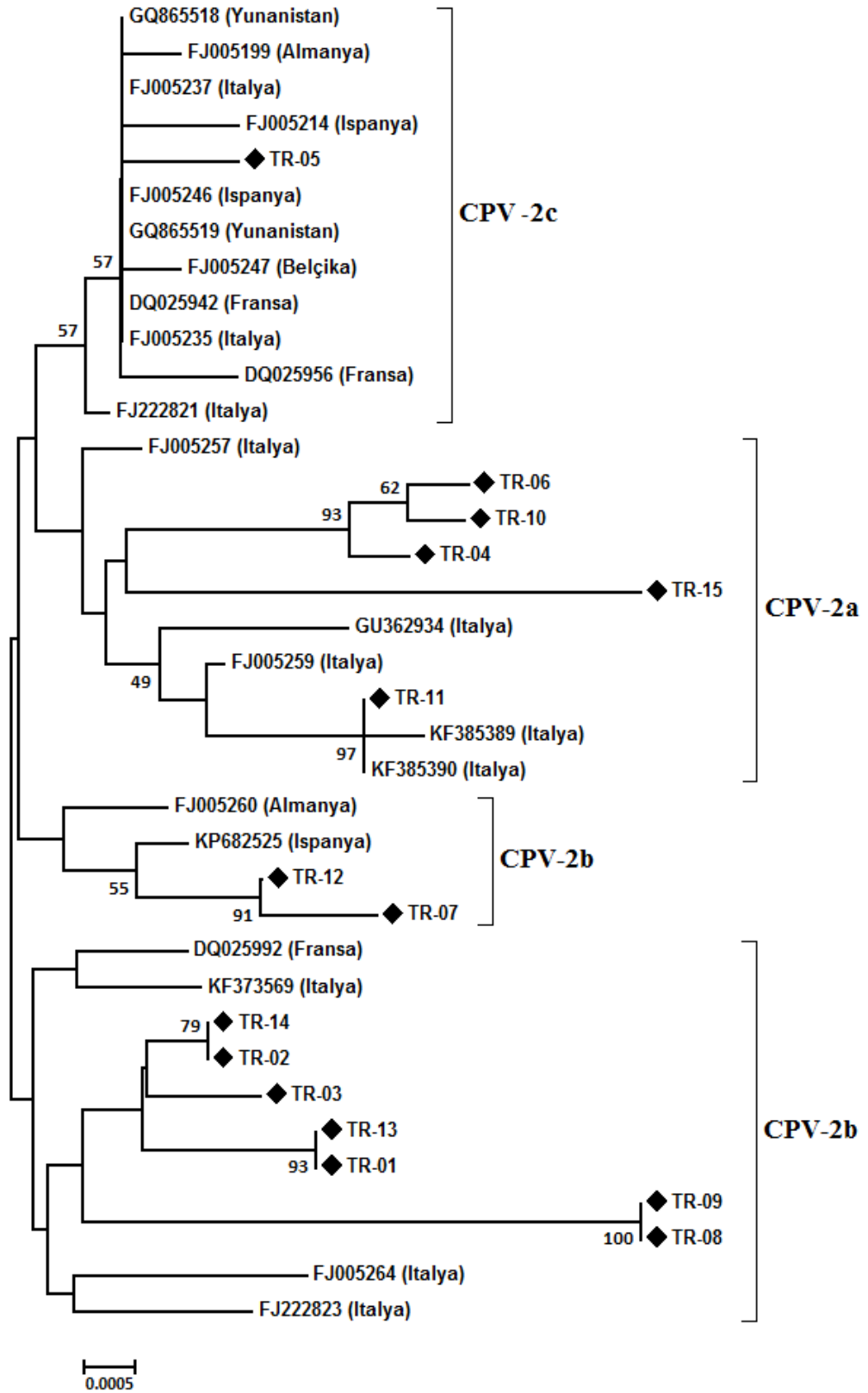


Şekil 3.2: Araştırmada elde edilen 15 olguya ait VP2 geni düzeyinde nükleotid dizilerinin karşılaştırılması (devam)

Nükleotid dizinlerin arasındaki değişiklikler göz önüne alınarak BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall TA 1999) programı kullanılarak 15 örneğe ait amino asit çevirisi yapıldı. Daha sonra aynı program kullanılarak amino asitler arasında hizalama yapıldı ve amino asit değişimi gözlenmeyen identik bölgeler sekans hizalandırmasından çıkartılarak Şekil 3.3’de gösterildi.



Şekil 3.3: Araştırmada elde edilen 15 olguya ait VP2 geni düzeyinde amino asit dizilerinin karşılaştırılması



Şekil 3.4: Araştırmada saptanan dizinlerin VP2 bölgesi yönünden Neighbour joining metodu ile filogenetik analizi: ◆- elde edilen dizinler

CPV'un VP-2 bölgesine yapılan moleküler düzeydeki çalışmalar sonunda, 15 örnekten 5 adedi CPV-2a, 9 adedi CPV-2b ve 1 adedi de CPV-2c olarak filogenetik ağaçta yerini aldı. Bu sonuçlar örneklemelerin yapıldığı 2013 yılında Ankara'da sirküle olan virusun çoğunlukla CPV-2b (% 60) olduğunu daha sonra sırasıyla CPV-2a (% 33.3) ve CPV-2c'nin (% 6.6) izlediğini ortaya koydu. Çalışma kapsamında analiz edilen tüm yerel virusların kıta avrupa ülkelerine ait belli viruslar ile doğrudan bir ilişkisi tespit edilmedi.

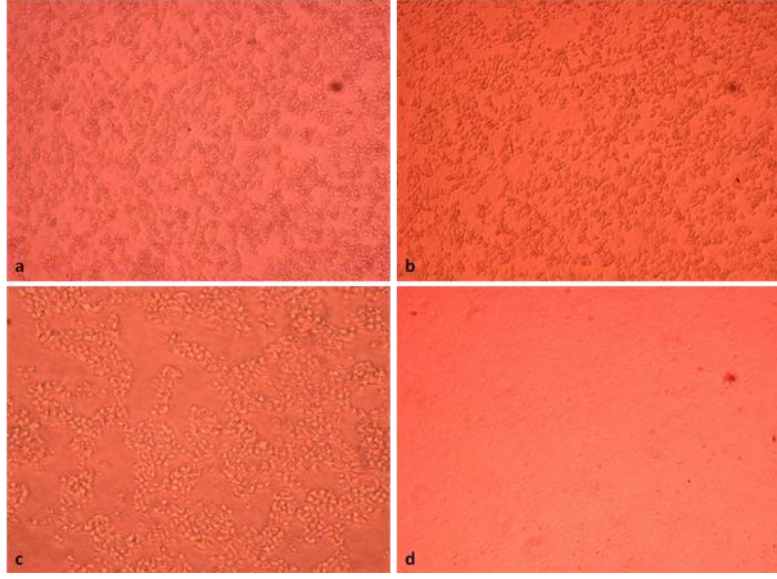
3.3. Virus izolasyonu

PCR pozitif olarak tespit edilen 52 örnekten PCR pozitifliği yüksek olan 20 adet orijinal örnek hücre kültüründe virus izolasyonu çalışmasına tabi tutuldu. Hücre kültürüne aktarılan örneklerin hepsi rektal swab'tan hazırlandı. Bu örneklere ait izolasyon detayları Çizelge 3.5'te sunuldu.

Olgu no	Dışkıdan tanısal PCR	Virus izolasyon		
		CPE	DIF	Pasaj sıvısından PCR
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	-	+	+
5	+	-	+	+
6	+	-	+	+
7	+	-	+	+
8	+	-	+	+
9	+	-	+	+
10	+	-	+	+
11	+	-	+	+
12	+	-	+	+
13	+	-	+	+
14	+	-	+	+
15	+	-	+	+
16	+	-	+	+
17	+	-	+	+
18	+	-	-	-
19	+	-	-	-
20	+	-	-	-

Çizelge 3.5: CRFK hücre kültüründe izolasyon çalışması sonuçları (5. pasaj)

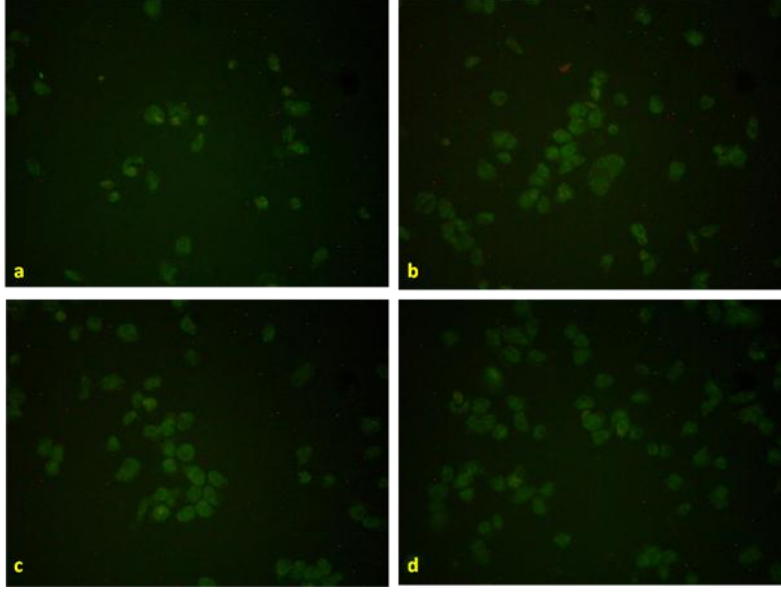
Hücre kültüründe 5 kör pasaj işlemi sonrasında 17 adet örnek hücre kültüründe CPE oluşturmazken, 3 örnek CPE meydana getirdi. Hücre kültürlerinde CPE gösteren izolatların görüntüsü Şekil 3.5'te sunuldu.



Şekil 3.5: a,b,c: CRFK hücre kültüründe CPE gösteren izolatlar, d: hücre kontrol. (Olympus CKX 41, Japan, X100)

3.4. Direkt IF testi

Öncelikle hücre kültüründe CPE meydana getiren örnekler direkt immunfloresan testine tabi tutuldu. Hücre kültüründe CPE gösteren 3 örneğin yapılan direkt IF testi sonucu örnekler Canine parvovirus -2 olarak doğrulandı. İzolatların floresan mikroskop görüntüsü Şekil 3-6'da sunuldu.



Şekil 3.6: a,b,c,d: CRFK hücre kültüründe CPE gösteren izolatların direkt IF testi ile canine parvovirus-2 olarak doğrulanması. (Nikon, eclipse TS100, Japan, X100)

4. TARTIŞMA

Parvoviruslar omurgalı ve omurgasız hayvanlarda yaygın olarak görülen patojen ajandırlar ve çok farklı hastalıklara neden olurlar. Canine parvovirus'un tip-1 ve tip-2 olmak üzere farklı antijenik özelliklere sahip tipleri bulunmaktadır. Bin dokuzyüz altmış yedi yılında CPV-1 köpeklerden izole edilmiş, ancak köpeklerde hastalık etkeni olarak kabul edilmemiştir. Bu tipte (CPV-1) enfekte olan köpeklerde çok hafif ve geçici ishaller görülebilmektedir. Köpeklerde hastalığa neden olan Canin parvovirus tip-2 dir (CPV-2) ve 1978 yılında tanımlanmış, 1980 yılına kadar hastalığa neden olan tip olarak kabul edilmiştir (Carmichael, Binn., 1981). 1979 ve 1980 yıllarında, farklı ülkelerde, CPV-2'nin antijenik bir varyantı, monoklonal antikor test yardımıyla tesbit edilmiş ve bu yeni varyant CPV-2a olarak adlandırılmıştır (Parrish ve ark., 1985). 1984 yılında virusun CPV-2b varyantı tespit edilmiş, 2000'li yıllarda ise İtalya'da virusun CPV-2c varyantı tanımlanmıştır (Buonavoglia ve ark., 2000).

Türkiye'de köpeklerde parvovirus enfeksiyonuna yönelik çalışmalar son derece kısıtlıdır (Berkin ve ark.,1981). Bin dokuzyüz yetmiş sekiz yılından beri çeşitli ülkelerde görülen köpek Parvoviral enteritilerinin Türkiye'de de bulunduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, 1980 yılında incelenen 3 köpekte (2 yavru, 1 erişkin) ve 1981 yılında incelenen 16 köpek yavrusunda parvoviral enteritis sendromu saptamışlar, enfeksiyonun, fibrinöz nekrotik veya hemorajik enteritis halinde seyrettiğini tespit etmişlerdir. Hastalık genç hayvanlarda, süt emenlere ve erişkinlere oranla daha fazla görülmüş, makroskopik ve mikroskopik bulgular daha önce saptanan köpek parvoviral enteritisi ile örtüşmüştür (Berkin ve ark., 1981).

Başka bir çalışmada Berkin ve ark. (1986) Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında Ocak 1973 ile Aralık 1984 tarihleri arasında incelenen 523 köpek otopsisine ait düzenlenen raporları değerlendirmiştir. Bu

materyallerin yıllara göre dağılımı ve hayvanların yaşı, ölüme neden olan hastalık ve çeşitli lezyonların sistemlere göre dağılımı, bulunuş oranları tablolarla açıklanmıştır. Bu çalışmada parvoviral enteritis bulunuş oranı % 7.6 olarak raporlanmıştır (Berkin ve ark., 1986).

Özkul ve ark. (2001), enteritis bulgusu sergileyen bir köpekte parvovirus varlığını PCR ile gerçekleştirilmiştir (Özkul ve ark., 2001).

Kocatürk ve ark. 2010 yılında, CPV klinik bulgularına sahip olan köpeklerde, CPV antijen test yardımıyla (6 ayın altında 43 köpekte) enfeksiyon varlığını tespit etmiş, bu köpeklerde tedaviye yönelik çalışmalarda bulunmuştur. Tedavi sırasında 23 köpek ölmüş ve 20 köpek kurtulmuştur (Kocaturk 2010). Kocatürk ve ark. 2012 yılında yaptıkları başka bir çalışmada ise parvoviral enteritis semptomlarını gösteren köpeklerde Tei-index (Miyokardiyal performans gösteren faktör) ve kardiyak biyomarkerleri değerlendirmiştir (Kocatürk ve ark., 2012).

Başka bir çalışmada Muz ve ark. 2009-2010 yılları arasında 65 evcil kedide CPV virusuna PCR ve filogenetik analiz yapmışlardır. 25 adet örnek PCR pozitif (38.4%) olarak sonuçlanmış, filogenetik değerlendirmede (17/25, 68%) CPV-2a, (8/25, 32%) CPV-2b olarak tespit edilmiştir (Muz ve ark., 2012).

Karaoğlu ve ark. ise 2013 yılında, gastroenteritis semptomu gösteren 20 adet köpeğe ait gaita örneklerine PCR testi uygulamışlar, 11 adet köpeği pozitif olarak tespit etmişlerdir. Yapılan filogenetik analiz sonucunda 2 adet örnek CPV-2a, 8 adet örnek CPV-2b ve 1 adet örnek CPV-2c olarak tespit edilmiştir. (Karaoğlu ve ark., 2013).

Çalışmamızda pozitif olguların 10 adetinin 3 aydan küçük, 15 adetinin 3-6 ay arasında ve 9 adetinin de 6 aydan büyük hayvanlara ait olduğu tespit edildi. Onsekiz adet pozitif olguya yaş tespiti yapılmadı. Yaş tespiti yapılmayan grubu göz ardı ederek hastalığın 3-6 ay arasında olan köpeklerde daha yaygın olduğu görülmektedir. Bu veriler Morais ve ark., (2007) tarafından yapılan çalışma sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Araştırmacılar çalışmalarında hasta köpeklerin yaşlarını 1-6 ay arasında tespit etmişlerdir.

Çalışmamızdaki örnekler 2013 yılında üç farklı dönemde toplanmıştır. Birinci dönem 03.03.2013 ve 20.04.2013 tarihleri arasında olmak üzere toplam 11 adettir. İkinci dönem 10.05.2013 ve 30.07.2013 tarihleri arasında olup toplam 27 adet örnek toplanmış, üçüncü dönem ise 14.09.2013 ve 27.12.2013 tarihleri arasında ve 28 adet örnek olmak üzere toplam 100 adet örneği içermektedir. Birinci dönemde PCR pozitifliği yüzde % 40.7 (11/27), ikinci dönemde % 60 (27/45) ve üçüncü dönemde % 50 (14/28) şeklindedir. Örneklem/hastalık oranının sıcak aylarda diğer aylara göre daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durumun özellikle sahipli köpeklerin sıcak havalarda dışarıda geçirdikleri sürenin uzaması ve olası enfekte köpek ve enfekte materyal ile kontakt olasılığının artmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Filogenetik ağaca bakıldığında, TR-04, TR-06, TR-10, TR-11 ve TR-15 yapılan bu analize göre CPV-2a olarak tanımlandı ve İtalya'da tespit edilen (FJ005257, GU362934, FJ005259, KF385389 ve KF385390) viruslar ile yakın genetik ilişkide oldukları saptandı. CPV-2a'da olduğu gibi tüm bu örneklerde 426'ncı pozisyonda Asparagine amino asidine rastlanmış ve bu da 1276'ncı pozisyonda (G→A) mutasyonu sonucunda meydana gelmiştir. Bu tipte tespit edilmiş köpeklerin klinik tablosuna bakıldığında orta/ağır seyirli klinik tabloya sahip oldukları görülmüş, klinik tablo ağır olsa bile birkaç gün içerisinde bu köpeklerin iyileştikleri gözlenmiştir. Çalışmada TR-10 ve TR-15 olarak adlandırılan köpekler klinik olarak orta şiddetli hastalık tablosuna sahipken, TR-

04, TR-06 ve TR-11’de kanlı ishal ve kusma tespit edilmiştir. Söz konusu köpekler tedavi yapıldıktan sonra iyileşmişler ve hastalığın prognozu iyiye gitmiştir. CPV-2a’nın CPV-2b’ye göre daha ağır klinik seyir gösterdiği ancak hastalığın prognozunun daha iyi olduğu bilimsel olarak rapor edilmiştir (Moon ve ark., 2008). Sekans analizine tabi tutulan toplam 15 adet örnekten 5 adedi CPV-2a olarak tespit edilmiş (%33) ve CPV-2b’den sonra görünme oranı olarak ikinci sırada yer almıştır. Amerika ve Çin’de de daha önce benzer bulgular rapor edilmiştir (Yanbing ve ark., 2013; Ybanez ve ark., 1995; Greenwood ve ark., 1996; Davies ve ark., 2008). Karaoğlu ve ark. 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada, Türkiye’de CPV-2a’ya CPV-2b’ye göre daha az oranda rastladıklarını bildirmişlerdir. CPV-2a olarak tespit edilen 5 adet köpeğin yaş durumuna bakıldığında ise hepsinin 6 aydan büyük olduğu görülmüştür.

TR-01, TR-02, TR-03, TR-07, TR-08, TR-09, TR12, TR13 ve TR-14 no’lu örnekler CPV-2b olarak filogenetik ağaçta yer almışlar ve Avrupa’da tespit edilen viruslarla [KF373569, FJ222823, FJ005264 (İtalya), DQ025992 (Fransa), FJ005260 (Almanya) ve KP682525 (İspanya)] yakın genetik ilişkide oldukları görülmüştür. Tüm bu örneklerde 426’ncı pozisyonda CPV-2b’lerde olduğu gibi, TR-08 ve TR-09 hariç Aspartic amino asitine rastlanmıştır. Bu çalışmada yapılan filogenetik analiz nükleotid düzeyde olduğu için, TR-08 ve TR-09’da 18’nci pozisyonda (A→T) mutasyonu sonucunda KF373569, FJ222823, FJ005264 (İtalya), DQ025992 (Fransa), FJ005260 (Almanya) ve KP682525 (İspanya) örneklerinde olduğu gibi, 147’nci pozisyonda (G→A) mutasyonu sonucunda FJ005260 (Almanya), FJ222823 (İtalya) ve KP682525 (İspanya)’da olduğu gibi ve son olarak da 426’nci pozisyonda (A→G) mutasyonu sonucunda DQ025992 (Fransa)’da olduğu gibi CPV-2b olarak yer almaktadır. Ayrıca bu tiple enfekte olan köpeklerin klinik semptomlarına bakıldığında, daha ağır ve şiddetli hastalık tablosunu göstermişlerdir. Ayrıca tespit edilen bu 9 adet CPV-2b’den, 4 köpek tedaviye yanıtızsız kalmış ve sonunda bu köpekler ölmüşlerdir. Bu durum hastalığın bu tiple enfekte olan köpeklerde başka tiplere göre daha ağır ve şiddetli bir klinik tablo ve özellikle kanlı ishal oluşturduğunu ortaya koymaktadır. CPV-2b olarak tespit edilen 9 adet köpeğin yaş durumuna bakıldığında 6 adetinin 3-6 ay aralığında, 3 adetinin ise 6 aydan büyük

olduğu belirlenmiş, hasta köpeklerin yaşının çoğunlukla 3-6 ay aralığında olduğu ve bu verinin Morais ve ark.,'nın 2007 yılında yaptıkları çalışma sonuçları ile benzerlik gösterdiği grlmştir.

Filogenetik ağaca bakıldığında bir adet rnek (TR-05) CPV-2c olarak yer almıştır ve bunun Avrupadaki çeşitli viruslar [GQ865518, GQ865519 (Yunanistan), FJ005247 (Belçika), FJ005214, FJ005246 (İspanya), FJ005237, FJ005235, FJ222821 (İtalya), FJ005199, (Almanya), DQ025942, DQ02956 (Fransa)] ile yakın genetik ilişki içinde olduğunu söyleyebiliriz. CPV-2c'nin diğer ismi daha önce de belirtildiği gibi 426-Glu olarak ifade edilmektedir. TR-05'in 1278'nci pozisyonda (T→A) mutasyonu sonucunda 426'ncı aa (Asparagine amino asit→ Glutamic amino asitte) değişmiştir ve bu da TR-05'de olduğu gibi diğer Avrupa CPV-2c'lerdeki gibi genetik yakınlık göstermesine sebep olmuştur. Ayrıca tespit edilen bu CPV2-c 8 yaşında bir erkek kangal köpeğine aittir. Bu köpek tedaviden birkaç gün sonra iyileşmiş ve hastalığın prognozu iyiye gitmiştir. Bu tipte enfekte olan köpeğin hastalık tablosuna bakıldığında, hastalığın klinik semptomlarının bu tipte daha ılımlı ve orta seyirli olduğu grlmştir. CPV enfeksiyonu genellikle genç köpeklerde çok görülmesine rağmen, son zamanlarda yetişkin köpeklerde de bir sorun haline gelmiştir (Kapil ve ark., 2007). Yetişkin köpeklerde CPV varlığı ile ilgili birkaç bilimsel rapor bulunmaktadır ki, bu da çoğunlukla CPV-2c ile ilişkilidir (Cavalli ve ark., 2001; Decaro ve ark., 2009 a, Decaro ve ark., 2008 a). Aynı şekilde Decaro ve ark., yaptıkları bir çalışmada CPV-2c ile enfekte 12 yaşında bir köpekte, ateş (40.5° C), nabız ve solunum hızlanması, kusma ve kanlı ishal ile seyreden lenfopeni tablosu görmüş ancak birkaç gün içerisinde söz konusu köpeğin kendi kendine iyileştiğini bildirmiştir (Decaro 2009 a).

Bu araştırma ile köpeklerde sirküle olan canine parvovirusun tesbiti ve moleküler karakterizasyonu, baskın tipin saptanması ve filogenetik ağaçtaki yerinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Ankara/Türkiye'de sirküle olan ve gastroenteritis semptomları ile seyreden canine parvo virus varyantı 5 adet CPV-2a,

9 adet CPV-2b, ve 1 adet CPV-2c olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre CPV-2b (% 60), CPV-2a (% 33.3) ve CPV-2c (% 6.6) olarak belirlenmiştir. Buradan da anlaşılacağı gibi CPV-2b ve 2a daha sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Dünyada da CPV-2'nin iki antijenik varyantı (CPV-2a ve CPV-2b) daha yaygın olarak görülmektedir (Truyen, 2006). CPV'un üçüncü antijenik varyantı ilk başta Glu-426'ncı amino asidin mutanti adıyla ve günümüzde CPV-2c olarak, ilk kez 2000 yılında İtalya'da (Buonavoglia ve ark., 2001) bildirilmiştir ve son dönemlerde CPV-2'nin diğer türleriyle (2-a ve 2-b) beraber İtalya'da sirküle olduğu görülmektedir (Martella ve ark., 2004; Decaro ve ark., 2006).

Bu çalışmada ayrıca CPV-2'nin Türkiye'de ilk kez hücre kültüründe izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Araştırmada ikincil amaç serolojik çalışmalarda kullanılabilen tercihen CPE meydana getiren bir virus izole edilmesiydi. PCR pozitif olarak tespit edilen 52 örnekten PCR pozitifliği yüksek olan 20 adet orijinal örnek hücre kültüründe virus izolasyonu çalışmasına tabi tutulmuştur. Hücre kültürüne aktarılan örneklerin hepsi rektal swap'tan hazırlandı. Orijinal rektal swap PCR sonucu pozitif olan ve kuvvetli bant oluşturan söz konusu 20 örnek CRFK hücre kültüründe 5 kör pasaja tabi tutulmuştur. Beş kör pasaj işlemi sırasında 3 örnek hücre kültüründe CPE meydana getirmiş, diğer örneklerde ise CPE gözlenmemiştir. Beşinci pasaj işleminden sonra son pasaj sıvısına yapılan PCR testi sonrasında 17 adet örnek PCR pozitif olarak tespit edilmiştir. Tüm örneklerin son pasaj sıvılarına yapılan direkt IF testi sonrasında ise PCR pozitif olarak değerlendirilen 17 adet örnek direkt IF testinde de CVP-2 olarak doğrulanmıştır. Üç örnekte ise yapılan kör pasajlama işlemi sırasında virüs üretilenmemiştir. Beşinci pasaj sonrasında PCR ve direkt IF testleri pozitif olarak sonuçlanan 14 adet örnek hücre kültüründe CPE oluşturmamıştır. Hücre kültüründe CPE oluşturan 3 adet izolat ise serolojik testlerde kullanıma hazır hale getirilecek değerli bir kaynak olarak yerini almıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Projede gastroenteritis semptomu gösteren ve parvovirus enteritis ön tanılı veya şüpheli toplam 100 adet köpek seçildi. Söz konusu köpeklerden alınan çeşitli tanı materyallerine moleküler tanı yöntemi olarak PCR tekniği uygulandı. Yüz köpeğe ait örnek dağılımı; 5 adet gaita, 35 adet rektal swab, 57 adet kan ve 3 adet nasal swab şeklindeydi. Projede kullanılan köpeklerin gastroenteritis semptomu göstermeleri sebebiyle gaita/rektal swab örnekleme yapılabilen kısmı % 40 ile sınırlı kaldı. Örneklenen gaitadan PCR pozitiflik oranı % 60, rektal swab'dan ise % 57.1 olarak tesbit edildi. Gösterdikleri gastroenteritis tablosu nedeniyle gaita/rektal swab örnekleme yapılamayan 60 adet (% 60) köpeğin 57 adedinden tam kan (anticoagulant'lı) ve 3 adedinden nasal swab örnekleme yapıldı. Kan örnekleme yapılan köpeklerden 28 adedi (% 49.1), nasal swab örnekleme yapılan köpeklerden ise 1 adedi (%33.3) parvovirus yönünden pozitif olarak saptandı. Elde edilen bu sonuçlar ile gastroenteritis semptomu gösteren hayvanlarda gaita ve rektal swab örnekleri tanısız anlamda önemli materyaller olarak bilirse de hastalık tablosunun ağır olduğu ve bu örnekleme yapılamadığı durumlarda kan örneklerinin (anticoagulant'lı) de tanısız amaçla kullanılabileceği söylenebilmektedir.

PCR pozitif olarak tesbit edilen 52 adet köpekten 15 adedinin PCR ürünü moleküler karakterizasyona ve filogenetik analize tabi tutuldu. Beş örnek CPV-2a, 9 örnek CPV-2b, 1 örnek CPV-2c olarak tesbit edildi. Mevcut izolatlar arasında bir takım farklılıklar olsa da araştırmada örneklenen köpeklerin klinik hastalık tablosu ile olası ilişkileri konusunda herhangi bir tespit gerçekleştirilemedi. Bu sonuç ile örnekleme yapıldığı dönemde köpeklerde sirküle olan (Ankara'da) virusun çoğunlukla CPV-2b olduğu saptandı. Filogenetik ağaçta biraraya getirilen ve bu araştırmada elde edilen verilerle Avrupa sekansları arasında yakın ilişkinin bulunduğu, genellikle genetik farklılıkların VP2 bölgesinin 426. pozisyonunda saptandığı ve buradaki

değişikliğin virusun farklı tiplerde olmasına yol açtığı tesbit edilmiştir.

Bu çalışma kapsamında hücre kültüründe sitopatolojik etki (CPE) meydana getiren ve PCR ve direkt IF testi ile doğrulanan 17 adet CPV izole edildi. Bu izolatlardan 3 adedinin sitopatojen olduğu saptandı. Bu çalışmada yapılan izolasyon Türkiye’de köpeklerde bilinen ilk yerel canine parvovirus-2 izolasyonudur ve bu izolasyon ile ileride serolojik temelli parvovirus çalışmalarına esas teşkil edecek virus da elde edilmiş olmaktadır.

6. GELECEĞE İLİŞKİN ÖNGÖRÜLEN KATKILAR

Bu çalışma ile farklı bölgelerde yapılacak çalışmalar CPV-2'ye yönelik farklı varyantların söz konusu olup olmadığı, tespit edilen CPV-2 varyantları ile klinik tablo arasındaki ilişkiler ileriki çalışmalar açısından değerli bilgiler verecektir. Yapılan çalışmada genetik farklılıkların genellikle VP2 bölgesinde 426. pozisyonda olduğu saptanmıştır. Bu pozisyonda meydana gelen değişikliklik virusun tiplendirilmesinde esas olmakta, ileride olası mutasyonlar sonucunda farklı tiplerin de ortaya çıkabileceği ihtimal dahilinde görülmektedir. CPV tiplerinden 2a ve 2b'nin tiplerinin hastalığın kliniği açısından çok fark göstermediği ancak CPV 2c'nin daha ileri yaşta hastalığa sebep olabileceği yönünde elde ettiğimiz görüş başka bir çalışma ile benzerlik göstermiştir. Ancak yapılacak ileri çalışmalar ile bu yönüyle de araştırmaya odaklanmak yararlı olacaktır.

Çalışma süresince elde ettiğimiz izolatların, hücre kültüründe ileri pasajları sonucu virusun titresini artırmak ve bunun ardından yeni nesil sekans yöntemiyle bu izolatların tüm genomunu belirlemek özellikle hücre kültüründe sitopatolojik etki yapan ve yapmayan viruslar arasındaki genetik farklılığı ve özellikle NS proteinleri yönünden karşılaştırmak önemli verilerin ortaya çıkmasını sağlayacaktır.

Söz konusu projede ayrıca hücre kültüründe CPV-2 izole edilmiştir. Bu izolasyon bilindiği kadarıyla Türkiye'de köpeklerde yapılmış ilk parvovirus 2 izolasyonudur. Mevcut CPV-2 izolatları özellikle serolojik temelli testlerin uygulanabilir hale gelmesinde çok önemli materyaller olarak önemli bir kazanımı oluşturmaktadır. Elde edilen veriler ve kazanımlar Canine parvovirus 2'ye yönelik ileri çalışmalarda kullanılacak önemli değerler olarak yerini almıştır.

ÖZET

Gastroenteritis semptomlu köpeklerde canine parvovirus tip 2'nin tespiti ve moleküler karakterizasyonu

Canin parvovirus enfeksiyonu, köpeklerin akut, fibrinli nekrotik veya hemorajik enteritis ile seyreden viral bir hastalığıdır.

Bu çalışma ile köpeklerde sirküle olan virusun tespiti ve moleküler karakterizasyonu, baskın tipin saptanması, filogenetik ağaçtaki yerinin belirlenmesi ve virusun izole edilmesi amaçlandı. Bu amaçla gastroenteritis semptomlu 100 hayvana ait çeşitli marazi maddeler alındı ve bunlardan 52 adedi PCR pozitif olarak tespit edildi. Pozitif ürünlerden 15 adedi yeni nesil sekans'a ve filogenetik analize tabi tutuldu. Beş örnek CPV-2a, 9 örnek CPV-2b, 1 örnek CPV-2c olarak tespit edildi. Hücre kültürü izolasyon çalışmaları sonucunda 3 tanesi sitopatojen nitelikli 17 adet virus izole edildi.

Anahtar kelimeler: CPV-2, filogenetik analiz, izolasyon, sekans.

SUMMARY

The Detection and Molecular Characterization of Canine Parvovirus Type-2 in Dogs with Gastroenteritis Symptoms

Summary: Canine parvovirus infection is a viral disease on dog's, that characterized by acute necrotic fibrinous and hemorrhagic enteritis.

In this study, identification, molecular characterization of the virus that is circulating in dogs, determine the dominant type of virus, determining the location of the phylogenetic tree and finally virus isolation was aimed. For this purpose, 100 sample was taken from dogs with gastroenteritis symptoms and 52 of them were identified as PCR positive. 15 positive products were taken for new generation sequence and subjected to phylogenetic analysis. Five sample CPV-2a, 9 sample CPV-2b, 1 sample CPV-2c were. A total of 17 CPV were isolated in this study. Three of them were found cytopathic in CRFK cells.

Keywords: CPV-2, phylogenetic analysis, isolation, sequencing.

KAYNAKLAR

ABDEL-LATIF L, MURRAY BK, RENBERG RL, O'NEILL KL, PORTER H, et al. (2006) Cell death in bovine parvovirus-infected embryonic bovine tracheal cells is mediated by necrosis rather than apoptosis. *The Journal of general virology* **87**: 2539.

ANONIM1: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>, Erişim tarihi: 11.10.2014.

ANONIM 2: https://web.stanford.edu/group/virus/parvo/2000/cat_dog_parvovirus.html Erişim tarihi: 11.08.2015.

ANONIM 3: http://ictvdb.bio-mirror.cn/Ictv/fs_parvo.htm. Erişim tarihi: 11.10.2014.

ANONIM4: <http://www.mcb.uct.ac.za/cann/335/Parvoviruses.html>, Erişim tarihi:11.10.2014.

ANONIM 5: http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/199.html#tab7 Erişim tarihi: 05.08.2015.

ANONIM 6: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Erişim tarihi: 05.08.2015.

APPEL, M.J.G., COOPER, B.J., GREISEN, H., SCOTT, F.W., CARMICHAEL, L.E., (1979). Canine viral enteritis. I. Status report on corona and parvo-like viral enteritides. *Cornell Vet.* **69**, 123–133.

- APPLE MJ, SCOTT FW, CARMICHAEL LE (1979). Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.* **105(8)**:156- 159.
- BASAK S. AND R. W. COMPANS, J. (1989) Polarized entry of canine parvovirus in an epithelial cell line. *Virology*. **63**, **3164**.
- BATTILANI, M., BASSANI, M., FORTI, D., MORANTI, L., (2006). Analysis of the evolution of feline parvovirus (FPV). *Vet. Res. Commun.* **30**, 223–226.
- BELLAMY COC. p53 and apoptosis. *Br Med Bull* (1996); **53(3)**: 522-38.
- BERKIN Ş, ALÇIĞIR (1986) :1973-1984 periyodunda incelenen 523 köpeğin post mortem bulguları üzerinde survey çalışma. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **31**,153-164.
- BERKIN Ş, MILLI ÜH, URMAN HK (1981): Türkiye’de köpeklerde parvoviral enteritisler *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **28**, 36-49.
- BERNS KI., M BERGOIN, BLOOM M, LEDERMAN M, MUZYCZKA N, SIEGL GJ. TAL, and TATTERSALL P. (1995). Parvoviridae. *Arch. Virol. Suppl.* **10**:169–178.
- BINN LN, LAZER BC, EDDY GA, KAJIMA M (1970). Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infect. Immune.* **1(5)**: 503-508.
- BINN, L.N., LAZAR, E.C., EDDY, G.A., KAJIMA, M.: Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infect. Immun.*, (1970); **1**: 503-508.

BOUNAVOGLIA C, MARTELLA V, PRATELLI A, TEMPESTA M, CAVALLI A, BUONAVOGLIA D, BOZZO G, ELIA G, DECARO N, CARMICHAEL L (2001). Evidence for evolution of canine parvovirus type 2c in Italy. *J. Gen. Virol.* **82(12)**: 3021-3025.

BUONAVOGLIA C, MARTELLA V, PRATELLI A, TEMPESTA M, CAVALLI A, BUONAVOGLIA D, et al. (2000) Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. *J Gen Virol.* **2001;82**:3021-5.

BURTONBOY, G., COIGNPUL, F., DELFERRIERE, N. PASTORET, P. (1979). Canine hemorrhagic enteritis: detection of viral particles by electron microscopy. *Archives of virology* **61**, 1-11.

CABADAK H. Hücre siklusu ve kanser, ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi (2008); **9(3)** : 51 – 61

CARMICHAEL LE. BINN LN. (1981). New enteric viruses in the dog. *Advances in Veterinary science and Comparative Medicine* **25**, 1-37.

CARMICHAEL LE., SCHLAFLER DH., AND HASHIMOTO A. (1991). Pathogenicity of minute virus of canines (MVC) for the canine fetus. *Cornell Vet.* **81**, 151–171.

CARMICHAEL LE., SCHLAFLER DH. HASHIMOTO A. (1994). Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **6**, 165-174.

CARMICHAEL LE., (2005). An annotated historical account of canine parvovirus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **52**, 303–311.

- CARMICHAEL LE., 1994. Canine parvovirus type-2. An evolving pathogen of dogs. *Ann . Vet. Med.* **135**,459-464.
- CARMICHAEL L.E.: Neonatal viral infections of pups: Canine herpesvirus and minute virus of canines (canine parvovirus-1). (1999) .In: Carmichael, L. Ed. *Recent advances in canine infectious diseases*. International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA, www.ivis.org/,
- CASPAR A. and KLUG DLC, *Physical principles in the construction of regular viruses* (1962). *Cold Spring Harbor Symp.* 27:1-24, Published : CC/NUMBER 4 JANUARY 23, 1984.
- CAVALLI A, MARTELLA V, DESARIO C, CAMERO M, BELLACICCO AL, PALO PD, DECARO N, ELIA G, BUONAVOGLIA C., (2008). Evaluation of the antigenic relation ship among the canine parvovirus (CPV-2) Variants. *Clin Vaccine Immunol* **15**:534-539.
- CAVALLI A., BOZZO G., DECARO N., TINELLI A., ALIBERTI A., BUONAVOGLIA D., (2001). Characterization of a canine parvovirus strain isolated from an adult dog. *New Microbiol.* **24**, 239–242.
- CESAR AD. PEREIRA, TELMA A. MONEZI, DOLORES U. MEHNERT, MAGALI D'ANGELO, EDISON L. DURIGON. (2000) Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Veterinary Microbiology* **75127**-133.
- CHEN EI (2012) Mitochondrial dysfunction and cancer metastasis. *J Bioenerg Biomembr* **44**: 619–622.
- CHO HS., KANG JI., PARK NY., (2006). Detection of canine parvovirus in fecal samples using loop-mediated isothermal amplification. *J. Vet. Diagn.*

- CHOWDHURY SK, SMITH DR, FERNYHOUGH P (2013) The role of aberrant mitochondrial bioenergetics in diabetic neuropathy. *Neurobiol Dis* **51**: 56–65.
- CHRISTENSEN J, COTMORE SF, TATTERSALL P. (1997). A novel cellular sitespecific DNA-binding protein cooperates with the viral NS1 polypeptide to initiate parvovirus DNA replication. *J. Virol.* **71**:1405–1416.
- CLINTON G. M. AND M. HAYASHI, The parvovirus MVM: a comparison of heavy and light particle and their density conversion invitro. (1976) *Virology* **74**, 57.
- COTMORE SF. and TATTERSALL P, *ibid.* (1989). An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication. **63**, 3902.
- COTMORE SF, TATTERSALL P. (1988). The NS-1 polypeptide of minute virus of mice is covalently attached to the 5' termini of duplex replicative-form DNA and progeny single strands. *J. Virol.* **62**:851–860.
- COTMORE SF, TATTERSALL P. (1998). High-mobility group 1/2 proteins are essential for initiating rolling-circle-type DNA replication at a parvovirus hairpin origin. *J. Virol.* **72**:8477–8484.
- COTMORE SF AND TATTERSALL P. (1987). The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* **33**:91–174.
- DECARO N, ELIA G, MARTELLA V, CAMPOLO M, DESARIO C, CAMERO M, et al. (2006) Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *J virol Methods.*; **133**:92-9.

DECARO NICOLA, COSTANTINA DESARIO, DIANE D. ADDIE, VITO MARTELLA, MARIA JOAO VIEIRA, GABRIELLA ELIA, ANGELIQUE ZICOLA, CHRISTOPHER DAVIS, GERTRUDE THOMPSON, ETHIENNE THIRY, UWE TRUYEN, and CANIO BUONAVOGLIA. Molecular Epidemiology of Canine Parvovirus, Europe. *Emerging Infectious Diseases* , www.cdc.gov/eid , Vol. **13**, No. **8**, August (2007).

DECARO N., CAMPOLO M., DESARIO C., ELIA, G., MARTELLA V., LORUSSO E., BUONAVOGLIA C., (2005a). Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biologicals* **33**, 259–265.

DECARO N., CIRONE F., DESARÍO C., ELIA G., LORUSSO E., COLAIANNI M.L., MARTELLA V., BUONAVOGLIA C., (2009a). Severe parvovirus in a 12-yearold dog that had been repeatedly vaccinated. *Vet. Rec.* **164**, 593–595.

DECARO N., DESARIO C., CAMPOLO M., ELIA G., MARTELLA V., RICCI D., LORUSSO E., BUONAVOGLIA C., (2005b). Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J. Vet. Diagn. Invest.* **17**, 133–138.

DECARO N., DESARIO C., ELIA G., MARTELLA V., MARI V., LAVAZZA A., NARDI M., BUONAVOGLIA C., (2008a). Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiol.* **31**, 125–130.

DECARO N., DESARIO C., MICCOLUPO A., CAMPOLO M., PARISI A. MARTELLA V., Amorisco, F., Lucente, M.S., Lavazza, A., Buonavoglia, C., (2008c). Genetic analysis of feline panleukopenia viruses from cats with gastroenteritis. *J. Gen. Virol.* **89**, 2290–2298.

- DECARO N., DESARIO C., PARISI A., MARTELLA V., LORUSSO A., MICCOLUPO A., MARI V., COLAIANNI M.L., CAVALLI A., DI TRANI L., BUONAVOGLIA C., (2009b). Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. *Virology* **385**, 5–10.
- DECARO N., ELIA G., MARTELLA V., DESARIO C., CAMPOLO M., DÌ TRANÌ L., TARSITANO E., TEMPESTA M., BUONAVOGLIA C., (2005d). A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 DNA in the feces of dogs. *Vet. Microbiol.* **105**, 19–28.
- DECARO N., MARTELLA V., ELIA G., DESARIO C., CAMPOLO M., LORUSSO E., COLAIANNI ML., LORUSSO A., BUONAVOGLIA C., (2007c). Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs. *Vet. Microbiol.* **121**, 39–44.
- DESARIO C., DECARO N., CAMPOLO M., CAVALLI A., CIRONE F., ELIA G., MARTELLAV., LORUSSO E., CAMERO M., BUONAVOGLIA C., (2005). Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *J. Virol. Methods* **121**, 179–185.
- EINARI A. NISKANEN, OLLI KALLIOLINNA, TEEMU O. IHALAINEN, MILLA HAKKINEN, MAIJA VIHINEN RANTA. (2013) Mutations in DNA Binding and Transactivation Domains Affect the Dynamics of parvovirus NS protein. *Journals ASM.org, JVI American Society for Microbiology*. Doi:[10.1128/JVI.01678-13](https://doi.org/10.1128/JVI.01678-13).
- EL-BACHA T, DA POIAN AT (2013) Virus-induced changes in mitochondrial bioenergetics as potential targets for therapy. *Int J Biochem Cell Biol* **45**: 41–46.

- ELIA G., CAVALLI A., DESARIO C., LORUSSO E., LUCENTE M.S., DECARO N., MARTELLA V., BUONAVOGLIA C., (2007). Detection of infectious canine parvovirus type 2 by mRNA real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* **146**, 202–208.
- FREDERICK A. MURPHY, E. PAUL J. GIBBS, MARIAN C. HORZINEK, MICHAEL J. *Veterinary Virology (Third Edition)*. **Studdert page 343-353.**
- GALLUZZI L, KEPP O, KROEMER G (2012) Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 780–788.
- GORBALENYA AE, KOONIN EV, WOLF YI. (1990). A new superfamily of putative NTP-binding domains encoded by genomes of small DNA and RNA viruses. *FEBS Lett.* **262**:145–148.
- GORBALENYA AE, KOONIN EV. (1993). Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**:419–429.
- GREENE CE, CARMICHAEL LE. (2006). Canine herpesvirus infection. I: Greene CE ed. *Infectious diseases of the dog and cat.. Philadelphia: WB Saunders* **3rd ed.** 47-53.
- GREENWOOD NM., CHALMERS WSK., BAXENDALE W. & THOMPSON H. (1996). Comparison of isolates of canine parvovirus by monoclonal antibody and restriction enzyme analysis. *Veterinary Record* **138**, 495-496.
- HALL TA (1999) : BioEdit; a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.* **41**:95-98

HARRISON LR., STYER EL., PURSELL AR., CARMICHAEL LE and NIETFELD JC. (1992). Fatal disease in nursing puppies associated with minute virus of canines. *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**, 19–22.

HASHIMOTO A., TAKIGUCHI M., HIRAIK., KIDA H., CARMICHAEL LE.: A serological survey of minute virus of canines (MVC; canine parvovirus type-1) in dogs in the Tokai area of Japan. *Jpn. J. Vet. Res.* (2009; **49**: 249-253.

HE X, ZHOU A, LU H, CHEN Y, HUANG G, et al. (2013) Suppression of mitochondrial complex I influences cell metastatic properties. *PLoS One* **8**: e 61677.

HEEGAARD ED, BROWN KE (2002) Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev* **15**: 485–505.

HIRAYAMA K, KANO R, HOSOKAWA K, TUCHIYA K, TSUYAMA S, NAKAMURA Y, SASAKI Y, and HASEGAWA A. (2004). VP2 Gene of a canine parvovirus isolate from stool of a puppy. *Japanese Society of Veterinary Science, Tokyo, Japan.*

HIRAYAMA K, KANO R, KANAI TH, TUCHIYA K, TSUYAMA S, NAKAMURA Y, SASAKI Y, HASEGAWA A., 2005. VP2 gene of a canine parvovirus isolate from stool of a puppy. *J Vet Med Sci* **67**:139-143.

H.S. MOON, S.A. LEE, R. CHOI, S.Y. JEOUNG, D. KIM, C. HYUN, (2008) *Vet microbiol.* **131**, 47.

HUEFFER K., PARRISH CR., (2003). Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 392–398.

- HUTTEMANN M, LEE I, PECINOVA A, PECINA P, PRZYKLENK K, et al. (2008) Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. *J Bioenerg Biomembr* **40**: 445–456.
- HÜSEYİN YILMAZ . Kedi ve Köpek Hastalıkları. (1998). EDİTÖR Prof. Dr. Yılmaz İmren sayfa 367-368.
- IKEDA Y, SHINOZUKA J, MIYAZAWA T, KUROSAWA K, IZUMIYA Y, et al. (1998) Apoptosis in feline panleukopenia virus-infected lymphocytes. *Journal of virology* **72**: 6932. Invest. 18, 81–84.
- JAMES T. ROBINSON, HELGA THORVALDSDOTTIR. WENDY WINCKLER, MITCHELL GUTTMAN, ERIC S. LANDER, GAD GETZ, JILL P. MERISOV (2011). Integrative Genomics Viewer. *Nature Biotechnology* **29**, 24-26.
- JARPLID B., JOHANSSON H., CARMICHAEL LE.: A fatal case of pup infection with minute virus of canines (MVC). *J. Vet. Diagn. Invest.*, (1996); **8**: 484-487.
- JOHN SL. PARKER, WILLIAM J. MURPHY, DAI WANG, STEPHEN J. O'BRIEN, AND COLIN R. PARRISH. Canine and Feline Parvoviruses Can Use Human or Feline Transferrin Receptors To Bind, Enter, and Infect Cells. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 0022-538X/01/\$04.0010 DOI: **10.1128/JVI.75.8.3896–3902**. 2001 Apr. 2001, p. 3896–3902
- JOHNSON R H. SPRADBROW PB. (1979). Isolation from dogs with severe enteritis of a parvovirus related to feline panleucopaenia virus. *Australian Veterinary Journal* **55**, 151.

- JONGENEEL CV., R. SAHLI GK. MC MASTER B. HIRT J. (1986). A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *Virology*. **59**, 564.
- JONNA NYKKY, MATTI VUENTO, LEONA GILBERT. (2014) Role of Mitochondria in Parvovirus Pathology. *PLoS ONE* **9(1)**: e86124. doi:10.1371/journal.pone.0086124.
- KAPIL S., COOPER E., LAMM C., MURRAY B., REZABEK G., JOHNSTON RD, L., CAMPBELL G., JOHNSON B., (2007). Canine parvovirus types 2c and 2bcirculating in North American dogs in 2006 and 2007. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 4044–4047.
- KARAOGLU T, GARGARI S, OZKUL A (2013). Detection and first molecular characterization of Canine parvovirus (CPV) on dogs in Turkey. 5Th European Congress of Virology. September 11-14. 2013, Lyon, Fransa.
- KELLY DC and ELLIOT RMJ (1997). Polyamines contained by two denonucleosis viruses. *Virology*. **21**, 408
- KELLY WR (1978). An enteric disease of dogs resembling feline panleucopaenia. *Australian Veterinary Journal* **54**, 593.
- KIVOVICH V, GILBERT L, VUENTO M, NAIDES SJ (2010) Parvovirus B19 genotype specific amino acid substitution in NS1 reduces the protein's cytotoxicity in culture. *Int J Med Sci* **7**: 110–119.
- KOCATURK M, MARTINEZ S, ERALP O, TVARIJONAVICIUTE A, CERON J, YILMAZ Z. (2010). Prognostic value of serum acute-phaseproteins in dog with parvoviral enteritis. *J Small Anim Pract* 2010 **51(9)**:478-83. doi: 10.1111/j.1748-5827.2010.00965.x.

- KOCATURK M, MARTINEZ S, ERALP O, TVARIJONAVICIUTE A, CERON J, YILMAZ Z. (2012) Tei index (myocardial performance index) and cardiac biomarkers in dogs with parvoviral enteritis. *Res Vet Sci.* 2012 Feb; **92(1)**: 24-9. doi: 10.1016/j. Rvsc. 2010. Epub 2010 Nov 11.
- KORNBERG A. AND BAKER TA. (1991). DNA replication. W.H. Freeman, New York. Kotin, R.M., J.C. Menninger, D.C. Ward, and K.I. Berns. 1991. Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13- qter. *Genomics* **10**: 831-834.
- KUMAR M, NANDI S (2010). Development of a SYBR Green based real-time PCR assay for detection and quantitation of canine parvovirus in faecal samples. *J. Virol. Methods* **169**, 198–201.
- LEGENDRE D, ROMMELAERE J. (1994). Targeting of promoters for trans activation by a carboxy-terminal domain of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **68**:7974–7985.
- LIN MT, BEAL MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**: 787–795.
- LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL, MATSUDAIRA P, BALTIMORE D, DARNELL JE. (2000) *Molecular Cell Biology*. **4 edition**:WH Freeman and Co, NewYork,.
- MACARTNEY L, MCCANDLISH IA, THOMPSON H, CORNWELL HJ (1984) Canine parvovirus enteritis 2: Pathogenesis. *Vet Rec* **115**: 453–460.
- MACARTNEY L., PARRISH CR., BINN LN., and CARMICHAEL LE. (1988). Characterization of minute virus of canines (MVC) and its pathogenicity for pups. *Cornell Vet.* **78**, 131–145.

- MARTELLA V, CAVALLI A, BOZZO G, CAMERO M, BUONAVOGLIA D, et al. A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. *J Clin Microbiol.* (2004); **42**:1333-6.
- MARTELLA V, DECARO N, BUONAVOGLIA C. Genetic variation of CPV-2 and amilication for antigenic/genetic characterization. *Virus Genes.* (2006) ;**33**:11-3.
- MITESH MITTAL, SOUMENDU CHAKRAVARTI, J.K. MOHAPATRA, P.K. CHUG, RAHUL DUBEY, VIKRAMADITYA UPMANUYU, P.S. NARWAL, ANIL KUMAR, C.P. CHURAMANI, N.S. KANWAR. (2014). Molecular typing of canine parvovirus strains circulating from 2008 to 2012 in an organized kennel in India reveals the possibility of vaccination failure. *Infection, Genetics Evolution* **23**: 1-6.
- MOCHIZUKI M, HARASAWA R, NAKATANI H (1993). Antigenic and genomic variabilities among recently prevalent parvoviruses of canine and feline origin in Japan. *Vet. Microbiol.* **38(1-2)**: 1-10.
- MOCHIZUKI M., HARASAWA R., NAKATAMI H., (1993a). Antigenic and genomic variabilities among recently parvoviruses of canine and feline origin in Japan. *Vet. Microbiol.* **38**, 1-10.
- MOCHIZUKI M., HASHIMOTO M., HAJIMA T., TAKIGUCHI M., HASHIMOTO A., UNE Y., ROERINK F., OHSHIMA T., PARRISH CR., CARMICHAEL LE.: Virologic and serologic identification of minute virus of canines (canine parvovirus type-1) from dogs in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, (2002); **40**: 3993-3998.
- MODICA-NAPOLITANO JS, SINGH KK (2004) Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion* **4**: 755–762.

- MOFFATT S, YAEGASHI N, TADA K, TANAKA N, SUGAMURA K (1998)
Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis
in erythroid lineage cells. *Journal of virology* **72**: 3018.
- MOHAN RAJ J, MUKHOPADHYAY HK, THANISLASS J, ANTONY
PX, PILLAI RM.(2010): Isolation, molecular characterization and
phylogenetic analysis of canine parvovirus. *Infect Genet Evol*,
10(8):1237-4.
- MORAIS M.P., COSTA PR., (2007). Parvoviridae. In: Flores, E.F. (Ed.), *Virologia
Veterinária*. Ed. da UFSM, Santa Maria, pp. 388–392.
- MOUW M, PINTEL DJ. (1998). Amino acids 16–275 of minute virus of mice NS1
include a domain that specifically binds (ACCA)₂₋₃-containing DNA.
Virology **251**:123–131.
- MUNGER J, BAJAD SU, COLLER HA, SHENK T, RABINOWITZ JD (2006)
Dynamics of the cellular metabolome during human cytomegalovirus
infection. *PLoS Pathog* **2**: e132.
- MURGIA M, GIORGI C, PINTON P, RIZZUTO R (2009) Controlling metabolism
and cell death: at the heart of mitochondrial calcium signalling. *J Mol
Cell Cardiol* **46**: 781–788.
- MUZ D., OĞUZOĞLU TC., TIMURKAN MO., AKIN H. (2012): Characterization
of the partial VP2 gene region of Canine Parvoviruses in domestic
cats from Turkey. *Virus Genes* doi: **10.1007/s11262-011-0703-8**,
2012, 44, 301-308.
- MUZYCZKA N., BERNIS KI., (2001). Parvoviridae: The Viruses and Their
Replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*.

4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 2327–2359.

NAKAMURA M, TOHYA Y, MIYAZAWA T, MOCHIZUKI M, PHUNG HT, NGUYEN NH, et al. A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch Virol.* (2004) ;**149**:2261-9.

NEUERER FF., HORLACHER K., TRUYEN U., HARTMANN K., (2008). Comparison of different in-house test systems to detect parvovirus in faeces of cats. *J. Feline. Med. Surg.* **10**, 247–251.

NICOLA DECARO, CANIO BUONAVOGLIA. (2012) Canine parvovirus—A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Journal of Homeopathe: www.elsevier.com/locate/vetmic.* *Veterinary Microbiology* **155** 1–12.

NUESCH JP, COTMORE SF, TATTERSALL P. (1995). Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine. *Virology* **209**:122–135.

NUESCH JP, ROMMELAERE J (2007) A viral adaptor protein modulating casein kinase II activity induces cytopathic effects in permissive cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 12482.

NYKKY J, TUUSA JE, KIRJAVAINEN S, VUENTO M, GILBERT L (2010) Mechanisms of cell death in canine parvovirus-infected cells provide intuitive insights to developing nanotools for medicine. *Int J Nanomedicine* **5**: 417–428.

- OHTA A, NISHIYAMA Y (2010) Mitochondria and viruses. *Mitochondrion* **11**: 1–12.
- ÖZKUL A, KELEŞ I, KARAOĞLU T, ÇABALAR M, BURGU I. Detection and RFLP Analysis of Canine Parvovirus (CPV) DNA by Polymerase Reaction (PCR) in Dog. 2001 *Turk J Vet Anim Sci* **26** 1201-1203.
- PALERMO LM., HAFENSTEIN SL., PARRISH CR., (2006). Purified feline and canine transferrin receptors reveal complex interactions with the capsids of canine and feline parvoviruses that correspond to their host ranges. *J. Virol.* **80**, 8482–8492.
- PARKER JSL., and PARRISH CR. (2000). Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J. Virol.* **74**:1919–1930.
- PARRISH CR, AQUADRO CF, STRASSHEIM ML, EVERMANN JF, SGRO J-Y, MOHAMMED HO (1991). Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J Virol.* **65**:6544-52.
- PARRISH CR, HAVE P, FOREYT WJ, EVERMANN JF, SENDA M, CARMICHAEL LE (1988). The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *J. Gen. Virol.* **69(5)**: 1111-1116.
- PARRISH CR, O'CONNELL PH, EVERMANN JF, CARMICHAEL LE (1985). Natural variation of canine parvovirus, *science*, **230 (4729)**: 1046-1048.
- PARRISH CR. (1991). Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones. *Virology* **183**, 195-205.

- PARRISH CR. 1995. Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Baillie`re's Clin. Haematol.* **8**:57–71.
- PARTHIBAN S, MUKHOPADHYAY HK, PANNEER D, ANTONY PX, PILLAI RM. (2011): Isolation and Typing of canine parvovirus in CRFK cell line in puducherry, South India. *Indian J Microbiol* **51(4)**:456-460.
- PEREIRA CA., MONEZI TA., MEHNERT DU., D'ANGELO M. & DURIGON EL. (2000). Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Veterinary Microbiology* **75**, 12-133.
- PEREZ R, FRANCIA L, ROMERO V, MAYA L, LOPEZ I, HERNANDEZ M. First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet Microbiol.* (2007); (Epub ahead of print).
- POLLOCK RVH, CARMICHAEL LE (1990) The Canine Parvoviruses. In: Tijssen P, editor. *CRC handbook of parvoviruses*. Boca Raton: CRC Press Inc. pp. 113–134.
- POLLOCK RV., CARMICHAEL LE., (1982). maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline and interference with vaccination. *J. Vet. Med. Assoc.* **180**, 37-42.
- POLLOCK RV., (1982). Experimental canine parvovirus infection in dogs. *Cornell. Vet.* **72**, 103–119.
- POOLE BD, KARETNYI YV, NAIDES SJ (2004) Parvovirus B19-induced apoptosis of hepatocytes. *J Virol* **78**: 7775–7783.
- PRATELLI A., BUONAVOGLIA D., TEMPESTA M., GUARDA F., CARMICHAEL LE., BUONAVOGLIA C.: Fatal canine parvovirus

type-1 infection in pups from Italy. *J. Vet. Diagn. Invest.*, (1999); **11**: 365-367.

RANZ AI., MANCLUS JJ., DIAZ-AROCA E, CASAL JI, GEN J. (1989). Porcine parvovirus: DNA sequence and genome organization. *Virology* **70**, 2541.

RASOLA A, BERNARDI P (2007) The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* **12**: 815–833.

RAYET B, LOPEZ-GUERRERO JA, ROMMELAERE J, DINSART C (1998) Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. *Journal of virology* **72**: 8893.

REED AP, JONES EV, MILLER TJ. (1988). Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J. Virol.* **62**:266–276.

REED EV. JONES AP., MILLER TJ. (1988) Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *Ibid J Virol.* 1988 Jan; **62(1)**: 266–276.

REMOND M., BOIREAU P., LEBRETON F., (1992). Partial DNA cloning and sequencing of a canine parvovirus vaccine strain: application of nucleic acid hybridization to the diagnosis of canine parvovirus disease. *Arch. Virol.* **127**, 257–269.

RHODE III S. L., J. (1985) trans-Activation of parvovirus P38 promoter by the 76K noncapsid protein. *Virology* **54**, 630.

S. PARTHIBAN , HIRAK KUMAR MUKHOPADHYAY, D. PANNEER, P.X.ANTONY, R.M. PILLAI., 2011. Isolation and Typing of Canine

Parvovirus in CRFK Cell Line in Puducherry, South India. *Indian J Microbiol.* 2011 Oct; **51(4)**: 456–460.

SAGAZIO P., TEMPESTA M., BUONAVOGLIA D., CIRONE F. & BUONAVOGLIA C. (1998). Antigenic characterization of canine parvovirus strains isolated in Italy. *Journal of Virological Methods* **73**, 197±200.

SAITOU N AND NEI M. (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**:406-425.

SAXENA L, KUMAR GR, SAXENA S, CHATURVEDI U, SAHOO AP, et al. (2013) Apoptosis induced by NS1 gene of Canine Parvovirus-2 is caspase dependent and p53 independent. *Virus Res* **173**: 426–430.

SCHMITZ S., COENEN C., KONIG M., THIEL HJ., NEIGER R., (2009). Comparison of three rapid commercial canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* **21**, 344–345.

SERHAT TORUN. ZEKI YILMAZ. (2005) Annamaria PRATELLI, Aserological evidence of Minute virus of canines (MVC; Canine Parvovirus Type-1) in dogs in turkey. *Turk J Vet Anim Sci* **29**, 923-925, TÜBİTAK.

SETH RB, SUN L, EA CK, CHEN ZJ (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**: 669–682.

SHACKELTON LA., PARRISH CR., TRUYEN U., HOLMES EC., (2005). High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 379–384.

- SIVITZ WI, YOREK MA (2010) Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* **12**: 537–577.
- SPIBEY N., GREENWOOD NM., SUTTON D., CHALMERS WS., TARPEY I., (2008). Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet. Microbiol.* **128**, 48–55.
- STEINEL A, VENTER EH, VAN VURREN M, PARRISH CR, TRUYEN U (1998). Antigenic and genetic analysis of canine parvoviruses in southern Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **65(4)**: 239-242.
- TAMURA K AND NEI M. (1993): Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10**:512-526.
- TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A AND KUMAR S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725-2729.
- TATTERSALL P. and GARDINER EM, in *Handbook of Parvoviruses*, P. Tijssen, Ed. (CRC Press, Boca Raton, FL, 1990), vol. **1**, pp. 111-122; P. Tattersall and S. F. Cotmore, in *ibid.*, pp. 123-140.
- TATTERSALL P. and COTMORE SF., in *Parvoviruses and Human Disease*, J. R. Pattison, Ed. (CRC Press, Boca Raton, FL, 1988), pp. 5-41.
- TATTERSALL P., BERGOIN M., BLOOM ME., BROWN KE., LINDEN RM., MUZYCZKA N., PARRISH CR., TIJSSSEN P., (2005). Family Parvoviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy: VIIIth Report of*

the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press.

TATTERSALL P., SHATKIN A. J. (1977). Sequence homology between the structural polypeptides of minute virus of mice. Ward, J. Mol. Biol. **111**, 375

TATTERSALL. (1995). Parvovirus DNA replication Arch. Virol. Suppl. **10**: 169-178.

TJISSEN P. 1990. Handbook of parvoviruses, vol. 1 and vol. 2. CRC Press, Boca Raton, Florida.

TRUYEN U, EVERMANN JF, VIELER E, PARRISH CR (1996). Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. Virology, **215(2)**: 186-189.

TRUYEN U. Evolution of canine parvovirus –a need for new vaccines. Vet Microbiol. (2006); **117**:9-13.

TRUYEN U., and PARRISH CR.. (1992). Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. J. Virol. **66**:5399–5408.

TRUYEN U., GRUENBERG A., CHANG SF., OBERMAIER B., VEIJALAINEN P. PARRISH CR. (1995). Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. Journal of Virology **69**. 4702-4710.

TRUYEN U., PLATZER G. & PARRISH CR. (1996). Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. Veterinary Record **138**, 365±366.

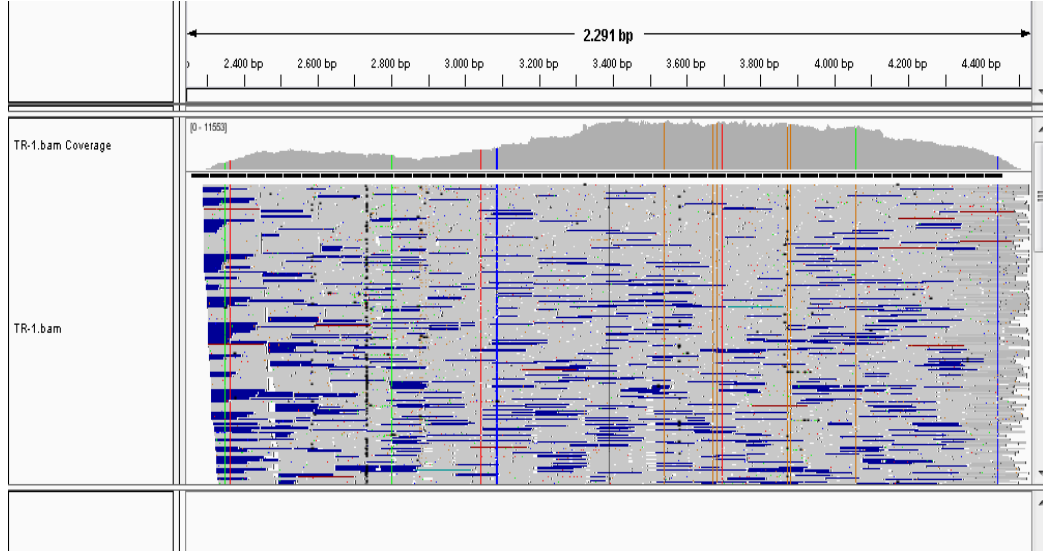
- TRUYEN U., STEINEL A., BRUCKNER L., LUTZ H. & MOSTL K. (2000). Distribution of antigen types of canine parvovirus in Switzerland, Austria and Germany. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* **142**, 115±119 (in German).
- TRUYEN U., WOLF G., CARMICHAEL LE.: The "other" parvovirus: first description of the minute virus of canines (Canine parvovirus type 1) in Germany. *Tierarztl. Prax.*, (1996); **24**: 511-513.
- VERMEULEN K, BERNEMAN ZN, VAN BOCKSTAELE DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif* 2003; **36**: 165-75.
- VIHINEN-RANTA M., YUAN W., and PARRISH CR. (2000). Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport. *J. Virol.* **74**:4853–4859.
- WANER T, MAZARS, NACHIMAS E, KEREN-KORNBLATT E, HARRUS S., (2003). Evaluation of a dot ELISA kit form easuring immunoglobulin M antibodies to canine parvovirus and distemper virus. *Vet Rec* **152**:588-591.
- WANG D, YUAN W, DAVIS I, PARRISH CR. (1998). Nonstructural protein-2 and the replication of canine parvovirus. *Virology* **240**:273–281.
- WILLIAMSON CD, DEBIASI RL, COLBERG-POLEY AM (2012) Viral product trafficking to mitochondria, mechanisms and roles in pathogenesis. *Infect Disord Drug Targets* **12**: 18–37.
- WILSON GM, JINDAL HK, YEUNG DE, CHEN W, ASTELL CR. (1991). Expression of minute virus of mice major nonstructural protein in insect cells: purification and identification of ATPase and helicase activities. *Virology* **185**:90–98.

YBANEZ RR, VELA C, CORTES E, SIMARRO I, CASAL JI (1995). Identification of types of canine parvovirus circulating in Spain. *Vet. Rec.* **136**(7): 174-175.

YANBING ZHAO, YAN LIN, XUJIAN ZENG, CHENGPING LU and JIAFA HOU (2013), Genotyping and pathobiologic characterization of canine parvovirus circulating in Nanjing, China Zhao et al. *Virology Journal* **10**:272.

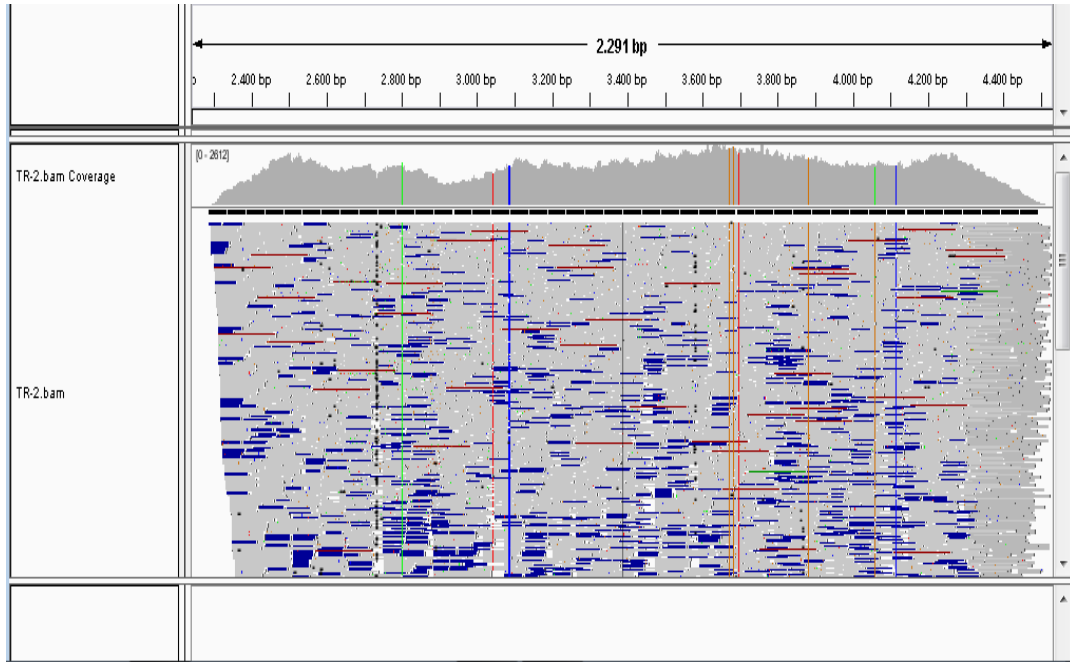
ZHONG Z, LIANG L, ZHAO J, XU X, CAO X, LIU X, ZHOU Z, REN Z, SHEN L, GENG Y, GU X, PENG G. (2014): First isolation of new canine parvovirus 2a from Tibetan mastiff and global analysis of the full-length VP2 gene of canine parvoviruses 2 in China. *Int J Mol Sci*, **15**(7):12166-87.

Ek-1: Örneklerin yeni nesil sekans İGV progremleriyle görüntüsü ve fasta formatları



İGV 2.3. Programı. Bam dosyası. (TR-1)TR-1 (Fasta):

```
ATGAGTGATGGAGCAGTACAACCAGACGGTGGTCAACCTGCTGTCAGAAATGAAAGAGCTACAGGATCTGGGAACGGGT
CTGGAGGCCGGGGTGGTGGTGGTCTGGGGGTGTGGGGATTTCTACGGGTACTTCAATAATCAGACGGAATTTAAATTT
TTGAAAAACGGATGGGTGGAATCACAGCAAACCTCAAGCAGACTTGTACATTTAAATATGCCAGAAAAGTGAAAATTATA
GAAGAGTGGTTGTAATAATTTGGATAAACTGCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAGATGATACCCATGCACAAAATTGTA
ACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTTAAATCCAGGAGATTGGCAACTAATTGTTAATACTATG
AGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATTTTTAATGTTGTTTTAAAGACTGTTTCAGAACTGCTACTCAGCCA
CCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGTTGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCA
GCAGCTATGAGATCTGAGACATTGGGTTTTTATCCATGGAAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTTTCAATG
GGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAAGTGTGGCAGCACCAACAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATG
TTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTGCCAGTGCACCTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTT
TTGATTGTAAACCATGTAGACTAACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTCTAAATCTTTTG
CTCAAGCTGAAGGAGGTAACCTTTGGTTATATAGGAGTTCAACAAGATAAAAAGACGTGGTGTAACTCAATGGGAAA
TACAACTATATTACTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTTGAGGCGTC
TACACAAGGGCCATTTAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGGGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGCAGATGG
TGATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACATAT
ATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAATATTAACCTTAACTTCTGTAACAGATGA
TAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAACAGGAATTAACATACTAATATATTTAATACTTATGGTCCTTT
AACTGCATTAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAAGAAATTTGATACTGACTTAAACCAA
GACTTCATGTAATGCACCATTTGTTGTCAAATAATTGTCCTGGTCAATTATTGTAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAA
ATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTACTCAGATTTTGGTGGAAAGGTAATAGTAT
TTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGAATCCAATTCAACAAATGAGTATCAATGTAGATAACCAATTTAACTAT
GTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGTATATGAAAATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATAT
```



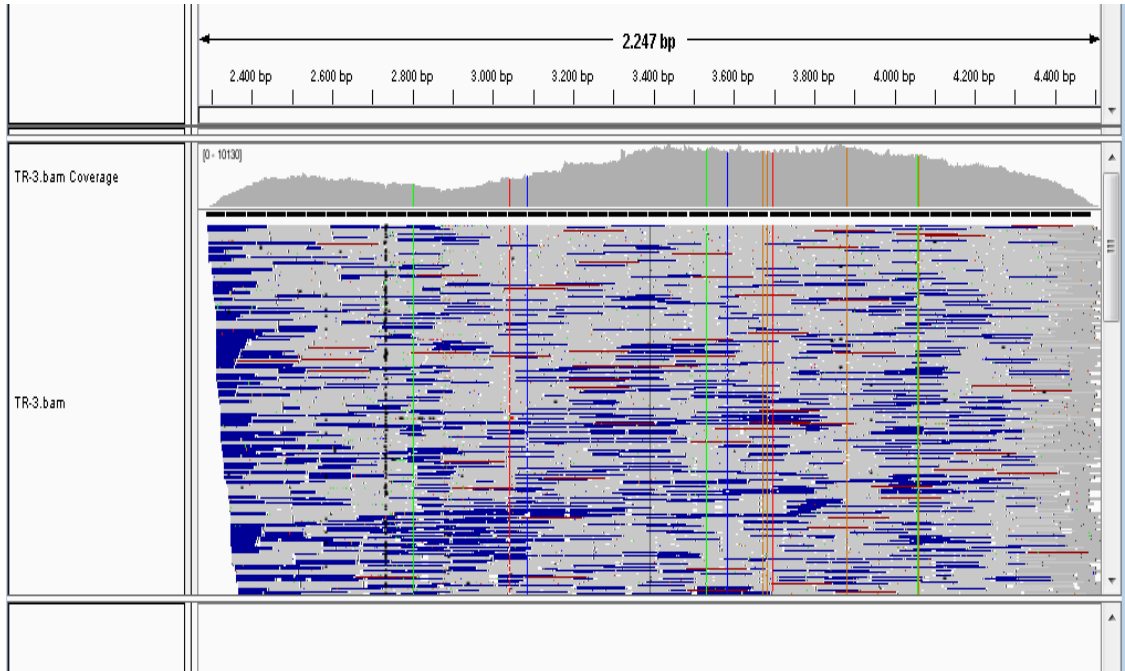
İGV 2.3. Programı. Bam dosyası. (TR-2)

TR-2 (Fasta):

```

ATGAGTGATGGAGCAGTACAACCAGACGGTGGTCAACCTGCTGTCAGAAATGAAAGAGCTACAGGATCTGGGAA
CGGGTCTGGAGGCGGGGGTGGTGGTGGTCTGGGGTGTGGGGATTCTACGGGTACTTTCAATAATCAGACGG
AATTTAAATTTTTGGAAAACGGATGGGTGGAATCACAGCAAACCTCAAGCAGACTTGTACATTTAAATATGCCAG
AAAGTGAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAATAATTTGGATAAAAACCTGCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAGAT
GATACCCATGCACAAATTGTAACACCTTGGTTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTTAATCCAGGA
GATTGGCAACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAAATTTTAAATGTTGTTT
TAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGT
TGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTTGGGTTTTATCCATGG
AAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTTCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAACCT
AGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTG
CCAGTACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTGGATTGTAACCATGTAGACTA
ACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTCTAAATCTTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGT
ACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCAACAAGATAAAAAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAATACAACTATATT
ACTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTGAGGCGTCTACACAA
GGGCCATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGCAGATGGTG
ATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACA
TATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAAAATATTAACTTTAACTTCTCTGTA
ACAGATGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAACAGGAATTAACCTACACTAATATATTTAAT
ACTTATGGTCCTTTAACTGCATTAATAATGTACCACCAGTTTATCCAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTG
ATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAATGCACCATTTGTTGTCAAATAATTGTCCTGGTCAATTATTTGT
AAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTACTC
AGATTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGAATCCAATTCAACA
AATGAGTATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGTATATGAAA
ATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATAT

```



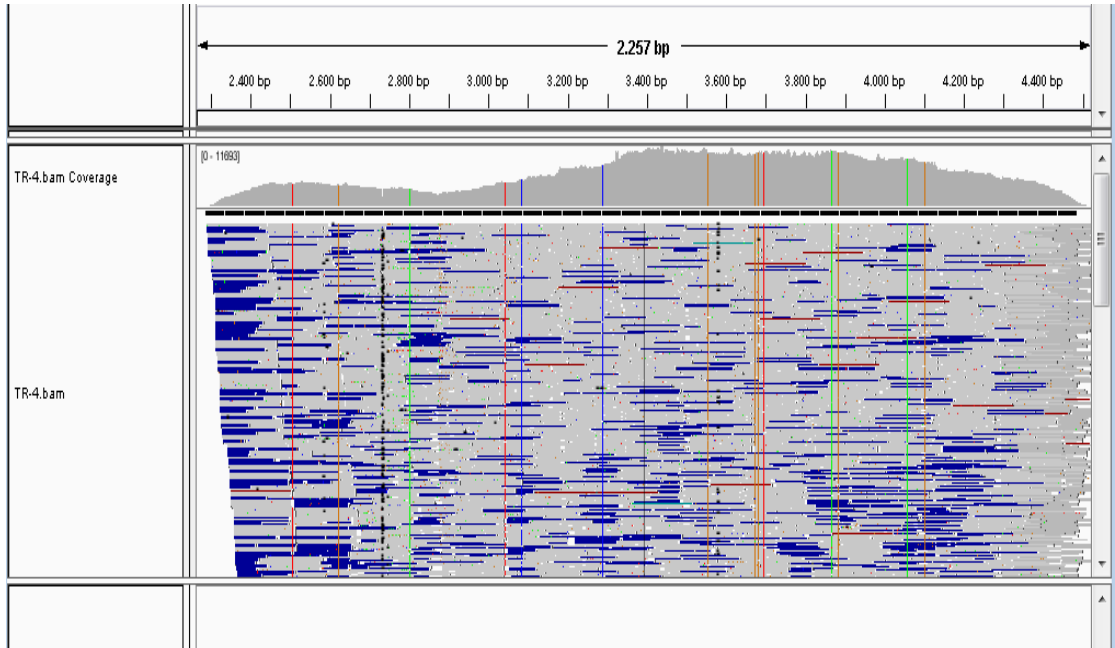
İGV 2.3. Programı. Bam dosyası. (TR-3)

TR-3 (Fasta):

```

ATGAGTGATGGAGCAGTACAACCAGACGGTGGTCAACCTGCTGTCAGAAATGAAAGAGCTACAGGATCTGGGAA
CGGGTCTGGAGGCGGGGGTGGTGGTGGTTCTGGGGGTGGGGGATTTCTACGGGTACTTTCAATAATCAGACGG
AATTTAAATTTTTGGAAAACGGATGGGTGGAATCACAGCAAACCTCAAGCAGACTGTACATTTAAATATGCCAG
AAAGTAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAATAATTTGGATAAACTGCAGTTAACGAAACATGGCTTTAGAT
GATACCATGCACAAATTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTAATCCAGGA
GATTGGCAACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATTTTTAATGTTGTT
TAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGT
TGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTTGGGTTTTATCCATGG
AAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTTCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAECT
AGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTA
CCAGTACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTCTTGATTGTAACCATGTAGACTA
ACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACATTTCTAAATCTTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGT
ACTAECTTTGGTTATATAGGAGTTCAACAAGATAAAAAGACGTGGTGTAACCTCAAATGGGAAATACAAACTATATT
ACTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTGAGGCGTCTACACAA
GGGCCATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGCAGATGGTG
ATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACA
TATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAAATATTAACCTTAACTTCTCTGTA
ACAGATGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAACAGGAATTAACATACTAATATATTTAAT
ACTTATGGTCCTTAACTGCATTTAAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTG
ATACTGACTTAAACCAAGACTTCATGTAATGCACCATTTGTTTGTCAAATAAATGTCTGGTCAATTTATTTGT
AAAAGTTGCGCCTAATTTAACAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTACTC
AGATTTTTGGTGGAAAGGTAATTAGTATTTAAAGCTAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCCAATTCACAA
AATGAGTATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGTATATGAAAA
ATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATAT

```



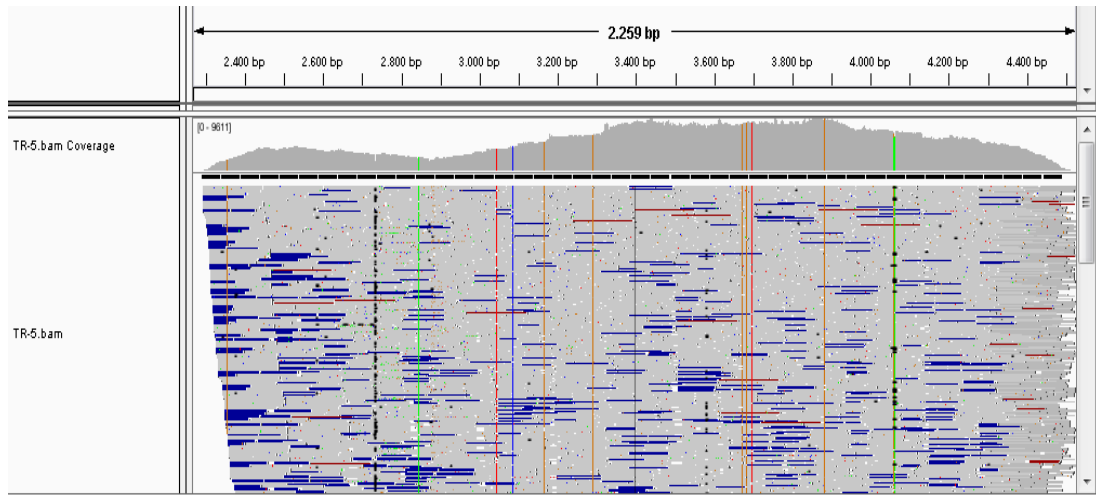
İGV 2.3. Programı. Bam dosyası. (TR-4)

TR-4 (Fasta):

```

ATGAGTGATGGAGCAGTACAACCAGACGGTGGTCAACCTGCTGTCAGAAATGAAAAGACTACAGGATCTGGGAA
CGGGTCTGGAGGCGGGGTGGTGGTGGTTCTGGGGGTGGGGATTCTACGGGTACTTTCAATAATCAGACGG
AATTTAAATTTTTGAAAAACGGATGGGTGGAATCACAGCAAACCTCAAGCAGACTTGTACATTTAAATATGCCAG
AAAGTGAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAATAATTTGGATAAAACTGCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAGAT
GATACTCATGCACAAATTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTTAATCCAGGA
GATTGGCAACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATTTTTAATGTTGTTT
TAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAAGTTTATAATAATGATCTAACTGCATCATTGATGG
TTGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTGGGTTTTTATCCATG
GAAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTTTCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAAC
TAGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCGTG
GCCAGTACACTTACTAAGAACGGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTGATTGTA AACCATGTAGACT
AACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTCTAAATCTTTGCCTCAAGCTGAAGGAGG
TACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCAACAAGATAAAAAGACGTGGTGTAACCTCAAATGGGAAATACAACTATAT
TACTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTTGAGGCGTCTACACAA
GGGCCATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGAGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGCAGATGGTG
ATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACA
TATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAAAATATTAACCTTAACTTCCTGTA
ACAAATGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAAGCAGGAATTAACATACTAATATATTTAAT
ACTTATGGTCCTTTAACTGCATTAATAAATGTACCACCAGTTTATCCAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAAATTTG
ATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAATGCACCATTTGTTGTCAAATAAATGTCTCTGGTCAATTATTTGT
AAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTACTC
AGATTTTTGGTGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGCTAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCCAATTCAACA
AATGAGTATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGTATATGAAAA
ATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATAT

```

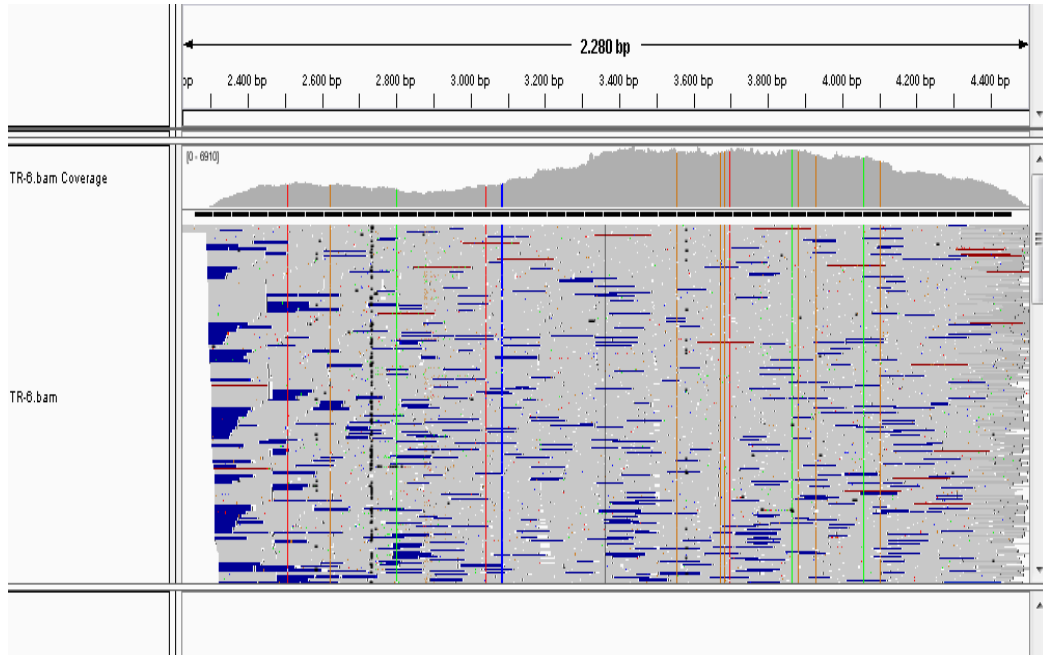
İGV 2.3. Programı. Bam dosyası. (TR-5)

TR-5 (Fasta):

```

ATGAGTGATGGAGCAGTTCAACCAGACGGTGGTCAACCTGCTGTCAGAAATGAAAGAGCAACAGGATCTGGGAA
CGGGTCTGGAGGCGGGGTGGTGGTGGTCTGGGGTGTGGGGATTCTACGGGTACTTTCAATAATCAGACGG
AATTTAAATTTTTGGAAAACGGATGGGTGGAAATCACAGCAAACCTCAAGCAGACTTGTACATTTAAATATGCCAG
AAAGTGAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAATAATTTGGATAAAACTGCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAGAT
GATACTCATGCACAAATTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTTAATCCAGGA
GATTGGCAGCTAATTGTTAATACTATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATTTTTAATGTTGTTT
TAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAAGTTTATAATAATGATTTGACTGCATCATTGATGGT
TGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTGGGTTTTTATCCATGG
AAACCAACCATAACCACTCCATGGAGATATTATTTTCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAECT
AGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTG
CCAGTACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTGGATTGTAACCATGTAGACTA
ACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAATTCTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGT
ACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCAACAAGATAAAAAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAATACAACTATATT
ACTGAAGTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTGAGGCGTCTACACAA
GGGCCATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGCAGATGGTG
ATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACA
TATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAAAATATTAACCTTAACTTCTCTGTA
ACAGAAGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTA AAAACAGGAATTAACCTATACTAATATATTTAAT
ACTTATGGTCCTTAACTGCATTAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTG
ATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAATGCACCATTTGTTTGTCAAAAATAATTGCCTGGTCAATTATTTGT
AAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTACTC
AGATTTTTGGTGGAAAGGTAATTAGTATTTAAAGCTAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCCAATTCAACA
AATGAGTATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGTATATGAAAA
ATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATAT

```



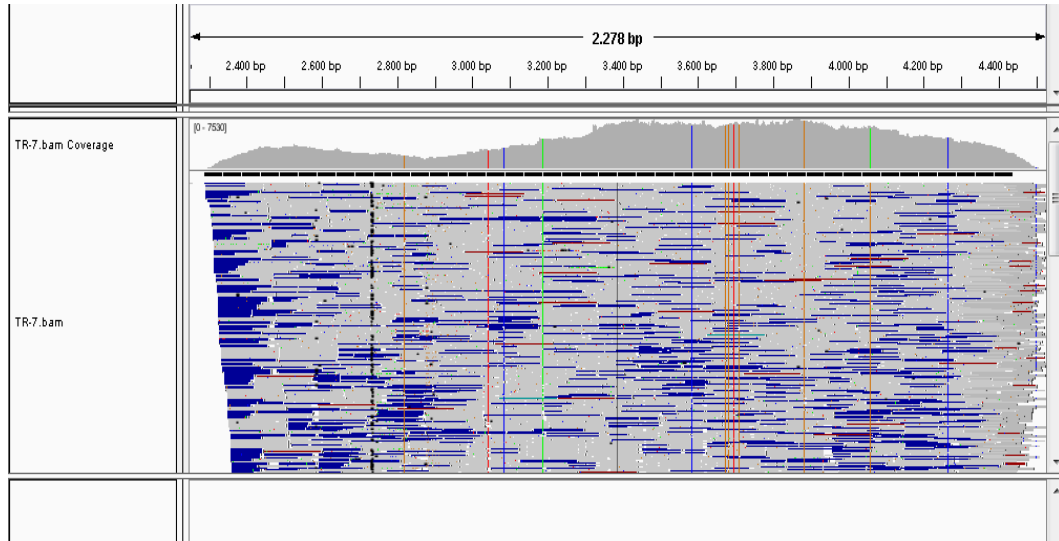
İGV 2.3. Programı. Bam dosyası. (TR-6)

TR-6 (Fasta):

```

ATGAGTGATGGAGCAGTACAACCAGACGGTGGTCAACCTGCTGTCAGAAATGAAAGAGCTACAGGATCTGGGAA
CGGGTCTGGAGGCGGGGGTGGTGGTGGTTCTGGGGGTGGGGGATTTCTACGGGTACTTTCAATAATCAGACGG
AATTTAAATTTTGGAAAACGGATGGGTGGAATCAGCAAACCTCAAGCAGACTGTACATTTAAATATGCCAG
AAAGTGAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAAATAATTTGGATAAACTGCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAGAT
GACACTCATGCACAAATTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTAATCCAGGA
GATTGGCAACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATTTTTAATGTTGTTT
TAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGT
TGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTGGGTTTTTATCCATGG
AAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTTTTCATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAACCT
AGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTTCTGTG
CCAGTACACTTACTAAGAACGGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTGATTGTAACCATGTAGACTA
ACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAATTTCTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGT
ACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCAACAAGATAAAAAGACGTGGTGTAACCTCAAATGGGAAATACAAACTATATT
ACTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTGAGGCGTCTACACAA
GGGCCATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGAGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGCAGATGGTG
ATCCAAGATATGCATTTGGTAGGCAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACA
TATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAAAATTAACCTTAACTTCTCTGTA
ACAAATGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAAGCAGGAATTACTATACTAATATATTTAAT
ACTTATGGTCCTTAACTGCATTAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTG
ATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAATGCACCATTTGTTTGTCAAATAAATGTCCTGGTCAATTATTTGT
AAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTACTC
AGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGCTAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCCAATTCAACA
AATGAGTATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTTGATATGAAA
ATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATAT

```



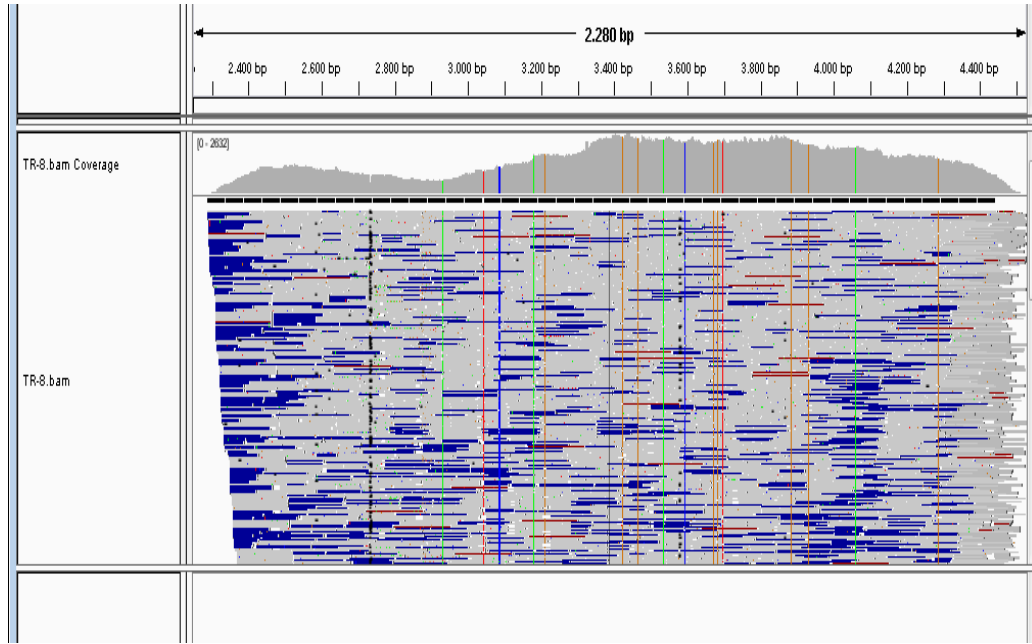
İGV 2.3. Programı. Bam dosyası. (TR-7)

TR-7 (Fasta):

```

ATGAGTGATGGAGCAGTTC AACCAGACGGTGGTCAGCCTGCTGTCAGAAATGAAAGAGCTACAGGATCTGGGAA
CGGGTCTGGAGGCGGGGGTGGTGGTGGTTCTGGGGGTGGGGATTCTACGGGTACTTTCAATAATCAGACGG
AATTTAAATTTTGGAAAACGGATGGGTGGAAATCACAGCAAACCTCAAGCAGACTTGACATTTAAATATGCCAG
AAAGTGAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAAT AATTTGGATAAAACTGCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAGAT
GATACTCATGCACAAATTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTAATCCAGGA
GATTGGCAACTAATTGTTAATACTATGAGTGAATTGCATTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATTTTTAATGTTGTTT
TAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGT
TGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTTGGGTTTTTATCCATGG
AAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTTCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAAC
AGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTTCTGTG
CCAGTACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTCTTTGATTGTAACCATGTAGACTA
ACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAATCTTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGT
ACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCAGCAAGATAAAAAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAATACAACTATATT
ACTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTGAGGCGTCTACACAA
GGGCCATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGCAGATGGTG
ATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACA
TATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAAATATTAACCTTTAACCTTCCTGTA
ACAGATGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTA AACAGGAATTAACATACTAATATATTTAAT
ACTTATGGTCCTTTAACTGCATTAATAATGTACCACCAGTTTATCCAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTG
ATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTGTCAAATAATTGCCCTGGTCAATTATTTGT
AAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTACTC
AGATTTTGGTGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGCTAACTAAGAGCCTCTCATACTTGAATCCAATTCAACA
AATGAGTATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATGTCTATGAAA
ATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATAT

```



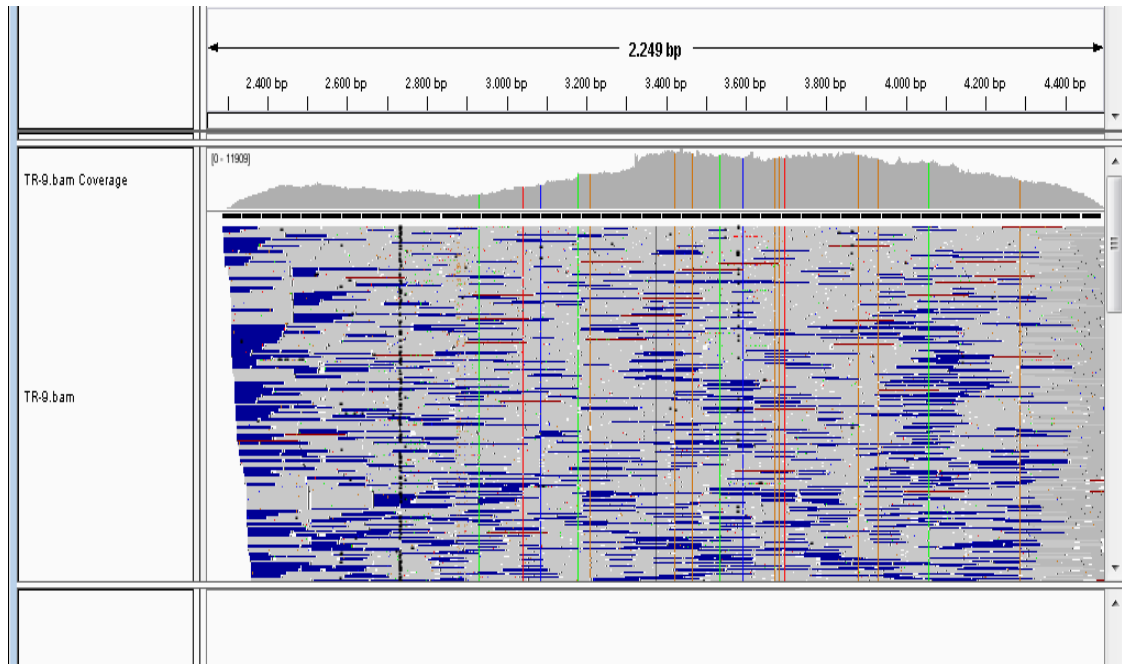
İGV 2.3. Programı. Bam dosyası. (TR-8)

TR-8 (Fasta):

```

ATGAGTGATGGAGCAGTTCAACCAGACGGTGGTCAACCTGCTGTCAGAAATGAAAGAGCTACAGGATCTGGGAA
CGGGTCTGGAGGCGGGGGTGGTGGTGGTTCTGGGGGTGTGGGGATTCTACGGGTACTTTCAATAATCAGACAG
AATTTAAATTTTTGAAAACGGATGGGTGAAATCACAGCAAACCTCAAGCAGACTGTACATTTAAATATGCCAG
AAAGTGAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAATAATTTGGATAAACTGCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAGAT
GATACCCATGCACAAATTTGAACACCTTGGTCAATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTAATCCAGGA
GATTGGCAACTAATTGTTAATAACAATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTGGAGCAAGAAATTTTAAATGTTGTTT
TAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGT
TGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTTGGGTTTTTATCCATGG
AAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTTATTTTCAGTGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAAC
AGTGGGACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTA
CCAGTACACTTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTGATTGCAAACCATGTAGACTA
ACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAATCTTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGT
ACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCAACAAGATAAAAAGACGTGGTGTAACCTCAAATGGGAAATACAAACTATATT
ACTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTGAGGCGTCTACACAA
GGGCCATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGCAGATGGTG
ATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAGCATGGTCAAAAAACTACCACAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACA
TATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAAATATTAACCTTAACTTCTCTGTA
ACAAATGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAACAGGAATTAACCTATACTAATATATTTAAT
ACTTATGGTCCTTAACTGCATTAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTG
ATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAATGCACCATTTGTTTGTCAAATAATTGTCTGGTCAATTATTTGT
AAAGGTTGCGCCTAATTTAACAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTACTC
AGATTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGCTAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCCAATTCACAA
AATGAGTATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGTATATGAAAA
ATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATAT

```



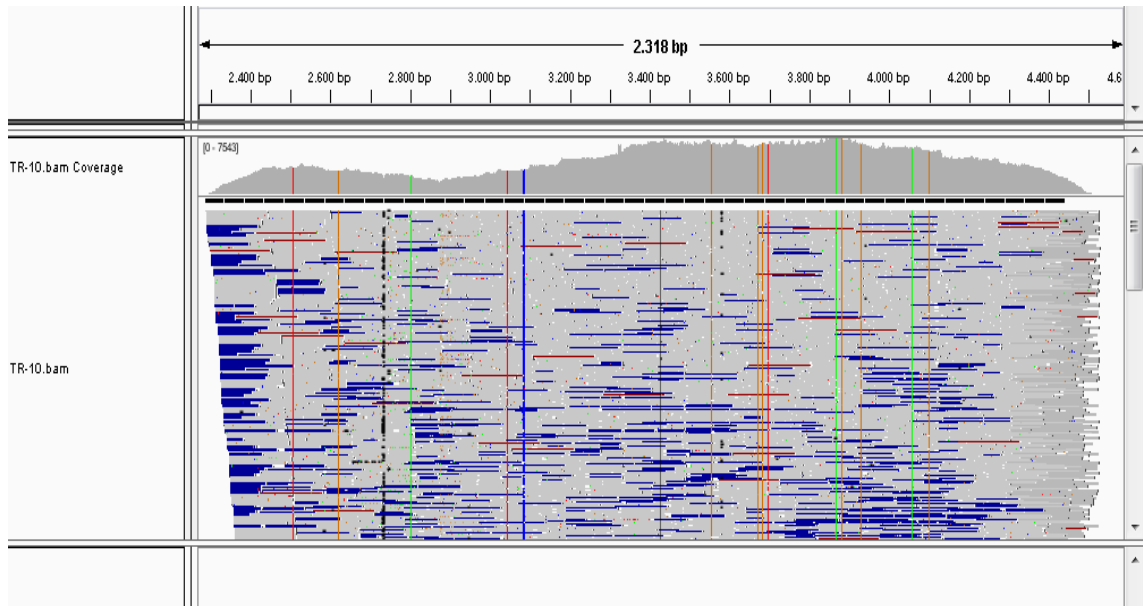
İGV 2.3. Programı. Bam dosyası. (TR-9)

TR-9 (Fasta):

```

ATGAGTGATGGAGCAGTTCAACCAGACGGTGGTCAACCTGCTGTCAGAAATGAAAGAGCTACAGGATCTGGGAA
CGGGTCTGGAGGCGGGGGTGGTGGTGGTCTGGGGTGTGGGGATTCTACGGGTACTTTCAATAATCAGACAG
AATTTAAATTTTGGAAAACGGATGGGTGGAATCACAGCAAACCTCAAGCAGACTTGTACATTTAAATATGCCAG
AAAGTGAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAATAATTTGGATAAAACTGCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAGAT
GATACCATGCACAAATTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTAATCCAGGA
GATTGGCAACTAATTGTTAATACAATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGAGCAAGAAATTTTAAATGTTGTTT
TAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCACTAAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGT
TGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTTGGGTTTTATCCATGG
AAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTTTCAGTGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAECT
AGTGGGACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTA
CCAGTACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTGATTGCAAACCATGTAGACTA
ACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTCTAAATCTTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGT
ACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCAACAAGATAAAAAGACGTGGTGAACCTCAAATGGGAAATACAACTATATT
ACTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTGAGGCGTCTACACAA
GGGCCATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGCAGATGGTG
ATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAGCATGGTCAAAAAACTACCACAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACA
TATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAATATTAACCTTAACTTCTCTGTA
ACAAATGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAACAGGAATTAACCTATACTAATATATTTAAT
ACTTATGGTCCTTAACTGCATTAATAATGTACCACCAGTTTATCCAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTG
ATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAATGCACCATTTGTTGTCAAATAATTGTCCTGGTCAATTTTGT
AAAGGTTGCGCCTAATTTAAACAAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTACTC
AGATTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCCAATTAACA
AATGAGTATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTTGATATGAAAA
ATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATAT

```



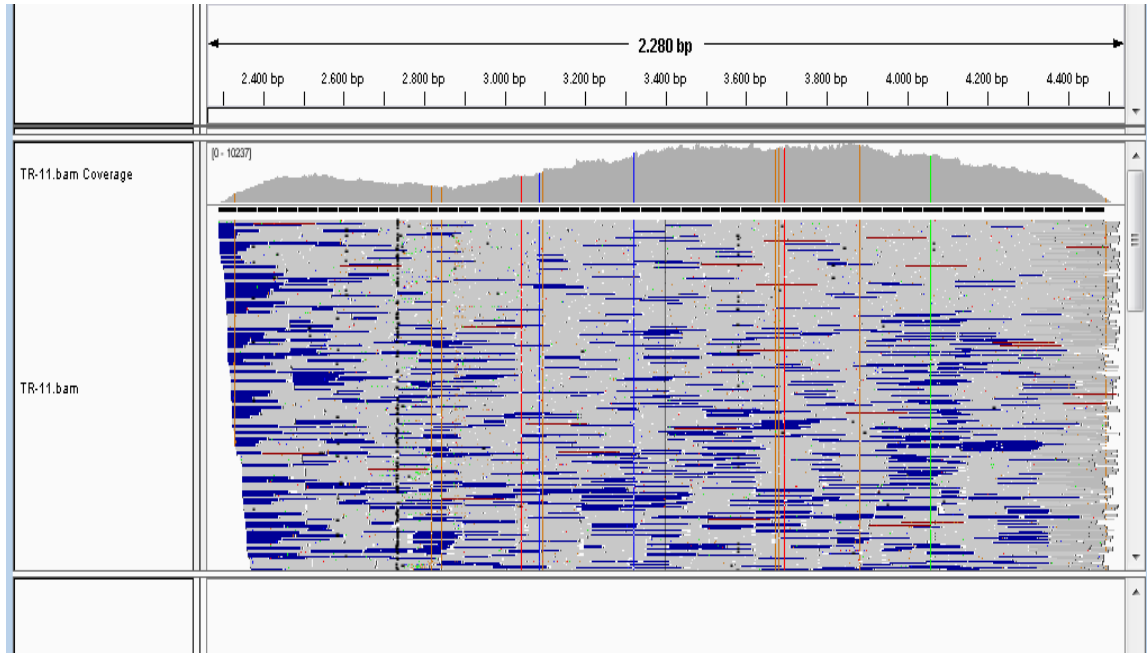
İGV 2.3. Programı. Bam dosyası. (TR-10)

TR-10 (Fasta):

```

ATGAGTGATGGAGCAGTACAACCAGACGGTGGTCAACCTGCTGTCAGAAATGAAAGAGCTACAGGATCTGGGAA
CGGGTCTGGAGGCGGGGTGGTGGTGGTTCTGGGGGTGGGGATTCTACGGGTACTTTCAATAATCAGACGG
AATTTAAATTTTTGAAAACGGATGGGTGAAATCAGCAAACTCAAGCAGACTTGACATTTAAATATGCCAG
AAAGTGAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAATAATTTGGATAAACTGCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAGAT
GATATTCATGCACAAATTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTTAATCCAGGA
GATTGGCAACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATTTTTAATGTTGTTT
TAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCACTAAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGT
TGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTGGGTTTTTATCCATGG
AAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTTCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAECT
AGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTTCTGTG
CCAGTACACTTACTAAGAACGGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTGATTGTAAACCATGTAGACTA
ACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTCTAAATCTTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGT
ACTAECTTTGGTTATATAGGAGTTCAACAAGATAAAAGACGTGGTGAACCTCAAATGGGAAATACAACTATATT
ACTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTTGAGGCGTCTACACAA
GGGCCATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGAGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGCAGATGGTG
ATCCAAGATATGCATTTGGTAGGCAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACA
TATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAAATATTAACCTTAACTTCCTGTA
ACAAATGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAAGCAGGAATTAACCTATACTAATATATTTAAT
ACTTATGGTCCTTTAACTGCATTAATAATGTACCACCAGTTTATCCAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAAATTTG
ATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAATGCACATTTGTTGTCAAATAAATGTCTGGTCAATTATTTGT
AAAAGTTGCGCCTAATTTAAACAAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTACTC
AGATTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGCTAACTAAGAGCCTCTCATACTGGAATCCAATTCAACA
AATGAGTATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGTATATGAAA
ATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATAT

```



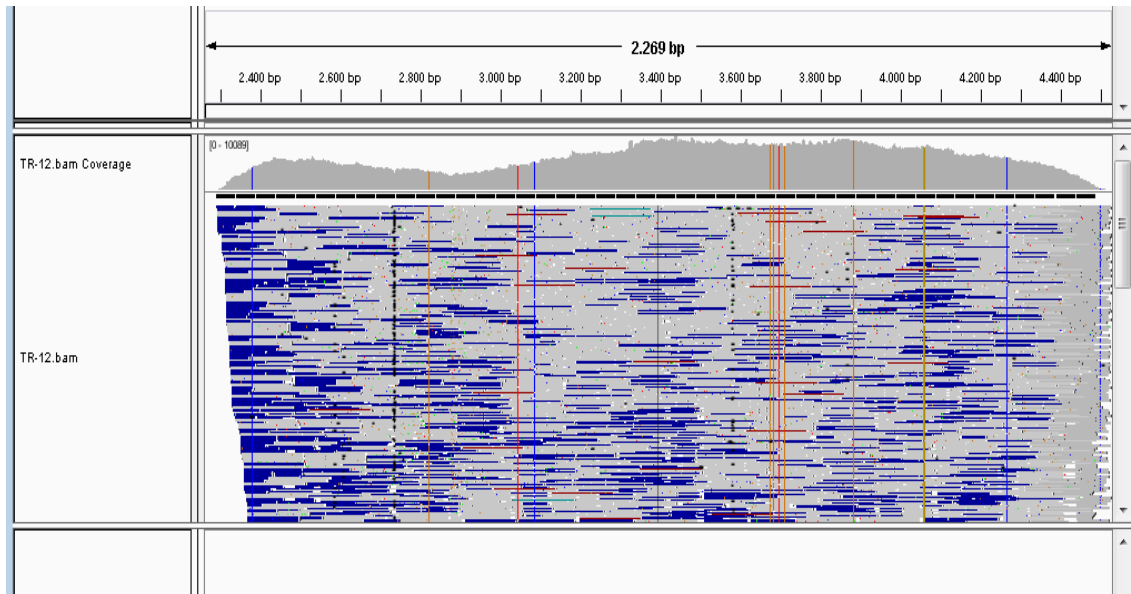
İGV 2.3. Programı. Bam dosyası. (TR-11)

TR-11 (Fasta):

```

ATGAGTGTGGAGCAGTTCAACCAGACGGTGGTCAGCCTGCTGTCAGAAATGAAAGAGCGACAGGATCTGGGAA
CGGGTCTGGAGGCGGGGGTGGTGGTGGTCTGGGGGTGGGGATTCTACGGGTACTTTCAATAATCAGACGG
AATTTAAATTTTTGAAAAACGGATGGGTGGAAATCACAGCAAACCTCAAGCAGACTTGTACATTTAAATATGCCAG
AAAGTGAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAATAATTTGGATAAAACTGCAGTTAACGAAACATGGCTTTAGAT
GATACTCATGCACAGATTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTAATCCAGGA
GATTGGCAACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATTTTTAATGTTGTTT
TAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGT
TGCATTAGATAGCAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTGGGTTTTTATCCATGG
AAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTTTCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAAC
AGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTCAATTTTATACTATTGAAAAATTCTGTG
CCAGTACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTGGATTGTAACCATGTAGACTA
ACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACATTTCTAAATCTTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGT
ACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCAACAAGATAAAAAGACGTGGTGTAACCTCAAATGGGAAATACAAACTATATT
ACTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTGAGGCGTCTACACAA
GGGCCATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGCAGATGGTG
ATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACA
TATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAAAATTAACCTTTAACCTTCTCTGTA
ACAAATGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAACAGGAATTAATACTATACTAATATATTTAAT
ACTTATGGTCCTTTAACTGCATTAATAAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTG
ATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAATAAATGTCCTGGTCAATTATTTGT
AAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTACTC
AGATTTTTGGTGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGCTAACTAAGAGCCTCTCATACTTGAATCCAATTCAACA
AATGAGTATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAGATTGTATATGAAAA
ATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATAT

```



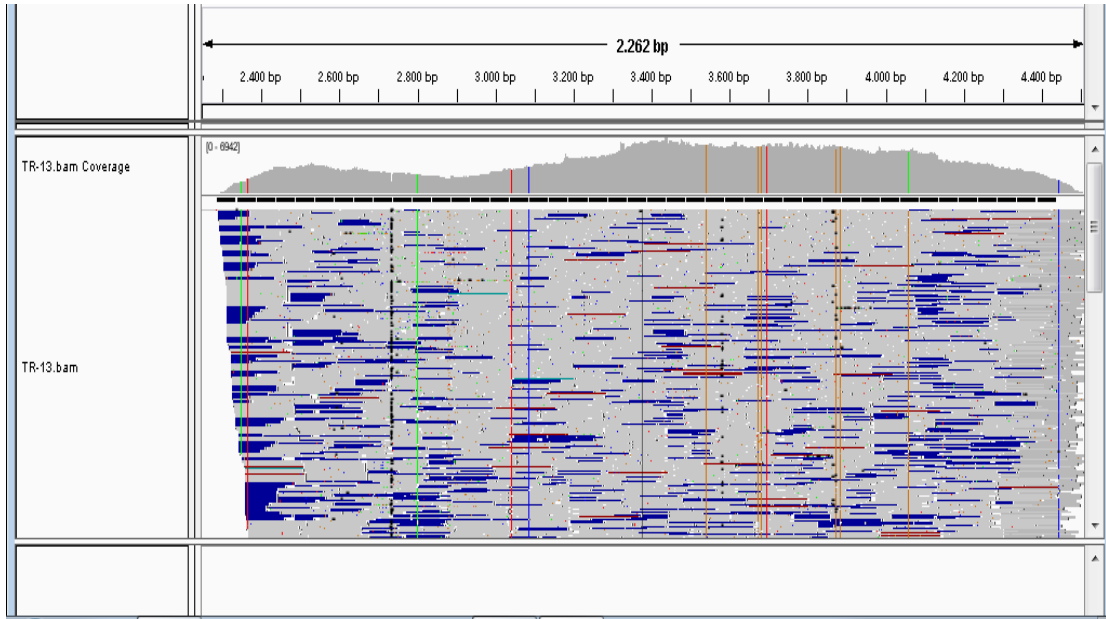
İGV 2.3. Programı. Bam dosyası. (TR-12)

TR-12 (Fasta):

```

ATGAGTGATGGAGCAGTTCAACCAGACGGTGGTCAGCCTGCTGTCAGAAATGAAAGAGCTACAGGATCTGGGAA
CGGGTCTGGAGGCGGGGTGGTGGTGGTCTGGGGTGTGGGGATTCTACGGGACTTTCAATAATCAGACGG
AATTTAAATTTTTGGAAAACGGATGGGTGGAAATCACAGCAAACCTCAAGCAGACTTGTACATTTAAATATGCCAG
AAAGTGAAAATTATAGAAGAGTGTTGTAAAT AATTTGGATAAAAACCTGCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAGAT
GATACTCATGCACAAATTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTTAATCCAGGA
GATTGGCAACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATTTTTAATGTTGTTT
TAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGT
TGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTGGGTTTTTATCCATGG
AAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTTCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAAC
AGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTG
CCAGTACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTGGATTGTAACCATGTAGACTA
ACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCTTCTAAATCTTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGT
ACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCAGCAAGATAAAAAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAATACAAACTATATT
ACTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTGAGGCGTCTACACAA
GGGCCATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGCAGATGGTG
ATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACA
TATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAAAATATTAACCTTAACTTCTCTGTA
ACAGATGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTACTATACTAATATATTTAAT
ACTTATGGTCCTTTAACTGCATTAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTG
ATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAATGCACCATTTGTTGTCAAATAAATGCCTTGGTCAATTATTTGT
AAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTACTC
AGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGCTAACTAAGAGCCTCTCATACTGGAATCCAATTCAACA
AATGAGTATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGTCTATGAAAA
ATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATAT

```

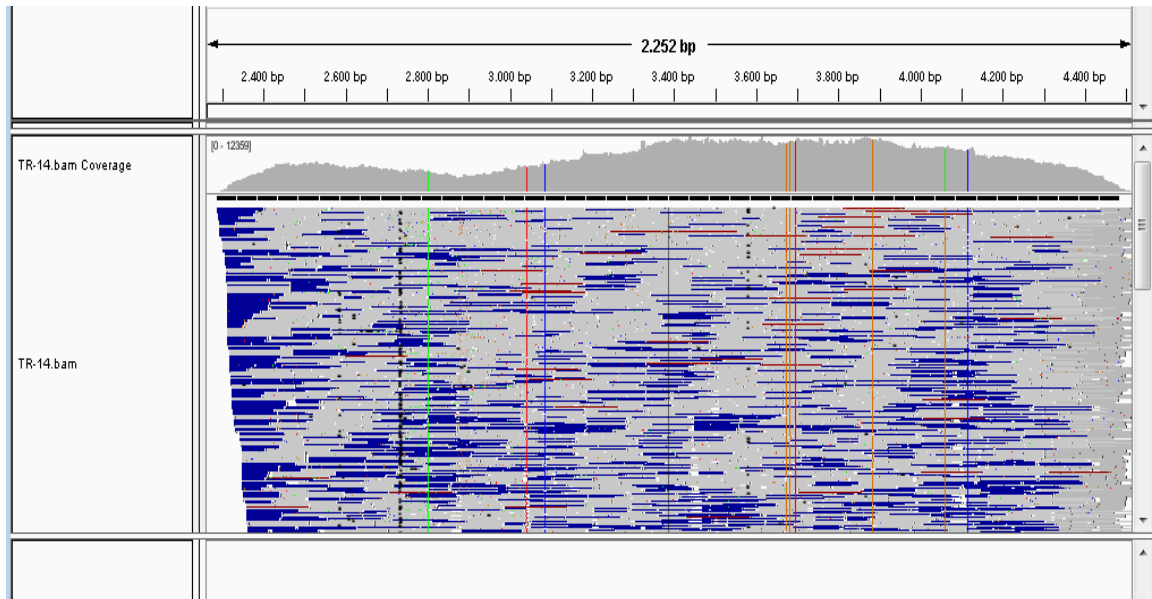
İGV 2.3. Programı. Bam dosyası. (TR-13)

TR-13 (Fasta):

```

ATGAGTGATGGAGCAGTACAACCAGACGGTGGTCAACCTGCTGTCAGAAATGAAAGAGCTACAGGATCTGGGAA
CGGGTCTGGAGGCGGGGGTGGTGGTGGTTCTGGGGTGTGGGGATTCTACGGGTACTTTCAATAATCAGACGG
AATTTAAATTTTTGAAAACGGATGGTGGAAATCACAGCAAACCTCAAGCAGACTGTACATTTAAATATGCCAG
AAAGTGAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAATAATTTGGATAAAACTGCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAGAT
GATACCATGCACAAATTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTTAATCCAGGA
GATTGGCAACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATTTTTAATGTTGTTT
TAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGT
TGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTTGGGTTTTTATCCATGG
AAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTATTTCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAAC
AGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTG
CCAGTGCACCTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTGATTGTAAACCATGTAGACTA
ACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTCTAAATCTTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGT
ACTAECTTTGGTTATATAGGAGTTCAACAAGATAAAAAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAATACAAACTATATT
ACTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTTGAGGCGTCTACACAA
GGGCCATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGGGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGCAGATGGTG
ATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACA
TATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAATATTAACCTTAACTTCTCTGTA
ACAGATGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAACAAACAGGAATTAACTATACTAATATATTTAAT
ACTTATGGTCCTTAACTGCATTAATAATGTACCACCAGTTTATCCAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTG
ATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAATGCACCATTGTTTGTCAAATAATTGTCCTGGTCAATTATTTGT
AAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTACTC
AGATTTTGGTGGAAAGGTAATAGTATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTGGAATCCAATTCAACA
AATGAGTATCAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGTATATGAAA
ATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATAT

```



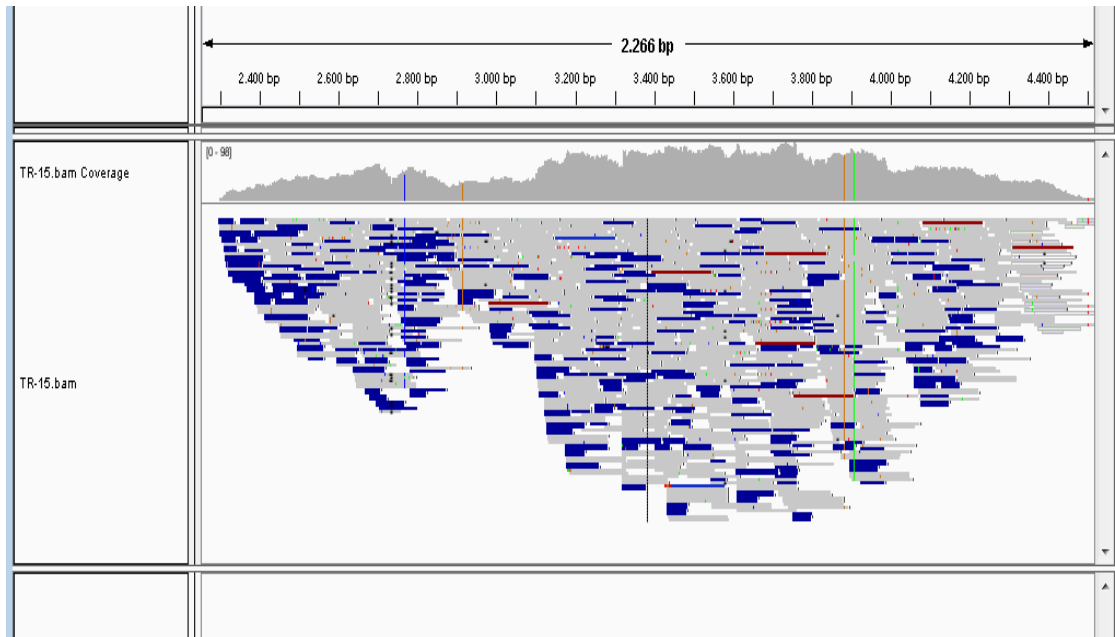
İGV 2.3. Programı. Bam dosyası. (TR-14)

TR-14 (Fasta):

```

ATGAGTGATGGAGCAGTACAACCAGACGGTGGTCAACCTGCTGTCAGAAATGAAAGAGCTACAGGATCTGGGAA
CGGGTCTGGAGGCGGGGTGGTGGTGGTTCTGGGGGTGGGGATTCTACGGGTACTTTCAATAATCAGACGG
AATTTAAATTTTGGAAAACGGATGGGTGGAATCACAGCAAACCTCAAGCAGACTGTACATTTAAATATGCCAG
AAAGTAAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAATAATTTGGATAAACTGCAGTTAACGAAACATGGCTTTAGAT
GATACCCATGCACAAATTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTAATCCAGGA
GATTGGCAACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATTTTTAATGTTGTTT
TAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGT
TGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTGGGTTTTTATCCATGG
AAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATTTTCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAACCT
AGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTG
CCAGTACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTGATTGTAACCATGTAGACTA
ACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAATCTTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGT
ACTAACTTTGGTTATATAGGAGTTCAACAAGATAAAAAGACGTGGTGTAACCTCAAATGGGAAAATACAAACTATAT
ACTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTGAGGCGTCTACAAA
GGGCCATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGCAGATGGTG
ATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAAACCACCAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACA
TATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAATATTAACCTTAACTTCTCTGTA
ACAGATGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAACAGGAATTAACCTACTAATAATATTTAAT
ACTTATGGTCCTTAACTGCATTTAAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTG
ATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAATGCACCATTTGTTTGTCAAATAAATGTCTCTGGTCAATTTTGT
AAAAGTTGCGCCTAATTTAACAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTACTC
AGATTTTGGTGGAAAGGTAATAGTATTTAAAGCTAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCCAATTCACAA
AATGAGTATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGTATATGAAAA
ATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATAT

```



İGV 2.3. Programı. Bam dosyası. (TR-15)

TR-15 (Fasta):

```

ATGAGTGATGGAGCAGTTCAACCAGACGGTGGTCAACCTGCTGTCAGAAATGAAAGAGCTACAGGATCTGGGAA
CGGGTCTGGAGGCGGGGGTGGTGGTGGTTCTGGGGGTGGGGGATTTCTACGGGTGCTTTCAATAATCAGACGG
AATTTAAATTTTTGGAAAACGGATGGGTGGAAATCACAGCAAACCTCAAGCAGACTTGTACATTTAAATATGCCAG
AAAGTGAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAAATAATATGGATAAAACTGCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAGAT
GATATTCATGCACAAATTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTTAATCCAGGA
GATTGGCAACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATTTTTAATGTTGTTT
TAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGT
TGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTGGGTTTTTATCCATGG
AAACCAACCATACCAACTCCATGGAGATATATTTTTCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAECT
AGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTTCTGTG
CCAGTACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTGATTGTAACCATGTAGACTA
ACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAATTCCTTGCCTCAATCTGAAGGAGCT
ACTAECTTTGGTGATATAGGAGTTCAACAAGATAAAAAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAATACAACTATAT
TACTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTTGAGGGCTCTACACAA
GGGCCATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGAGCGCAAACAGATGAAAATCAAGCAGCAGATGGTG
AACCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAAACTACCACAACAGGAGAAAACCTGAGAGATTTACA
TATATAGCACATCAAGATACAGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAAATATTAACCTTAACTTCTCTGTA
ACGAATGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAACAGGAATTAATACTATACTAATATATTTAAT
ACTTATGGTCCTTAACTGCATTAATAAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTG
ATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAATAAATGTCCTGGTCAATATTTGT
AAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTACTC
AGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGCTAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCCAATTCAACA
AATGAGTATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTTGATTTGAAA
ATCTCAACTAGCACCTAGAAAATTATAT

```

EK-2



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

D⁸

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :30/01/2013
TOPLANTI NO :2013-3
DOSYA NO :2013-7
KARAR NO :2013-3-10

Yürüttüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr.M.Taner Karaoğlu'nun yaptığı ve araştırmacı olarak Vet.Hek.Sepandar Gargari'nin katıldığı, "Gastroenteritis semptomlu köpeklerde "Canine Parvovirus tip 2'nin" tesbiti ve moleküler karakterizasyonu" başlıklı araştırma projesinin içeriği kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Köpek
Hayvan Sayısı : 100
Geçerlilik Süresi : 01/04/2013 – 01/04/2015

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Eyüp Sabri AKARSU (Başkan Vekili)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatih CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı : Sepandar
Soyadı : GARGARİ
Doğum Yeri ve Tarihi : İran, TAHRAN, 1980.09.11
Uyruğu : İran
Medeni Durumu : Evli
E-posta : farzad_gargari@yahoo.com
GSM : İran: +989141419108,
Türkiye: +905313227757

II. Eğitimi

Lisansüstü : Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans : Urmia Azat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İran
Ana Dili : Farsça,
Yabancı Diller : İngilizce, Farsça, Türkiye Türkçesi ve Azerbaycan Türkçesi

III. Bilimsel İlgi Alanları

-West Nile Virus
-Canine Parvo
-Canine Distemper Virus

Yayınları

1. Koray Ergunay, Filiz Gunay, Ozge Erisoz Kasap, Kerem Oter, **Sepandar Gargari**, Taner Karaoglu, Seda Tezcan, Mehmet Cabalar, Yakup Yildirim, Gürol Emekdas, Bulent Alten, and Aykut Ozkul. Serological, Molecular and Entomological Surveillance Demonstrates Widespread Circulation of West Nile Virus in Turkey. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Jul; 8(7): e3028. Published online 2014 Jul 24. doi: 10.1371/journal.pntd.0003028.
2. Ender Dincer, **Sepandar Gargari**, Aykut Ozkul and Koray Ergunay. Potential Animal Reservoirs of Toscana Virus and Coinfections with Leishmania infantum in Turkey. Published online February 23, 2015, doi:10.4269/ajtmh.14-0322Am J Trop Med Hyg

Bildirileri

1. OZKUL A., ERGUNAY K., KARAOGLU M.T., TEZCAN S., KASAP O.E., TURAN H.M., FARAJI A.R., GUNAY F., IPEK E., **GARGARI S.**, West Nile Virus circulation in cukurova region, Turkey. 9th International Congress of Veterinary Virology, **Madrid – Spain**, September 2012.
2. Taner KARAOGLU. **Sepandar GARGARI**. Aykut OZKUL. Detection and first molecular characterization of Canine parvovirus (CPV) on dogs in

Turkey. 5Th European Congress of Virology. September 11-14. 2013. **Lyon. FRANCE**

3. Taner Karaoglu, Koray Ergunay, Filiz Gunay, Sepandar Gargari1, Seda Tezcan, Bulent Alten, Aykut Ozkul. CURRENT STATUS OF WEST NİLE VIRUS İNFECTIONS İN TURKEY. 5Th European Congress of Virology. September 11-14. 2013. **Lyon. FRANCE**

4. Kendir G., Güvenç A., Özkan S., Özgen özacar., Karaoğlu T., **Gargari S.** Türkiyede yetişen Ribes L. Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Değerlendirilmesi. XXI. BİTKİSEL İLAÇ HAMMADDELERİ TOPLANTISI (BİHAT-2014) (28 Mayıs-1 Haziran 2014, Perissia Hotel, ÜRGÜP) Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Projeler

1. Çukurova bölgesinde Batı Nil Virus (BNV) enfeksiyonunun etiyolojik ve serolojik olarak araştırılması ve vektör özelliklerinin belirlenmesi. Tübitak Araştırma Projesi, Proje No: 110S404, 2011-2013, (Yardımcı Araştırmacı).
2. Gastroenteritis Semptomlu Köpeklerde Canine Parvovirus Tip 2'nin Tesbiti ve Moleküler Karakterizasyonu. BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ. Proje Numarası 13L3338007, (Yardımcı Araştırmacı).