T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOYUN KEÇİ VEBASI (PPR)'NIN VİRUS İZOLASYONU, C-ELISA VE REAL TİME RT-PCR TEŞHİS METOTLARI İLE KARŞILAŞTIRMALI TEŞHİSİ

Berat Selim TOKGÖZ

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Atilla ŞİMŞEK

KONYA-2017

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOYUN KEÇİ VEBASI (PPR)'NIN VİRUS İZOLASYONU, C-ELISA VE REAL TİME RT-PCR TEŞHİS METOTLARI İLE KARŞILAŞTIRMALI TEŞHİSİ

Berat Selim TOKGÖZ

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Atilla ŞİMŞEK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 13202018 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2017

ÖNSÖZ

Tarihi 1942 yılına kadar dayanan koyun keçi vebası (PPR), önceden hiç gözlenmemiş olan bölgelerde ortaya çıkması nedeniyle son 15 yıl içinde endişe verici bir oranda dünya üzerinde yayılım göstermiş ve buna bağlı olarak milyonlarca küçük ruminantı tehdit altında bırakması endişe verici boyuta ulaşmıştır. Enfeksiyonun dünya ekonomisine vermiş olduğu kayıp 2015 yılı verilerine göre 1.4 - 2.1 milyon $ civarında tahmin edilmektedir. PPR'dan dolayı sürülerde meydana gelen kayıplar, tüm dünyada özellikle kırsal bölgede yaşayan çiftçiler ile göçebe hayatı yaşayan ve geçimini hayvancılıktan sağlayan insanların ya topraklarını ve kültürlerini terk etmelerine ya da alternatif geçim kaynağı arayışlarına yöneltmektedir. Bu durum enfeksiyonun tüm dünyadaki küçük ruminant populasyonlarını etkileyen önemli ve mücadele edilmesi gereken büyük bir sorun olduğunu göstermektedir. Bu araştırma ile ülkemizde de uzun yıllardır gözlenen, çeşitli projelerle eradikasyonu üzerine yoğun çaba sarfedilen koyun keçi vebası enfeksiyonunun bölgesel nitelik taşımakla birlikte serolojik ve virolojik yöntemlerle son yıllardaki durumunun ortaya konulması hedeflenmiştir.

Laboratuar çalışmalarımda ve tüm tezim boyunca her zaman değerli bilgilerinden faydalandığım sabırlı, özverili danışman hocam, Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK başta olmak üzere, çalışmanın her aşamasında tüm yakın destek, ilgi ve yardımlarını gördüğüm S.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Sibel YAVRU, Prof. Dr. Orhan YAPICI, Prof. Dr. Oya BULUT ve emekli Prof. Dr. Feridun ÖZTÜRK hocalarıma, ayrıca çalışmam süresince bana destek olan Doç. Dr. Oğuzhan AVCI'ya, özellikle laboratuar çalışmalarım sırasında olmak üzere her türlü desteklerinden dolayı Arş. Gör. Dr. Irmak DİK, Arş. Gör. Dr. Kamil ATLI'ya, saha ve laboratuar çalışmalarım sırasında bana verdikleri destek ve yardımlarından dolayı Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'nde görevli çalışma arkadaşlarım Vet. Hekim Bülent MAHANOĞLU, Vet. Hekim Esra ASLAN, Teknisyen Ali ÖZ,

fotoğraf çekimleri sırasında yardımlarından dolayı Ali ŞAHiN'e ve diğer personel arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde maddi manevi emek ve katkılarından dolayı biricik annem Nilgün TOKGÖZ'e, babam Mustafa TOKGÖZ'e, ağabeyim Numan Ender TOKGÖZ'e,

Ayrıca çalışmalarım süresince göstermiş olduğu fedakarlığı, ilgisi, anlayışı, sabrı ve teşvikleri için sevgili eşim Kezban TOKGÖZ'e çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını 13202018 proje numarası ile maddi yönden destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne ayrıca teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Safya
SİMGELER VE KISALTMALAR	Vi
1. GİRİŞ	1
1.1. Etiyoloji	2
1.2. Epidemiyoloji	5
1.3. Patogenez	6
1.4. Klinik Bulgular	7
1.5. Nekropsi Bulguları	7
1.6. Histopatolojik Bulgular	8
1.7. Teşhis	10
1.7.1. Virusun İdentifikasyonu	11
1.7.2. Serolojik Testler	17
1.8. Bağışıklık	18
1.9. Koruma ve Kontrol	18
2. GEREÇ ve YÖNTEM	**21**
2.1. Gereç	21
2.1.1. Örneklenen hayvanlar	21
2.1.2. ELISA Kitleri	22
2.1.3. Real time RT-PCR Kitleri	22
2.1.4. Fötal Dana Serumu	22
2.1.5. Virus	23
2.1.6. Hücre Kültürü	23
2.2. Yöntem	23
2.2.1.Serolojik Yöntemler	23
2.2.2.Virolojik Yöntemler	26
2.2.3. İstatistiki Analiz	31
3. BULGULAR	**32**
3.1. Klinik ve Nekropsi Bulguları	32
3.2. Serolojik Bulgular	36
3.3. Virolojik Bulgular	39
3.3.1. Real time RT-PCR	39
3.3.2. Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu	44
3.4. İstatistiki Analiz	46

4. TARTIŞMA **49**

5. SONUÇ ve ÖNERİLER **65**

6. KAYNAKLAR **67**

7. EKLER **73**

EK A: Etik Kurul Onayı **73**

8. ÖZGEÇMİŞ **74**

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGID	Agar jel immundifüzyon
B95a	Marmoset B
BD	Border disease
BHK-21	Baby hamster kidney-21
BT	Blue Tongue
°C	Derece santigrat
CAEV	Caprine artritis encephalitis virus
CCPP	Keçi plöyropnöymonisi
cDNA	Komplementer DNA
C-ELISA	Competetive Enzyme Linked Immunosorbent Assay
CIEP	Counter immunoelektroforezis
CPE	Sitopatolojik etki
DIVA	Differentiating infected from vaccinated animals
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
DMSO	Dimethylsulphoxide
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
F	Füzyon
FDB	Fötal dana böbrek
FDS	Fötal dana serumu
FKB	Fötal kuzu böbrek
FMD	Foot and Mouth Disease
I-ELISA	Immunocapture enzyme linked immunosorbent assay
IFAT	Immunfloresan antikor testi
IP	Immunperoksidaz
İs	İntrastoplazmik

in	İntranüklear
H	Hemaglutinin
HA	Hemaglütinasyon
HI	Hemaglütinasyon İnhibisyon
L	Polimeraz
M	Matriks
MAb	Monoklonal antikor
MDBK	Madine Darby Bovine Kidney
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
MOCL-5	Koyun derive monocyte hücresi
N	Nükleokapsid
NaOH	Sodyum hidroksit
NP	Nükleoprotein
O.D.	Optik Dansite
OIE	Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi
P	Fosfoprotein
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
qRT-PCR	Kantitatif RT-PCR
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
PPR	Peste des Petits Ruminants (Küçük ruminant vebası)
PPRV	PPR virusu
RNA	Ribonükleik asit
RNP	Ribonucleocapsid protein
RP	Rinderpest (Sığır vebası)
rpm	Revolutions per minute

RPV	Sığır vebası virusu
rRPV N	Rekombinant Sığır vebası virusu N antijeni
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
Vero	Afrika yeşil maymun böbrek hücre kültürü
VM	Visna maedi
293 T	Transforme insan embriyo böbrek hücre kültürü

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Koyun Keçi Vebası (PPR)'nın Virus İzolasyonu, C-ELISA ve Real Time RT-PCR Teşhis Metotları ile Karşılaştırmalı Teşhisi

Berat Selim TOKGÖZ

Veterinerlik Viroloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2017

Bu araştırma, PPR'ye karşı daha önce aşılama yapılmamış koyun ve keçi populasyonlarında enfeksiyonun seroprevalansının araştırılması ve seçilmiş bazı bölgelerde PPR'dan şüpheli küçük ruminantlardan elde edilen örneklerde PPR virus varlığının araştırılması sonucu enfeksiyonun ülkemizdeki son zamanlardaki durumunun ortaya konulması amacıyla gerçekleştirildi. Serolojik araştırma için farklı sürülerden tesadüfi örnekleme tekniği ile toplam 268 adet serum örneği elde edildi. PPRV antijeninin varlığı ve hücre kültürlerinde virus izolasyonu amacıyla enfeksiyondan şüpheli hayvanlardan 19 lenf yumrusu, 25 dalak, 41 akciğer, 36 lökosit, 5 dudak, 5 svap ve 3 dil dokusu örneklerinden oluşan toplam 134 materyal kullanıldı. Bu örnekler PPRV'nin N proteinini kodlayan gene spesifik primerler kullanılarak real-time RT-PCR testine tabi tutuldu. Araştırmada virus izolasyonu amacıyla Vero hücre kültürü kullanıldı.

C-ELISA kullanılarak gerçekleştirilen serolojik çalışmada PPRV'ye spesifik antikor oranı, örneklenen koyun populasyonları için %50,31, keçi populasyonları için %27,52 oranında olmak üzere toplam %41,04 olarak belirlendi. Altmış dört hayvandan elde edilen toplam 134 doku ve lökosit örneğinin 44 adedinde (%32,83) PPRV antijeni saptandı. Virus izolasyon çalışmalarında ise 64 hayvandan (keçi, oğlak, koyun ve kuzu) 134 örnek Vero hücre kültürlerinde 3 kez pasajlandı ve 28 örnekten (%20,89) virus izolasyonu yapıldı.

Sonuç olarak C-ELISA, real-time RT-PCR ve hücre kültüründe virus izolasyonu yöntemleri kullanılarak elde edilen veriler doğrultusunda, günümüzde devam eden aşılama ve kontrol programlarına rağmen Türkiye'deki koyun ve keçi populasyonlarında enfeksiyonun gözlenebildiği ortaya konuldu. Bu nedenle PPR enfeksiyonlarının kontrol ve mücadelesi amacıyla bu virusla akraba kabul edilen sığır vebası enfeksiyonunun dünya üzerinden tamamen eradikasyonu sırasında edinilen deneyimlerin esas alındığı daha katı stratejilerin geliştirilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: C-ELISA; hücre kültürü; PPRV; real time RT-PCR.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Comparative Diagnosis of Peste des Petits Ruminants (PPR) with Methods of Virus Isolation, C-ELISA and Real Time RT-PCR

Berat Selim TOKGÖZ

Department of Veterinary Virology

PhD THESIS / KONYA-2017

In this study, it was aimed to investigate the seroprevalence of PPR in non-vaccinated sheep and goats and to determine recent circulation of PPR virus in field samples from PPR-suspected small ruminants in some selected regions of Turkey. A total of 268 serum samples were obtained from animals by random sampling for serological examination. A total of 134 materials, comprising 19 lymph nodules, 25 spleens, 41 lung, 36 leukocyte, 5 lip, 5 swap samples and 3 tongue samples were collected from the suspected animals (sheep, lamb, goat and goat kid) in terms of the presence of PPRV antigen and virus isolation on cell culture. The collected samples were analyzed by real-time RT-PCR using specific primers that amplify the gene coding for N protein of PPRV. Vero cell line was used for isolation of virus.

PPRV specific antibody was detected 41,04% (110/268) in total (50,31% for sheep population and 27,52% for goat population) by C-ELISA. Among 134 tissue and leukocyte samples from 64 animals, 44 (32,83%) were detected as positive for PPRV. In the virus isolation studies, 134 materials which were obtained from 64 animals (goat, goat kid, sheep, and lamb), were passaged 3 times in Vero cell line, and after that virus isolation was realized from 28 (20,89%) samples.

As a result of this study used C-ELISA, real-time RT-PCR and Vero cell line for virus isolation, PPRV infections still present in spite of vaccination and control programs in sheep and goat populations in Turkey. For this reason, it should be developed more solid strategies for the control of PPR infections that builds upon the lessons learned from rinderpest eradication in the world.

Keywords: C-ELISA; cell culture, PPRV, real time RT-PCR.

1. GİRİŞ

Dünyada, 1990-2012 yılları arasında küçükbaş varlığında artış %21'dir. Yine dünyada 2008-2012 yıllarında keçi varlığındaki değişim %4,8 iken koyun varlığında %3,6 olarak kaydedilmiştir. Türkiye, 2012 yılında 32,3 milyon küçükbaş ile dünyada mevcut hayvan varlığı sıralamasında 12. sıradadır. 2002 yılı baz alınarak yapılan endeks hesaplamasına göre; ülkemiz hayvan varlığında % 36 keçi, %16 koyun artışı bildirilmiştir (Et ve Süt kurumu 2013). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) hayvansal üretim istatistikleri 21822 sayı ve 04.02.2016 tarihinde koyun sayısının 2015 yıl sonu itibariyle 31.508.000 baş, keçi sayısının ise 10.416.000 baş olduğu bildirilmiştir (TÜİK 2016). Bu veriler göstermektedir ki ülkemizdeki hayvan varlığı içinde küçükbaş hayvan varlığı büyük bir oran ile temsil edilmektedir. Koyun ve keçi sürüleri ülkemizde başta ekonomik, doğa koşulları, iklim koşulları göz önüne alındığında birkaç başlık işletmelerden büyük sürülere kadar çeşitlilik göstermektedirler. Coğrafi yapısı küçükbaş hayvan yetiştiriciliği için çok uygun olmasına rağmen ülkemizin mevcut koyun yetiştiriciliğinin:

- Yetiştiricilikte düşük verimli yerli koyun (akkaraman, morkaraman, ivesi gibi) ırklarnın kullanılması ve bu ırkların yeteri kadar ıslah çalışmaları ile iyileştirilememesi,
- Küçük aile tipi işletmelerin yaygın olması,
- Meraların çeşitli sebeplerle azalması, mera alanlarının bilinçsiz bir şekilde kullanılması,
- Kış aylarında meraya çıkartılamayan koyunlara ihtiyaçlarını karşılamak için yeteri kadar kaba yem yetiştirilememesi,
- Yem maliyetlerinin yüksek olması,
- Kuzuların besi gelişimini tamamlamadan kesilmesi,
- Pazarlamada karşılaşılan problemler,
- Çiftçilere verilen eğitim ve bilgilendirme programlarının yetersizliği,
- Salgın hastalıklarla mücadelede karşılaşılan problemler (Öztürk 2000) gibi hem hayvan sayısını azaltan hem de verim düşüklüğüne neden olan birçok sorunu bulunmaktadır.

Koyun sayılarında görülen düşüşlerin temel nedenleri arasında yukarıda belirtilenlere ek olarak enfeksiyöz ajanlar da yer almaktadır. Koyun ve keçi yetiştiriciliği sektöründe önemli ekonomik kayıplara neden olan enfeksiyöz ajanlar;

bakteriler (*Brucella abortus, Brucella melitensis, , fusobacterium nodosus, Bacillus anthracis, Salmonella enteritis, Coxiella burnetti, leptospira interrogans, Chlamydia psittaci, listeria monostagenez, Clostridium perfringens* v.b.), parazitler (protozoon enfeksiyonları, trematod invazyonları, cestod invazyonları, nematod invazyonları ve arthropod enfestasyonları) ve viruslar (pestivirus, morbillivirus, adenovirus, flavivirus, bunyavirus, sheeppoxvirus, orbivirus, aphtovirus, paravaccinia virus, lentivirus) sayılmaktadır (Nettleton ve Entrican 1995).

Viruslar diğer mikroorganizmalardan klinik olarak tanı konulması, teşhis edilmesi ve tedavideki zorluklar yönünden ayrılmaktadırlar. Küçük ruminantların viral enfeksiyonlarından olan Koyun Keçi Vebası (Küçük ruminant vebası, Peste des Petits Ruminants, PPR), koyun ve keçilerde başta olmak üzere yabani ve evcil ruminantlarda, ateş, bronko-pneumoni, ülseratif stomatitis, sindirim sisteminde hemoraji, erozyon, ülser, gastroenteritis, ishal meydana getiren yüksek morbidite ve mortalite ile perakut, akut ve subakut klinik seyirli bir enfeksiyondur (Diallo 1988, Scott 1990, Dhar ve ark 2002, Sağlam ve Temur 2009).

1.1. Etiyoloji

PPR virusu (PPRV), önceleri küçük ruminantlara adapte olmuş sığır vebası virusu'nun (RPV) bir suşu olarak kabul edilmiştir. PPRV'nin RPV'den fizikokimyasal özellikler yönünden farklı bir virus olduğu, yapılan kros nötralizasyon ve elektron mikroskobik çalışmalarla anlaşılmıştır. *Morbillivirus* genusuna ait diğer beş virus (Canine Distemper Virus, Dolphin Distemper Virusu, Measles Virus, Porpoise Distemper Virus ve Phocine (seal) Distemper Virusu) ve RPV ile biyolojik ve antijenik özellikler yönünden yakınlığı belirlenmiştir (Albayrak ve Alkan 2009, Abubakar ve ark 2011b). Moleküler tekniklerin ilerlemesiyle RPV'nin PPRV'den farklı bir virus olduğu ortaya konulmuştur. *Morbillivirus* grubu viruslarda esteraz ve neuraminidaz aktivitesi bulunmamaktadır (Albayrak 2007).

PPR, *Paramyxoviridae* ailesinden *Morbillivirus*'un yol açtığı akut bulaşıcı viral bir enfeksiyondur (Alçığır ve ark 1996, Choi ve ark 2003, Rahman ve ark 2004, Hosamani ve ark 2006, Bao ve ark 2008). Bu enfeksiyon özellikle koyun, keçi ve yabani küçük ruminantları etkilemektedir (Milli ve Haziroğlu 1997, Burgu ve Akça 1998, Couacy-Hymann ve ark 2002, Ezeibe ve ark 2004, Manoharan ve ark 2005, Balamurugan ve ark 2007). PPRV enfeksiyonu; 'keçilerin enteritis ve erezyonlu

stomatitisi, kata, keçi kataral ateşi, yalancı sığır vebası, keçi vebası veya stomatitis pnöymoenteritis kompleks' gibi farklı isimlerle de tanımlanmaktadır (Abubakar ve ark 2011b).

PPRV'nin RPV ile olan yakınlığı belirtilmiş, fakat PPRV sığırlarda antikor oluşturmasına karşılık enfeksiyon şekillendirmediği, oysa sığır vebası'na (RP) koyun ve keçilerin her zaman duyarlı olduğu bildirilmiştir (Alçığır ve ark 1996). Son konakçı olan sığır ve domuzlarda gerek doğal gerekse deneysel PPR enfeksiyonu görülebilmektedir. Sığır ve domuzlarda immünolojik cevap oluşmasına rağmen, virus saçılımı ve klinik enfeksiyon görülmez (Tatar ve Kabaklı 2006). PPR virusu serolojik olarak tek tiptir ve değişik virulens özellik gösteren suşlarının olabileceği bildirilmiştir (Couacy-Hymann ve ark 2002).

Virusun, nükleoprotein (N) ya da kısmi füzyon proteini (F)'nin temel alındığı gen sekans analizlerine göre dört farklı soy grubuna (I, II, III, IV) ayrıldığı bildirilmiştir. Sadece soy IV Asya'da görülür iken (Balamurugan ve ark 2007, Abubakar ve ark 2011a), soy I ve II'nin Afrika'nın batısı ve merkezinde, soy III'ün ise Doğu Afrika ve Orta Doğu'da görüldüğü bildirilmiştir. Son çalışmalarda, soy IV'ün Kuzey ve Kuzey Doğu Afrika'da olmak üzere Afrika kıtasında tespit edildiği bildirilmiştir. (Kwiatek ve ark 2011, Munir ve ark 2012, El Arbi ve ark 2014).

PPRV tek iplikçikli, negatif polariteli, linear, segmentsiz RNA (Ribonükleik asit) içerir ve sitoplazmada replikasyonlarını gerçekleştirir (Albayrak ve Alkan 2009). Virionlar doğada 130-390 nm arasında değişen çapta pleomorfiktir. Virus zarfı 8-15 nm kalınlığında olup membran boyunca uzanan 8,5- 14,5 nm uzunluğundaki glikoprotein çıkıntıları (spike) içermektedir (Abubakar ve ark 2011a). Bu grubun içerisinde yar alan viruslar, hemaglutinin (H) proteini, matriks (M) proteini, genomik virus RNA'sını çevreleyen nükleokapsid (N) proteini, polimeraz (büyük protein için L) proteini, füzyon (F) proteini ve fosfoprotein (P) olmak üzere 6 yapısal protein içermektedir (Abubakar ve ark 2011b, OIE 2012). Ayrıca C ve V yapısal olmayan proteinleri de içermektedirler (Bao ve ark 2008). Yapısal olmayan C ve V proteinleri enfeksiyon oluşumunda ve virusun replikasyonunda rol oynamaktadır (Batten ve ark 2011). Morbilliviruslar arasında, N proteini nükleokapsid yapısının büyük bir bileşenidir ve en fazla miktarda bulunan viral proteindir. Virus transkripsiyonu ve replikasyonunda büyük bir rol oynadığı

bilinmektedir (Singh ve ark 2004a). N protein geni virus genomunun 3´ ucunda yer alır (Kwiatek ve ark 2010). N proteini P ve L proteinleri ile birlikte ribonükleokapsid protein (RNP) kompleksini oluştururlar (Abubakar ve ark 2011a). Zarfın iç yüzü ile birlikte ilişkilendirilmiş M proteini, virusun iki dış H ve F glikoproteinleri ve nükleokapsid arasında bağlantı kurmaktadır. H ve F glikoproteinleri hücreyi enfekte etmiş virusun penetrasyonu (hücre içine girmesi) ve virusun hücreye bağlanması için sorumlu glikoproteinlerdir (Abubakar ve ark 2011b, OIE 2012). Virus, enfeksiyon oluşumunun ilk basamağı esnasında H proteinini kullanarak konak hücre reseptörüne bağlanır. Bağlanmanın ardından, F proteini konak hücre membranı ile viral zarfın füzyonuna aracılık etmekte ve viral RNP kompleksinin hücre sitoplazması içerisine girmesine yol açamaktadır. F ve özellikle de H proteininin virusa karşı oluşan koruyucu hücre immun yanıtını tetiklemek için çok önemli olduğu düşünülmektedir (Abubakar ve ark 2011a).

PPRV çevre şartlarına oldukça duyarlıdır. PPRV güneş ışığı, ısı ve ultraviyole ışınlarına oldukça duyarlıdır. PPRV 37 ^{0}C'de 2 saatte, 50 ^{o}C'de 30 dakikada inaktive olmaktadır. Aşırı asidik (pH<4) ve alkali (pH>10) çözeltiler virusun (Gülyaz ve Özkul 2005) inaktif olmasına sebep olurken, pH 7,2-8,0 PPRV replikasyonu için en uygun pH'dır. PPRV'nin inaktivasyon süresini ısı ile 1 molar magnezyum sülfat yavaşlatmaktadır. Virus zarı lipid yapıda olduğu için yağ eriticilere ve dezenfektanlara duyarlıdır. Dezenfektan olarak iodin, %2 sodyum hidroksit (NaOH) ve yağ eritici olarak fenol, alkol, eter v.b. kullanılabilir. PPRV karkaslarda lenf yumrularında laktik asit oluşumuna engel olduğundan, +4°C'de 8 gün enfeksiyöz olarak kalabilmektedir (Scott 1990).

Vero (African Green Monkey Kidney) ve Primer kuzu böbrek hücreleri virus izolasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca BHK-21 (Baby hamster kidney-21), MDBK (Madine darby bovine kidney), ve 293T (Transformed human embryo kidney) hücreleri de kullanılmaktadır (Tatar ve Alkan 1999, Özkul ve ark 2002, Gülyaz ve Özkul 2005, Couacy-Hymann ve ark 2007). Hücre kültürü ile virus izolasyonunun zor olduğu durumlarda küçük ruminantlara inokulasyon uygulamaları yapıldıktan sonra virus izole edilebildiği ifade edilmiştir (Gülyaz ve Özkul 2005, Couacy-Hymann ve ark 2007).

1.2. Epidemiyoloji

PPR, dünyada ilk kez Afrika'nın Cote d'Ivoire (Fil Dişi) sahillerinde 1942 yılında koyun ve keçilerde rapor edilmiştir (Burgu ve Akça 1998, Ezeibe ve ark 2004, Gül ve ark 2006, Balamurugan ve ark 2007). Daha sonra PPR Güney-Batı Asya, Hindistan, Orta Doğu, Yakın Doğu'nun çoğu bölgelerinde, Arap Yarımadası'nda, Afrika'da Ekvator ve Sahra arasında uzanan ülkeler boyunca görüldüğü bildirilmiştir (Alçığır ve ark 1996, Choi ve ark 2003, Rahman ve ark 2004, Tatar ve Kabaklı 2006, Abubakar ve ark 2008, Aytekin 2008). Güney Asya, Batı ve Doğu Afrika'da gelişmekte olan birçok ülkede sınır tanımayan bir enfeksiyon olarak kabul edilir (Kwiatek ve ark 2010, Batten ve ark 2011). Ülkemizde 1990'lı yıllarda büyük salgınlara sebep olan RP mücadelesi bitmeden, gayri resmi ilk PPR vakası 1996 yılında görülmüştür (Gülyaz ve Özdemir 2010). Çeşitli araştırmacılar ülkemizde PPRV enfeksiyonunun varlığını, yaygınlığını bildirmişlerdir. (Tatar ve Kabaklı 2006). En son olarak ülkemizde Temmuz-Aralık 2016 tarihleri arasındaki 6 aylık dönemde 18 adet yeni salgının gözlendiği (OIE 2017a), dünyada ise Ocak-Şubat 2017 tarihleri arasında İsrail'de 4 adet ve Moğolistan'da 2 adet salgın bildirilmiştir (OIE 2017b).

PPR, Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi (OIE)'nin A listesinde yer alan viral bir enfeksiyondur (Kabaklı ve ark 2006, Hosamani ve ark 2006, Balamurugan ve ark 2007). Ülkemizde PPR 1997 yılında ihbarı mecburi hastalıklar listesine alınmıştır (Albayrak 2007, Gülyaz ve Özdemir 2010).

PPR salgın özelliği, yüksek morbidite ve mortalite oranı ile çok büyük maddi kayıplara neden olarak koyun ve keçi yetiştiriciliğinde ekonomik önem arz etmektedir (Kabaklı ve ark 2006, Hosamani ve ark 2006, Balamurugan ve ark 2007, Abubakar ve ark 2008, Bao ve ark 2008). PPR morbiditesinin %80-100, mortalitesinin ise hastalanan hayvanların yaşına bağlı olarak %80'e kadar çıkabildiği bildirilmiştir. Morbidite ve mortalite oranları % 90 ve 100'e kadar yüksek olabilir ve ciddi bir salgında mortalite %100'e ulaşabilir (Couacy-Hymann ve ark 2002, Rahman ve ark 2004, Gülyaz ve Özdemir 2010). Ancak bu oranların, bazen %20'den daha az mortalite görülmesi ile çok çeşitlilik gösterebildiği vurgulanmıştır. PPRV Asya ve Afrika'nın çeşitli bölgelerinde endemik olarak rapor edilmiştir. (Balamurugan ve ark 2007, Abubakar ve ark 2008). Yapılan sürvelans çalışmaları ve

filogenetik analizler PPRV'nin daha önceleri görülmediği bölgelere çok hızlı bir şekilde yayılabildiğini ortaya koymaktadır (Batten ve ark 2011).

PPR enfeksiyonu özellikle koyun ve keçilerde görülmekle beraber keçiler koyunlara oranla daha duyarlı türdür (Rahman ve ark 2004, Aytekin 2008, OIE 2012). Aynı bölgede bulunan koyun ve keçi sürülerinde bile farklılıklar olabilmektedir. Keçilerde ölümler meydana gelirken koyunlarda klinik semptom bile görülmeyebilmektedir. PPR enfeksiyonuna duyarlılıkta tür farklılığı yanında yaş faktörü de önem arz etmektedir. Enfeksiyonun endemik olduğu bölgelerde 3-18 aylık yaş grubundaki genç hayvanlar diğer yaş grubundaki hayvanlara oranla daha hassastır (Gül ve ark 2006). Ayrıca PPR'ın ölü doğum ve abortlara da neden olduğu bilinmektedir (Güler ve ark 2014). İnsidens olarak mevsimsel farklılık olmamasına rağmen, soğuk ve yağmurlu mevsimlerde, yoğun hayvan hareketlerininin görüldüğü dönemlerde ve doğum sezonlarında enfeksiyona çok sık rastlanılmaktadır (Aytekin 2008).

1.3. Patogenez

PPRV birçok doku ve organa affinite göstermekle beraber, daha çok akciğer, lenforetiküler dokulara, solunum ve sindirim sistemi epitel hücrelerine affinite gösterir. PPRV üst solunum yollarına aerosol yolla girdikten sonra diğer dokulara yayılmaktadır (Albayrak 2007). PPRV aerosol yolla vücuda üst solunum yolundan girer, diğer doku ve organlara buradan yayılır. Nazofarengial mukoza PPRV'nin konakçıya bulaşmasındaki en önemli giriş yoludur. Klinik semptomlardan önce sekret ve ekstrektlerle virus saçılmaktadır Ayrıca ishal semptomlu koyunlarda gaitadan virus saçılımı olmaktadır. PPRV dille beraber oral lenf yumrularında primer enfeksiyon şekillendikten 2-3 günde viremi fazı meydana gelir. Bu durumu takiben affinite olduğu dokularda replikasyonunu gerçekleştirerek 1-2 günde lezyonlar oluşur (Sumption ve ark 1998). Deneysel olarak enfekte edilen keçilerdeki bulgulara göre, virus saçılımının vücut ısısı artışından (Enfeksiyondan 6-7 gün sonra) hemen sonra meydana geldiği görülmektedir. Virus konsantrasyonu 9 ile 11. günler arasında sekret ve ekstretlerde artış gösterir, 13. günden sonra azalmaya başlar (Singh ve ark 2004a).

1.4. Klinik Bulgular

PPR'da hayvanın türüne, ırkına, yaşına, maruz kalınan virus miktarına, enfeksiyonun ekzotik veya endemik olmasına ve sekonder enfeksiyonlara bağlı olarak klinik seyir perakut, akut ve subakut formda şekillenebilmektedir (Gül ve ark 2006, Tatar ve Kabaklı 2006).

Klinik enfeksiyon büyükbaş hayvanlarda görülen RP'ye benzemektedir (Choi ve ark 2003, Rahman ve ark 2004, Singh ve ark 2004a, Tatar ve Kabaklı 2006). İnkübasyon periyodu 4-6 gündür, fakat 3-10 gün arasında değişebilir. Klinik semptomlar 3-5 gün sürebilen 41°C ateş ile seyreden akut enfeksiyon seyri gösterir (Gülyaz ve Özdemir 2010, Tarakçı 2014). Bu hayvanlarda depresyon, anoreksi görülür. Seroz okulonazal akıntılar zamanla artarak mukopurulent akıntı haline dönüşür ve eğer ölümle sonuçlanmazsa 14 gün boyunca devam eder. Ateşin başlangıcından 4 gün içinde dişetlerinde hiperemi ve aşırı tükrük salgısı ile oral kavitede eroziv lezyonlar gelişir. Bu lezyonlar nekrotik olabilir. Sulu kanlı ishal sonraki aşamalarda daha yaygındır. Pneumoni, öksürük, hırıltı ve abdominal solunum da meydana gelebilir (Alçığır ve ark 1996, Milli ve Haziroğlu 1997, Choi ve ark 2003, Rahman ve ark 2004, Kabaklı ve ark 2006, Aytekin 2008, Gülyaz ve Özdemir 2010).

1.5. Nekropsi Bulguları

PPRV'den etkilenen hayvanlar genellikle çok zayıf, arka tarafları yumuşak sulu dışkı ile kirlenmiş ve göz yuvaları çökmüştür (Chauhan ve ark 2009). Nekropside, PPR'da meydana gelen dudak kenarları boyunca belirgin kabuklar ve şiddetli intersitisyel pnömoni hariç diğer lezyonlar RPV ile etkilenmiş sığırlarda görülenlere çok benzerdir. Eroziv lezyonlar ağızdan retikülo-rumen kavşağına kadar uzayabilir (OIE 2012). Dil, dudak, diş etleri başta olmak üzere farenks ve damak mukozasında hiperemi, erozyon ve ülserler (Chauhan ve ark 2009) görülür. Sindirim sisteminde nekrotik odaklar, ülseratif lezyonlar görülür. Özofagustaki lezyonlar genellikle üst 1/3'lük bölümde görülmektedir. Doğal bir enfeksiyonda karekteristik ağız lezyonları 24- 48 satte şekillenmesine rağmen, bu lezyonların şekillenmediği olgularda görülmüştür. Otopside, rumen ve retikulumda kanama ülser ve erozyonlar görülmesiyle beraber abomazum ve bağırsaklarda daha geniş çapta lezyonlar görülür. Çoğunlukla kanamalar rumende papillalarda olabilirken, bağırsaklarda ileosekal

kısımda görülür (Epikmen 2009). Nekropside kalın bağırsakta karakteristik zebra görünümü oluşur ancak bu bulgu yeterli bir bulgu değildir (Choi ve ark 2003, Singh ve ark 2004a). Karakteristik çizgisel kanamalar veya zebra çizgileri kalın bağırsakta çoğunlukla caeco-kolik kavşakta meydana gelir; nekrotik hemorajik enterit genellikle mevcuttur. Lenf nodülleri büyür, dalakta nekrotik lezyonlar görülebilir (OIE 2012).

Solunum sisteminde, burun mukozasından başlamak üzere larenks ve trake mukozası boyunca erozyon, çok odaklı kanamalar ve mukopurulent eksudat görülmektedir. Bu bulgular PPR'ın RP'den ayrımında kullanılmaktadır. (Epikmen 2009). Akciğerlerin apikal loplarında lezyonların olduğu bildirilmiştir (Gülyaz ve Özdemir 2010). Akciğerin lezyonlu bölgeleri koyu kırmızı ya da mor renktedir (Chauhan ve ark 2009). BT, Koyun-keçi çiçeği, pestivirus enfeksiyonları gibi mix enfeksiyonlarda ve sekonder bakteriyel enfeksiyonların neden olduğu pneumoni vakaları PPRV'nin bağışıklık sistemini baskılaması sonucu sık gözlenebilir (Güler ve ark 2014). Bakteriyel enfeksiyonla beraber olduğu zaman bronkopneumoni ya da akciğerlerde konjesyon lezyonları meydana getirebilir (Choi ve ark 2003, Singh ve ark 2004a).

PPRV ile çalışan insanlar için bir sağlık riski bilinmemektedir (OIE 2012). Ayrıca ölü doğum ve abort vakalarında atipik klinik ve patolojik bulguların virusun beyine yerleşmesi sonucu oluştuğu bildirilmiştir (Güler ve ark 2014).

1.6. Histopatolojik Bulgular

PPRV genellikle üst sindirim sistemi ile solunum sistemine yerleşmektedir (Aytekin ve ark 2011). PPRV enfeksiyonunda oral, nazal ve farengeal mukozada şiddetli ve yaygın lezyonlar mevcuttur (Truong ve ark 2014). PPRV ile enfekte hayvanların ağzındaki erozyonlu ve ülserli bölgelerden alınan doku kesitleri incelendiğinde stratum spinozumda balonumsu dejenerasyon sağlam epitel hücrelerinde eozinofilik intrastoplazmik ve intranüklear inklüzyon cisimcikleri, epitel hücrelerinin birleşerek oluşturduğu çok çekirdekli sinsityal dev hücreleri (Alçığır ve ark 1996, Epikmen 2009, Aytekin ve ark 2011) ve çekirdeklerde karyoreksis submukozada ödem ve mononüklear hücre infiltrasyonu görülür (Alçığır ve ark 1996). Nötrofil infiltrasyonu ve ödem ile epitel hücrelerinde nekroz (Truong ve ark 2014) sonucu mukoza yüzeyinde epitel hücrelerinde dökülme şekillenir. Ayrıca mukozada sekonder etkenlerinde olaya karışmasıyla mikroapse odakları

görülür (Epikmen 2009). Ayrıca abomazumda bazı bez epitel hücrelerinde de intrasitoplazmik ve intranüklear inklüzyon cisimciklerine rastlanılabilinmektedir (Alçığır ve ark 1996). İnce bağırsaklarda lezyonlar kütleşmiş villuslar ve kript epitellerinde dejenerasyon ile karakterizedir (Epikmen 2009, Truong ve ark 2014). Villuslar şişkin olup intrasitoplazmik ve intranüklear inklüzyon cisimcikleri görülür (Alçığır ve ark 1996). Lamina propriyanın mukoza ve submokozasında, kript epitellerinde mononüklear hücre infiltrasyonu ile sinsityal hücrelerle karşılaşılabilmektedir. Lamina propriyada genişleme ve payer plaklarında lenfositlerde şiddetli azalma görülür (Truong ve ark 2014). Bağırsak lümenlerinde dökülmüş epitel hücreleri ile karşılaşmak mümkündür (Epikmen 2009).

Lenf yumrularında, lenfositlerde azalma ile karakterize lezyonlar görülmektedir. Lenfositlerin çekirdeklerinde çok sayıda piknoz ve karyoreksis şekillenmektedir. Lenf yumrularında epitel hücrelerinde intranüklear inklüzyon cisimcikleri, çok sayıda sinsityal hücreleri ve lenfositlerde apoptozis ile karşılaşılmaktadır (Truong ve ark 2014). Lenf yumrularının sinuslarında genişleme ve içlerinde makrofajlar görülmektedir (Epikmen 2009). Dalakta sinsityal hücrelerin yanında, beyaz pulpasında lenf yumrularında olduğu gibi lenfositlerde azalma ve kırmızı pulpasında artış görülür (Truong ve ark 2014). Karaciğerde multıfokal koagülasyon nekroz alanlarında hepatosit kayıpları, nonspuratif inflamasyon ve sinsityal hücreler dikkati çeker. Bronş ve bronşiyol mukozasında yer yer kayıpların olmasıyla beraber epitel hücrelerinde vakuoler dejenerasyon, hiperplaziye bağlı epitel hücrelerinde kayıplar görülür. Hiperplazik tip 2 pneumosit ve iltihaplı hücre infiltrasyonu (makrofaj, lenfosit, nötrofil) ile alveol duvarlarında genişleme görülür. Epitel hücrelerin yer yer hiperplazik ve yassı epitele dönüştüğü alanlar da görülür (Epikmen 2009, Truong ve ark 2014). Bronş ve bronşiyol epitellerinde intrasitoplazmik ve intranüklear inklüzyon cisimcikleri dikkati çeker (Alçığır ve ark 1996, Aytekin ve ark 2011, Truong ve ark 2014). Bronkopnömoni ile beraber seyreden olgularda; trake, bronş, bronşiyol ve alveol lümenlerinde hücre infiltrasyonu ile beraber dökülmüş epitel hücreleri görülür. Alveol lümenlerinde sinsityal hücreler tespit edilmektedir. Alveoler makrofajlarda intrasitoplazmik ve intranüklear inklüzyon cisimcikleri ve sinsityal hücre infiltrasyonu görülebilir (Epikmen 2009, Truong ve ark 2014). Sekonder bakteriyel enfeksiyonlarda şiddetli fibrinli bronkopneumoni gözlenebilmektedir (Truong ve ark 2014).

1.7. Teşhis

PPR'ın klinik bulgularla geçici tanısı yapılabilir, ancak benzer bulgular gösteren diğer enfeksiyonlarla ayırıcı tanısı için laboratuvar onayı gereklidir (Diallo 1988). PPRV enfeksiyonu sindirim, solunum ve sinir sistemini etkilemesi sebebiyle bir çok enfeksiyon etkeninden ayırt edilmesi gerekmektedir. PPR enfeksiyonu RP, BT, FMD gibi enfeksiyonlardan ayırt edilmelidir. Ayrıca pastörellozis, BT, ektima, BD, çiçek, keçi plöyropnöymonisi (CCPP), koksidiozis, kriptosporodiozis ve kolibasillozis enfeksiyonları ile karışabilmektedir (Chauhan ve ark 2009). Pastörellozis çoğu vakada, PPRV tarafından immun sistemin baskılanması sonucu ortaya çıkan sekonder bir enfeksiyon olarak ortaya çıkmaktadır. PPRV yakın temas halinde yaşayan hayvanlar arasında aerosol olarak bulaşır (Tarakçı 2014). Bu sebeplerle, klinik belirtiler PPRV enfeksiyonundan şüphe edilse de kesin teşhis laboratuvar tanısı ile konulmalıdır (Chauhan ve ark 2009).

PPRV yakın ilişki içerisinde bulunduğu RPV'den ayırt edilmesi gerekir (Raj ve ark 2000). PPR'ın RP'nin eradike edilmeden önce endemik kaldığı bölgelerde mevcut olduğu bilinmektedir. PPRV özellikle küçük ruminantları (örneğin koyun ve keçi gibi) etkilerken RPV büyük ruminantlarda (örneğin sığır, manda ve öküz) hastalıklara sebep olmuş her iki virus büyük ve küçük ruminant türlerini etkileyebilmiştir (Choi ve ark 2003). Genellikle sığırların subklinik enfekte olduğu kabul edilmektedir. Ancak kötü koşullarda sığırlarda PPRV enfeksiyonu RP enfeksiyonuna benzer lezyonlar geliştirmesi mümkün olabildiği bildirilmiştir (Raj ve ark 2000). RPV'yi PPR'dan ayırmada N proteininden faydalanılarak farklı teşhis metotları geliştirilmektedir (Kwiatek ve ark 2010). RPV'den PPR'ı ayırt etmek için uygun teknikler, domuz veya tavuk eritrositleri kullanılan hemaglutinasyon, polimeraz zincir reaksiyonu, virusa spesifik monoklonal antikor bir immunocapture enzyme linked immunosorbent assay (İmmunocapture ELISA) (I-ELISA), cDNA (komplementer DNA) probları ve virus nötralizasyon testleri olarak sayılabilir (Raj ve ark 2000). Benzer şekilde PPRV antikorları serum nötralizasyon testleri ve competetive enzyme linked immunosorbent assay (C-ELISA) testleri ile RPV antikorlarından ayırt edilebilirler (Singh ve ark 2004b).

PPRV'nin kontrol önlemlerinin etkin bir şekilde uygulanabilmesi için teşhisin hızlı duyarlı ve özel yöntemlerle yapılması gerekmektedir. PPRV ile enfekte küçük ruminantlar rutin klinik muayene, makroskobik, histolojik bulgular ve laboratuvar teyidi ile teşhis edilir. Birçok serolojik ve moleküler teşhis yöntemleri PPRV tespiti için kullanılır (Kwiatek ve ark 2010, Abubakar ve ark 2011b).

1.7.1.Virusun İdentifikasyonu

1.7.1.1. Örneklerin toplanması

PPRV'nin teşhisi amacıyla akut viremi döneminde vücut sıcaklığı yüksek hayvanlardan defibrine kan, svap (konjunktival, nazal ve oral) örnekleri, biyopsi yapılabilme durumunda lenf yumrusu biyopsi materyali, ölen ve/veya öldürülen hayvanlardan dil, dudak, yanak ve damakta lezyon mevcut ise lezyonlu bölgeden doku parçası, akciğer, lenf yumrusu ve dalak alınabilir (Albayrak ve Alkan 2009, OIE 2012). Alınan materyaller soğuk zincirde en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır. Alınan örneklerden virusu izole edebilme ihtimalini arttırmak için canlı hayvanlarda viremi döneminde ve sekonder enfeksiyon şekillenmeden önce almaya dikkat edilmelidir. Ölen ve/veya öldürülen hayvanlardan örnek alırken kokuşma şekillenmemiş olmasına ve ölüm şekillendikten sonra en kısa sürede örnek almaya dikkat edilmelidir (Albayrak 2007). Hızlı tanı enzim bağlantılı I-ELISA, counter immünoelektroforez ve agar jel immünodiffüzyon ile yapılır. Aynı zamanda Polymerase Chain Reaction (PCR) da uygulanabilir (Gülyaz ve Özdemir 2010, OIE 2012).

Canlı hayvanlarda, svaplar konjunktival akıntı, nazal ve bukkal mukozadan alınmalıdır. Hastalığın çok erken döneminde, hematoloji ve PCR'da virus izolasyonu için antikoagulanlı kan alınır. Nekropside (2-3 hayvan), lenf nodülleri, özellikle mezenteriyel ve bronşiyal nodüller, akciğerler, dalak ve bağırsak mukozası aseptik koşullarda alınıp buzdolabında veya buz üzerinde muhafaza edilmesi gerekir (OIE 2012). Histopatoloji için toplanan organ parçaları %10 formol içine konulur. Salgın sonunda serolojik testler için kan toplanabilir (Albayrak 2007).

1.7.1.2. Viral Antijen Tespiti

1.7.1.2.1. Agar jel immunodifüzyon

Agar jel immundifüzyon (AGID) herhangi bir laboratuvarda uygulanabilen pahalı olmayan çok basit bir testtir (OIE 2012). Sonuçlar ortalama 24- 48 saat içinde elde edilir, fakat bu test düşük miktarda viral antijenin saçıldığı hafif PPR olgularında duyarlı değildir (OIE 2012). Saha çalışmalarında AGID yaygın kullanılan bir metottur. Hem antijen hem de antikor varlığını saptamakta AGID testi yaygın olarak kullanılmaktadır (Albayrak 2007).

1.7.1.2. 2. Counter immunoelektroforezis

Counter immunoelektroforezis (CIEP), viral antijen saptamanın çok hızlı bir yöntemi olarak kabul edilmektedir (OIE 2012). CIEP testinde jel ve elektriksel alan kullanılarak hassasiyetin arttırılması dışında, prensip olarak AGID testine benzemektedir (Albayrak 2007).

1.7.1.2. 3. Immunocapture enzyme-linked immunosorbent assay

I-ELISA PPRV antijen tayini için virusa özgü, duyarlı, hızlı bir testtir (Balamurugan ve ark 2007, Abubakar ve ark 2011b). N proteinine karşı hazırlanan 3 farklı monoklonal antikor (MAb) kullanılarak hazırlanan ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ile PPRV ve RPV'nin ayırıcı tanısı hızlı bir şekilde yapılabilmektedir. Bu özellik, her iki hastalığın da benzer coğrafik dağılıma sahip olmasından ve aynı hayvan türlerini etkileyebilmelerinden dolayı oldukça büyük önem arz eder. (Choi ve ark 2003, OIE 2012). I-ELISA PPRV ve RPV'yi ayırt etmekte kullanılabilir. I-ELISA, AGID testinden daha duyarlıdır (Balamurugan ve ark 2007, Abubakar ve ark 2011a).

1.7.1.2.4. Sandviç ELISA

Teşhis amaçlı sandviç ELISA'dan da yararlanılabilinmektedir. Alınan örnekler ilk önce spesifik MAb ile reaksiyona sokulur daha sonra bu immunkompleks, ELISA pleytine adsorbe edilen ikinci bir MAb ile yakalanmaya çalışılır. Sonuçlar 2 saatte elde edilir (OIE 2012).

Sandviç ELISA basit, hızlı ve uygun maliyetli bir teşhis tekniğidir. Bir hastalığın rutin teşhisi ve yoğun klinik survelansı için tercih edilir. Sandviç ELISA

ve ticari immunocapture ELISA saha şartlarında PPR'ın tanı teknikleridir. Agar jel immunodifüzyon testi ve counter immunoelektroforezis testi gibi bu geleneksel tekniklerde de spesifite ve sensitivite sorunları vardır (Singh ve ark 2004a).

Öte yandan altın standart olan virus izolasyonu, saha koşullarında rutinde pratik değildir. Bunun sebebi ise klinik materyalleri bozan koşullar ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde yetersiz laboratuar şartlarıdır. Sık sık PPRV salgınlarının ortaya çıktığı durumlarda PPRV'nin hızlı bir laboratuvar teşhisi, PPR'ın etkin biçimde zamanında kontrol edilmesi ve önleyici tedbirlerin başlatılması için gereklidir. Sandviç ELISA bu hedefleri yerine getirebilen bir testtir. Sandviç ELISA PPR'ın endemik olduğu Hindistan'da ve diğer Asya ülkelerinde PPRV enfeksiyonunun klinik teşhisi için ucuz kimyasalların kullanıldığı alternatif bir metot olarak hizmet verebilir (Singh ve ark 2004a).

Morbillivirus'ların teşhisi için N geni ve N proteinini kullanan teşhis metotlarına artan bir ilgi söz konusudur. N proteininin hem cross-reaktif epitoplara hem de tip spesifik epitoplara sahip olduğu rapor edilmiştir. Geliştirilen N proteininin bir epitopuna (klon 4G6) yönelik sandviç ELISA testi -20ºC' de altı aydan daha fazla süreyle depolanmış klinik materyallerde bile PPR antijenini tespit edebilmiştir. Bu durum, klinik materyallerin soğuk şartlarda uzun süre depolanmasından sonra uygun koşullarda laboratuvara getirilmesi durumunda teşhis edilebilir olduğunu göstermektedir. N protein temelli teşhisin diğer bir avantajı N proteini üstündeki epitopların geniş coğrafi bölgelerden elde edilen farklı virus soyları arasında korunmuş olduğunun bildirilmiş olmasıdır. Bu özellik farklı coğrafi bölgelerde salgınların belirlenememesini önlemeye yardımcı olmaktadır. Hindistan'ın çeşitli yerlerindeki PPR salgınları bu test kullanılarak doğrulanmıştır (Singh ve ark 2004a). Sandviç ELISA'nın yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlarını ekarte etmek için, Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ve PCR-ELISA gibi daha hassas alternatif teşhis metotlarının kritik örneklerde kullanılabileceği vurgulanmıştır (Singh ve ark 2004a).

AGID, CIEP ve indirekt ELISA gibi geleneksel tekniklerle, PPR ve RP enfeksiyonları birbirinden ayırt edilemez iken bu durumun üstesinden gelmek için, RT-PCR tekniği, virus nötralizasyon testi, MAb bazlı ELISA'lar ve cDNA hibridizasyonu gibi özel teknikler kullanılmıştır. PPRV enfeksiyonu tanısı için iki

hassas metot olan RT-PCR tekniği ve cDNA hibridizasyonu, büyük miktarlardaki örneklerin rutin teşhisinde çok zaman alıcı ve uygunsuz metotlardır. Diğer taraftan, koşulların uygun olmadığı durumlarda örneklerden virus izolasyonu her zaman mümkün olmamaktadır. Diğer teşhis metotlarındaki dezavantajlar MAb temelli immuno-capture ELISA testinin saha şartlarında PPR enfeksiyonunun teşhisi için çok basit ve etkili olduğunu kanıtlamıştır (Singh ve ark 2004a).

1.7.1.2. 5. Nükleik asit tespit yöntemleri

Hücre kültüründe PPRV izole edilmeden virusun N proteinine karşı ^{32}P ile işaretlenmiş cDNA probları kullanılmıştır (Albayrak 2007). Ayrıca cDNA ^{32}P RP ve PPR'yi ayırt etmek için kullanılır, fakat bunların rutin tanıda kullanımı kullanıcıları radyoaktif maddelerden korumak için özel ekipman gerektirdiği ve ^{32}P'nin kısa yarılanma ömrü yüzünden tavsiye edilmemektedir (Abubakar ve ark 2011a). Radyoaktif olmayan Biotin ve dioksin ile işaretlenerek üretilen cDNA probları ile radyoaktivitenin olumsuz özellikleri ortadan kaldırılmıştır. İki probu kıyasladığımız zaman, radyoaktif olmayan problar daha hızlı sonuç vermekte aynı zamanda radyoaktif problar kadar spesifite göstermektedir. Ancak radyoaktif problar daha duyarlıdır (Albayrak 2007).

PCR virus izolasyonu ile kıyaslandığında, kokuşmaya başlayan ve az virus miktarına sahip olan materyallerde daha duyarlı bir metottur. PCR'ın etkinliğini pek çok faktör etkilemektedir. Materyalin kalitesi, hedef DNA (Deoksiribonükleik asit) uzunluğu, siklus sayısı, bağlanma uzama ısı değişiklikleri etkinliğini etkileyen faktörler olarak sıralanabilir. RNA içeren PPRV'de RNA'nın DNA'ya dönüşmesinde reverse transkription (RT) işlemi yapılmaktadır. (Couacy-Hymann ve ark 2002, Özkul ve ark 2002). Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu ve nükleik asit hibridizasyon reaksiyonu gibi moleküler teknikler genellikle kullanılan tekniklerdir. Bu genom tabanlı teknikler, yüksek spesifite ve sensitiviteye sahip olduklarından büyük oranda kullanılmaktadırlar (Couacy-Hymann ve ark 2002, Abubakar ve ark 2011b).

RT-PCR tekniği N proteininin amplifikasyonuna dayanır. Ayrıca PPR'ın spesifik tanısı için F protein genlerinin amplifikasyonu geliştirilmiştir (Manoharan ve ark 2005). 1995'den beri birkaç RT-PCR tekniği PPRV'nin spesifik ve hızlı tanısı için geliştirilmiştir (Bao ve ark 2008). Bu teknik diğer testlerle karşılaştırıldığında

daha duyarlıdır. Sonuçlar RNA ekstraksiyonu dahil olmak üzere, 5 saatte elde edilebilmektedir. Fransa'da bulunan OIE ve FAO referans laboratuarı PPR için bu tekniğin kullanımını tavsiye etmektedir. N ve M protein genlerinin parçalarının amplifikasyonuna dayanan bir multipleks RT-PCR bildirilmiştir. N geni tabanlı RT-PCR'ın başka bir formatı da tarif edilmiştir (OIE 2012). Konvansiyonel RT-PCR testleri yüksek kontaminasyon riski ve PCR ürünlerinin bulunmasında jel analizi gerektirdiği gibi iş yükünü arttıran sebeplerden ötürü fazla örnek çalışılması gereken durumlarda tercih edilmemektedir. Real time RT-PCR testlerinde kapalı sistem amplifikasyon ve analiz yapıldığından konvansiyonel RT-PCR testlerinden çok avantajlıdır. Real time RT-PCR testleri yüksek sensiviteye, hızlı performansa ve düşük kontaminasyona sahiptir. Real time RT-PCR testleri RNA'nın kantitatif ölçülmesine izin vermektedir (Bao ve ark 2008). Ayrıca son zamanlarda M genini hedefleyen bir real time RT-PCR ve N genini hedefleyen iki real time RT-PCR testi geliştirildiği bildirilmektedir (Batten ve ark 2011). Virusların sekans ve filogenetik analizleri ile genetik akrabalık düzeyleri belirlenebilmektedir (Özkul ve ark 2002, Güler ve ark 2014).

1.7.1.2.6. Virus izolasyon yöntemleri

Virus izolasyonu için, viremi dönemindeki canlı hayvanlardan alınan svap ve defibrine kan örneklerinden, ölen ve/veya öldürülen hayvanlarda ise ağız lezyonlarından (Gülyaz ve Özkul 2005), dalak, akciğer ve lenf yumrusundan alınan örnekler kullanılmaktadır (Albayrak ve Alkan 2009). Hücre kültüründe virus izolasyonu birkaç farklı hücre hattı ile yapılabilmektedir (Abubakar ve ark 2011b). PPRV'nin izolasyonuna fötal kuzu böbrek (FKB) hücrelerinin oldukça duyarlı olduğu bildirilmiştir (OIE 2012). Virus devamlı hücre kültürlerinden Vero hücresinde üretilebilmektedir (Özkul ve ark 2002, Gülyaz ve Özkul 2005). Primer kuzu böbrek ve Vero hücreleri izolasyon için çok yaygın kullanılmaktadır. Özellikle Vero hücreleri devamlı hücre olması, kontaminasyon riskinin az olması ve temin kolaylığı sebeplerinden dolayı birçok laboratuvarda kullanılmaktadır (Albayrak 2007). Ayrıca 293 T hücresinde PPRV üremesine rağmen, B95a (marmoset B) ve MOCL-5 (koyun derive monocyte hücresi) hücrelerinde üremediği bildirilmiştir (Taylor 1984, Abubakar ve ark 2011a). PPRV'nin izolasyonda kullanılan heterolog primer hücre olarak fötal dana böbrek (FDB) hücre kültürlerinde FKB hücre kültürlerine göre daha az PPRV izole edilebildiği bildirilmiştir (Taylor 1984).

Teşhis, hızlı teknikler ile gerçekleştirilmesine rağmen, virus ile daha fazla çalışma için doku kültüründe izole edilmesi gerekir. Şüpheli materyal (svap materyali, buffy coat yada %10 doku süspansiyonları) monolayer hücre kültürlerine inokule edilir ve sitopatolojik efekt (CPE) varlığı yönünden her gün doku kültürü mikroskobu ile incelenir (OIE 2012). PPRV virusun replikasyonu sonucu oluşturduğu intrastoplazmik (is) ve intranüklear (in) inklüzyon cisimcikleri ve F glikoproteini ile konak hücrenin hücre zarını eriterek şekillendirdiği birden çok çekirdekli sinsityal dev hücreleri, meydana getirdiği CPE'ler olarak göze çarpmaktadır. PPRV'nin duyarlı hücrelerde meydana getirdiği CPE'ler 3-19 gün arasında şekillenmektedir (OIE 2012). Sinsityal dev hücre oluşumu; FKB hücrelerinde Vero hücrelerine göre daha büyük ve daha çok sayıda oluştuğu bildirilmiştir (Couacy-Hymann ve ark 2007). Deneysel enfeksiyon oluşturmak ve hücre kültürü ile virus izolasyonunun zor olduğu durumlarda küçük ruminantlara parenteral uygulama ile virus izole etmek için farklı ırk ve yaşlarda koyun ve keçiler kullanılmaktadır (Gülyaz ve Özkul 2005, Couacy-Hymann ve ark 2007). Vero hücrelerinde, bazen sinsitya görmek zordur. Eğer sinsitya varsa, bunlar çok küçük yapıdadırlar. Sinsitya bir 'saat yüzü' görünümü veren çekirdeklerin dairesel düzenlenmesi ile tanınmaktadır. Cover-slip kültürlerde 5 günden daha kısa sürede CPE verebilirler. İntrasitoplazmik ve intranükleer inklüzyonlar gözlenmektedir. Bazı hücrelerde vakuol oluşur. Benzer hücresel değişiklikler enfekte dokuların boyanmış histopatolojik kesitlerinde görülebilir. 5-6 gün sonra CPE şekillenebildiğinden dolayı kör pasajlar her zaman yapılmalıdır (OIE 2012).

1.7.1.2.7. Diğer teşhis metotları

PPRV'nin teşhisinde yukarıda bahsedilen metotların dışında kullanılan teşhis metotlarının da potansiyel yararları olmasına rağmen henüz yaygın olarak kullanılmamaktadır (OIE 2012). Virus izolasyonu için klinik belirti gösteren hayvanlardan alınan materyalleri soğuk koşullarda muhafaza etmek gerekirken, bu materyalleri oda sıcaklığında fikse-formalin çözeltisinde tutmak ve daha sonra immunfloresan (IF) veya immunokimyasal metotlarla analiz etmek de mümkündür (Sağlam ve Temur 2009). Eğer konjunktival sürme preparat (smear) ve nekropside toplanan dokulardaki PPRV immunofloresan ve immunohistokimyasal metotlar ile teşhis edilecekse, smearlar soğuk asetonda fikse edilmektedir. RPV'nin aksine kızamık virusu gibi PPRV'nin de hemaglütinasyon yeteneğine sahip olduğu

gösterilmiştir. Bu PPRV'nin hemaglutinasyon özelliği PPR enfeksiyonunun spesifik, hızlı ve ucuz tanısı için kullanılmaktadır (OIE 2012). PPR enfeksiyonlarında, floresan antikor testi (IFAT) hemaglutinasyon (HA) ve hemaglütinasyon inhibisyon testi (HI), ve immunperoksidaz (IP) testleride teşhisde kullanılmaktadır (Albayrak 2007). HA ve HI testleri basit ve düşük maliyetli olması ile birlikte karşılaştırmalı hassasiyet gösterdikleri için kontrol programlarında rutin sürü taramasında kullanılabilmektedirler (Ezeibe ve ark 2004, Manoharan ve ark 2005, Abubakar ve ark 2011a). HI testi, uygulaması daha zor olan serum nötralizasyon testlerine uygun bir alternatif olarak görünmektedir. Aşı kampanyaları boyunca birçok serumun işlenmesi gerekmektedir ve bu aşı kampanyalarındaki serumların incelenmesinde ELISA testi, HI testinden daha uygun olarak kullanılmaktadır (Raj ve ark 2000).

Ayrıca hazırlanan preparatlarda elektronmikroskop yardımıyla PPRV'nin görülmesiyle de teşhis yapılabilmektedir (Abubakar ve ark 2011a).

1.7.2. Serolojik Testler

PPRV ile enfekte koyun ve keçilerde PPRV'ye karşı oluşan antikorlar serolojik testlerle teşhis edilmektedirler. Rutin olarak kullanılan serolojik testler virus nötralizasyon ve C-ELISA'dır (Gülyaz ve Özdemir 2010, OIE 2012). Sensitivite ve spesifitesi yüksek olan ELISA testi, daha hızlı sonuç vermesi ile virus nötralizasyon testi (VNT)'den daha çok tercih sebebi olmuştur (Choi ve ark 2003, Singh ve ark 2004b). Aynı anda viruslara karşı antikor tespit edebilen serolojik tarama testi olarak mevcut spesifik ELISA testi, Asya, Afrika ve bir çok ülkede sürvelans için iş ve zaman israfını azalttığından dolayı daha uygun bir metot olarak benimsenmiştir (Choi ve ark 2003, Balamurugan ve ark 2007).

MAb kullanılan ELISA tesleri antijenik, serolojik teşhis ve sürü taraması için sık kullanılmaktadır. PPR antikoru saptamada kullanılan C-ELISA güvenli, spesifik ve hassas bir testtir. C-ELISA yüksek teşhis spesifitesine (%99,8) ve sensitivitesine (% 90,5) sahiptir (Balamurugan ve ark 2007, Abubakar ve ark 2011b).

14 gün ara ile alınan serum örneklerinde serolojik teşhis yapılabilir (Albayrak 2007).

1.7.2.1. Virus Nötralizasyon Testi

Virus Nötralizasyon testi spesifik ve duyarlı ancak zaman alıcı bir testtir. Standart nötralizasyon testi primer hücreler mevcut olmadığı zaman Vero hücreleri ya da primer kuzu böbrek hücrelerinin roller kültürlerinde gerçekleştirilebilmektedir (OIE 2012).

Virus miktarının belirlenmesi uygun kültür sistemlerinde spesifik sitopatolojik efektlerin yokluğu veya varlığı ile konvensiyonel olarak gerçekleştirilir. Virusa spesifik nötralizan antikorlar, virusun neden olduğu sitopatolojik efektleri nötralize etmektedir. Sitopatolojik efektleri indükleyen virusun varlığını belirlemek için hücre kültürlerinin görüntülenmesi eğitimli bir göz ve kalifiye bir personel gerektirir. Virus titrasyon testlerinde virusun çoğalması yada serum nötralizasyon testlerinde virusun yokluğu virusa spesifik sitopatolojik efektlerin görsel incelenmesi ile ölçülebilir (Raj ve ark 2000).

1.7.2.2. Kompetitif ELISA yöntemi

C-ELISA, antinükleoprotein MAb'nin kullanımına dayanmaktadır (Libeau ve ark 1995). Monoklonal anti-hemaglutinin kullanımına dayalı iki C-ELISA tekniği de tarif edilmiştir (OIE 2012). Yüksek antijenik N proteini kullanılarak hazırlanan C-ELISA testi ile serumda N proteinine karşı oluşan antikor varlığı ortaya konularak PPR hastalığı teşhis edilmektedir ve onlarca yıldır kullanılmaktadır (Kwiatek ve ark 2010).

1.8.Bağışıklık

Bağışıklıktan sorumlu olan nötralizan antikorlar ya aktif bağışıklık yada aşılamalara bağlı olarak şekillenmektedir. Enfeksiyonu atlatan hayvanlar 3-4 yıl bağışık kalmaktadır. Bu süre besi için bakılan küçükbaş hayvanlar düşünüldüğünde ömür boyu (Taylor 1984) bağışıklık anlamına gelmektedir. Aktif bağışık anneden kolostrumla geçen maternal antikorlar PPRV enfeksiyonuna karşı 3-6 ay arasında koruma sağlar (Tatar ve Kabaklı 2006).

1.9. Koruma ve Kontrol

PPRV'nin kontrolü için hızlı, spesifik, duyarlı teşhis metotları ve etkili aşılar gerekmektedir. PPRV'nin etkili bir şekilde kontrolüne, enfekte bölgelerden gelen koyun ve keçi ithalatının kısıtlanması, potansiyel enfekte malzemelerin çıkarılması,

enfekte hayvanlara karantina ve enfekte alanlardaki koyun ve keçilerin kontrolü gibi kontrol hareketlerini içeren yöntemler kullanılarak ulaşılabilmektedir (Abubakar ve ark 2011a). Enfeksiyonla mücadelede aşı uygulamaları tavsiye edilmektedir. Bu yüzden Plowright ve Ferris tarafından geliştirilen attenüe doku kültürü RP aşısı ve immun serumu PPRV'nin RP ile olan antijenik yakınlığından dolayı uzun yıllar kullanılmıştır. Kullanılan RP aşısı ile yeterli immun yanıtın alındığı bildirilmiştir. Yapılan araştırmalarda rekombinant RP aşılarıyla farklı sonuçların alındığı belirtilmiştir. OIE tarafından Vero hücre kültüründe seri pasajlarla zayıflatılmış Nijerya 75/1 suşu orijinal aşı suşu olarak önerilmektedir. Ayrıca PPRV'ye karşı aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir (Tatar ve Kabaklı 2006). Enfekte hayvanlar ile aşılı hayvanları ayırmak için geliştirlen DIVA (differentiating infected from vaccinated animals) aşıları ile enfekte hayvanlar belirlenerek sürülerden uzaklaştırılabilmekte ve böylece sahada kontrol ve aşılama stratejileri belirlenebilmektedir. Türkiyede Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı PPRV enfeksiyonuna karşı Avrupa birliğinin proje desteği verdiği 2010-2012 yıllarında ücretsiz aşı kampanyası düzenlemiştir (Gümüşova ve Memiş 2014). Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na bağlı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün 2016/02 sayılı Hayvan Hastalıkları ile Mücadele ve Hayvan Hareketleri Kontrolü konulu genelgesine göre küçük ruminantların sevkleri sırasında hayatları boyunca en az 1 kez aşılı olmaları eğer aşılı değilse aşı tatbikinden 15 gün sonrasında hayvanın sevkine izin verilmesi aksi bir durumda ise hayvanların sevk işlemlerinin gerçekleşmemesi, 3 aylıktan küçük hayvanlara aşı yapılmaması, doğrudan kesime sevk edilen hayvanlarda da aşı şartının aranmaması gerektiği belirtilmektedir (Anonim 2016).

Pakistan'da PPR kontrolünde etkili yol olarak ekonomik olmayan sıkı hijyen kontrol önlemleri, damgalama politikasıyla beraber küçük ruminantların kitlesel aşı uygulamaları kullanılmaktadır. Bu nedenle PPR'ın kontrolünde etkili aşı uygulamaları gerekmektedir ve bu amaç için homolog ve rekombinant gibi çeşitli aşılar geliştirilmiştir (Abubakar ve ark 2011a). 2007 yılının temmuz ayında Çinde güneybatı Tibet'in Ngari bölgesinde meydana gelen salgında PPRV ile enfekte ve 5 km yarıçap içindeki tüm sürülerdeki hayvanların itlaf edilmesi, koyun ve keçi hareketlerine kısıtlamalar, ölü hayvanların imha edilmesi, kontamine alanların dezenfeksiyon işlemleri ve hasta hayvan raporlama sistemlerini geliştirme, aşı

uygulama ve kayıt altına alma gibi sıkı kontrol tedbirleri ile ortadan kaldırıldığı bildirilmiştir (Wang ve ark 2015).

Bu çalışmada, dünyanın bir çok yerinde koyun ve keçi populasyonlarında yaygın şekilde görülen ve çeşitli doku ve organlarda enfeksiyon meydana getirerek çok büyük ekonomik kayıplara neden olan, FAO ve OIE tarafından dünya üzerinden eradike edilmesi planlanan PPRV enfeksiyonlarının son yıllarda ülkemizdeki durumunu ortaya koymak amacıyla; C- ELISA ile aşılanmamış hayvanlardaki seroprevalansını ortaya koyarak virusun bölgesel de olsa sahadaki seroepidemiyolojik seyrini, N gen bölgesini hedef alan real time RT-PCR ve virus izolasyon metotları ile de örnekleme yapılan illerde klinik olarak PPR'dan şüpheli hayvanlarda etiyolojik ajan olarak PPRV'nin dağılımının ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Örneklenen hayvanlar

Klinik semptom veya nekropsi bulgularına göre PPR'den şüphelenilen 14 adet koyun, 30 adet keçi, 17 adet kuzu, 3 adet oğlak olmak üzere 64 hayvandan toplam 134 örnek (lökosit, svap ve organ materyali) kullanıldı (Çizelge 2.1). Araştırmada serolojik çalışma için PPR enfeksiyonuna karşı herhangi bir aşılama yapılmamış Mersin (184 adet) ve Şanlıurfa (84 adet) illerinde yer alan çeşitli işletmelerden 159 adedi koyun, 109 adeti keçiye ait olmak üzere toplamda 268 kan serumu örneği alındı (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.1 Virolojik çalışmada kullanılan örneklerin dağılımı.

Numune Adı	**Keçi/Oğlak**	**Koyun/Kuzu**	**Örnek Sayısı**
Lenf Yumrusu	9/1	8/1	19
Dalak	11/2	9/3	25
Akciğer	13/3	11/14	41
Lökosit	21/1	9/5	36
Dudak	1/1	1/2	5
Svap	3/0	2/0	5
Dil	0/1	0/2	3
TOPLAM	**58/9**	**40/27**	**134**

Çizelge 2.2. Serolojik çalışmada kullanılan serum örneklerinin dağılımı.

İl	**İlçe**	**Köy**	**Koyun**	**Keçi**	**Toplam**
Mersin	Erdemli	Elvanlı	-	17	17
Mersin	Erdemli	Dağlı	5	-	5
Mersin	Erdemli	Çerçili	14	-	14
Mersin	Erdemli	Çiriş	3	14	17
Mersin	Mut	Çamlıca	-	24	24
Mersin	Mut	Hamam	11	10	21

Çizelge 2.2 (Devam) Serolojik çalışmada kullanılan serum örneklerinin dağılımı.

Mersin	Mut	Fakırca	18	-	18
Mersin	Silifke	İmamlı	6	10	16
Mersin	Silifke	Kavak	2	17	19
Mersin	Silifke	Sabak	-	6	6
Mersin	Tarsus	Taşçılı	13	-	13
Mersin	Tarsus	Topaklı	11	3	14
Şanlıurfa	Siverek	Kamışlı	21	-	21
Şanlıurfa	Siverek	Ediz	17	4	21
Şanlıurfa	Siverek	Çevirme	21	-	21
Şanlıurfa	Siverek	Tanrıverdi	17	4	21
TOPLAM			**159**	**109**	**268**

2.1.2. ELISA Kitleri

PPRV'ye spesifik antikorları tespit etmek için C-ELISA (ID.vet, ID Screen PPR Competition, PPRC-4P, katalog no: 1211, Fransa) kiti kullanıldı.

2.1.3. Real time RT-PCR Kitleri

Çalışmada ticari olarak elde edilmiş olan real time RT-PCR ekstraksiyon kiti (Roche MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I, Ref: 03730964001, Almanya), one step real time RT-PCR RNA amplifikasyon (Roche, Light Cycler RNA Amplification Kit, Ref:12015145001, Almanya) kiti kullanıldı.

2.1.4. Fötal Dana Serumu

Hücre kültürü çalışmasında kullanılmak üzere fötal dana serumu (FDS, Biological Industries, katolog no:1520003, İsrail) ticari olarak temin edildi. Laboratuara gelen steril FDS'ler kullanılıncaya kadar -20°C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi.

2.1.5. Virus

Real time RT-PCR ve virus izolasyonu için kontrol virusu olarak Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilen PEST-S ETVAC canlı attenüe liyofilize PPR 75/1 aşı suşu kullanıldı.

2.1.6. Hücre Kültürü

Virus izolasyon çalışmaları için Vero hücre kültürleri kullanılmış olup, araştırmanın bu bölümünde Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı laboratuarlarının olanaklarından yararlanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1.Serolojik Yöntemler

2.2.2.1.Kan serum örneklerinin hazırlanması

Örnekleme yapılan hayvanlarda vena jugularis'in bulunduğu bölge alkollü pamuk ile silindikten sonra holder yardımı ile steril kaolinli kan tüplerine (Ayset, Adana/Türkiye) alınan 5 ml kadar kan örnekleri soğuk zincir altında laboratuara getirildikten sonra 1500 rpm'de (Revolutions per minute) 15 dk. santrifüj (Eppendorf, Almanya) işlemine tabi tutuldu. Santrifüj işlemi sonucunda elde edilmiş olan serum, otomatik pipet (Eppendorf, Almanya) yardımı ile 1,5 ml'lik steril eppendorf tüplerine aktarıldı. Serum örnekleri antikor varlığı yönünden c-ELISA yönteminde kullanılıncaya kadar -20°C'lik derin dondurucuda saklandı. Çevreye herhangi bir zarar vermemek için tüpün içerisinde kalan kanın diğer kısmı, tüplerle birlikte tıbbi atık poşetlerine konarak uzaklaştırıldı.

2.2.1.2. ELISA

Kan serum örneklerinin hazırlanması başlığı altında bahsedildiği şekilde hazırlanılan kan serumlarında PPRV'ye spesifik antikorların varlığı yönünden ticari olarak temin edilen C-ELISA (ID.vet, ID Screen PPR Competition, PPRC-4P,

Katolog no: 1211, Fransa) ile Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'nde incelendi.

ELISA Kit İçeriği

- PPR rekombinant nükleoprotein (NP) ile kaplı mikropleytler
- Anti-NP-peroksidaz (HRP) konsantre konjugat
- Pozitif kontrol
- Negatif kontrol
- Dilüsyon tamponu 13
- Dilüsyon tamponu 4
- Yıkama solüsyonu
- Substrat solüsyonu (Revelation solusyonu)
- Stop solüsyonu (H_2SO_4 0,5 M)

Testin yapılışı

- Kullanıma hazır halde ambalajlanmış olan mikropleyt, kontroller, konjugat, dilüsyon tamponu, substrat ve stop solusyonu oda ısısında bekletildikten sonra vortekslenerek kullanıldı.
- Bütün kuyucuklara dilüsyon tampon 13'ten 40 µl konuldu.
- Çizelge 2.3. de belirtildiği gibi A1 ve B1 kuyucuklarına 10'ar µl pozitif kontrol konuldu.
- Çizelge 2.3. de belirtildiği gibi C1 ve D1 kuyucuklarına 10'ar µl negatif kontrol konuldu.
- Çizelge 2.3. de belirtildiği gibi geri kalan bütün kuyucuklara 10'ar µl sırasıyla serum örnekleri konularak 37°C' de 45 dk. etüvde (Nüve, EN 400, Türkiye) inkübasyona bırakıldı.
- Mikropleyti her göze 300 µl yıkama solüsyonu [stok solüsyondan 1/20 oranında distile su cihazından (Nüve NS 108, Türkiye) alınan distile su ile sulandırılarak hazırlandı] konularak 5 kez yıkandı ve kurutuldu.
- Konjugat 10X Dilüsyon tampon 4 ile 1/10 oranında sulandırılarak konjugat 1X hazırlandı ve bütün kuyucuklara konjugat 1X'ten 100 µl konuldu.
- 21°C (±5°C)'de 30 dk. ±3 inkübasyona bırakıldı.

- Süre sonunda yıkama işlemi 5 kez olmak üzerey yıkama ve kurulama işlemi tekrarlandı.
- Bütün kuyucuklara 100 µl substrat ilave edilerek 21°C'de 15 dk karanlık ortamda inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra gözler boşaltılmadan reaksiyonu durdurmak için 100 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen ELISA okuyucuya konuldu.

Çizelge 2.3. PPRV C-ELISA pleyt dizaynı

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Pozitif											
B	Pozitif											
C	Negatif											
D	Negatif											
E	Örnek 1											
F	Örnek 2											
G	…											
H	…											Örnek92

Testin değerlendirilmesi

ELISA okuyucuya yerleştirilen mikropleyt Optik Dansite (O.D.) değeri 450 nm dalga boyunda (Biochrom EZread400, İngiltere) okutuldu.

Testin geçerliliği

PC: Pozitif kontrol ortalaması

NC: Negatif kontrol ortalaması

S: Örnek serum değeri

Testin geçerli olabilmesi için Negatif Kontrol O.D. değeri (OD_{NC}) 0.7.'den büyük

$$OD_{NC} > 0.700$$

Ayrıca Pozitif Kontrol (OD_{PC})'ün, OD_{NC}'ye oranı %30'dan az

$$OD_{PC} / OD_{NC} < 0.3$$

olduğu kabul edildi.

Sonuçların değerlendirilmesi

Bütün serum örneklerinin her biri için (S/NC %) hesaplandı.

$$S/NC\ \% = (OD_{örnek} / OD_{NC}) \times 100$$

Örneklerin S/NC % değeri %35'den küçük ve eşit ise POZİTİF (PPRV'ye karşı antikor taşıdığına),

Örneklerin S/NC % değeri %35'den büyük, %45'den küçük ve eşit ise ŞÜPHELİ,

Örneklerin S/NC % değeri %45'den büyük ise NEGATİF (PPRV'ye karşı antikor taşımadığına) karar verildi.

- SNC% ≤ 35% (+) POZİTİF
- 35% < SNC% ≤ 45 (?) ŞÜPHELİ
- SNC% > 45 % (-) NEGATİF

2.2.2. Virolojik Yöntemler

2.2.2.1. Lökosit örneklerinin hazırlanması:

Steril antikoagulanlı tüplere (K_3EDTA, %7,5, Ref: 70697, Ayset, Adana/Türkiye) ateşli dönemde alınan kan örnekleri soğuk zincir altında laboratuara getirildikten sonra 2500 rpm'de +4°C'de 20 dk. santrifüj (Thermoscientific, SL16R, Almanya) işlemine tabi tutuldu. Plazma otomatik pipet (Eppendorf, Almanya) yardımı ile uzaklaştırılırken lökosit tabakası içerisinde antibiyotikli (25.000 U/ml penisilin ve 20 mg/ml streptomisin) PBS (Phosphate Buffer Saline) bulunan tüplere alındı. PBS ile 3 kez yıkanan lökosit örnekleri 1,5 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biological Industries, İsrail) vasatı + %10 Dimethylsulphoxide (DMSO) ilave edilerek sulandırıldı. Lökositler kullanılıncaya kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı. Çevreye herhangi bir zarar vermemek için plazma ve tüpün içerisinde kalan kanın diğer kısmı, tüplerle birlikte tıbbi atık poşetlerine konarak uzaklaştırıldı.

2.2.2.2. Svap örneklerinin hazırlanması:

İçerisinde antibiyotikli PBS bulunan tüplere alınan svap örnekleri soğuk zincir altında laboratuara getirildikten sonra pamukta bulunan marazi maddenin PBS'e geçmesi amacı ile steril pens kullanılarak sıkıldı. Elde edilen sıvı 2500 rpm'de +4°C'de 20 dk. santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj işleminin sonunda tüpün üst kısmındaki sıvıdan 2 ml alınarak içerisine konsantre antibiyotik (Biological

Industries, İsrail) ilave edildi. İlave edilen antibiyotiğin etkisini göstermesini sağlamak için +4°C'de 1 saat bekletildi. Hazırlanan svap örnekleri testlerde kullanılıncaya kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı. Çevreye herhangi bir zarar vermemek için PBS'li tüpün içerisinde kalan diğer kısmı, tüplerle birlikte tıbbi atık poşetlerine konarak uzaklaştırıldı.

2.2.2.3. Organ örneklerinin hazırlanması:

Virus izolasyonu için şüpheli hayvanlardan (Şekil 2.1.) steril gerçekleştirilen otopsiden alınan akciğer, dalak, lenf yumrusu (Şekil 2.2.), dil ve dudak örnekleri PBS ile sulandırılarak (1/10) doku parçalayıcı MagNA Lyser (Roche, Almanya)'da 6000 devirde 60 saniye homojenize edildi. Elde edilen homojenizatlar 2500 rpm'de +4°C'de 20 dk. santrifüj işlemine tabii tutuldu ve üstteki sıvı bir steril tüpe alınarak üzerine konsantre antibiyotik ilave edildi. Antibiyotik ilave edildikten sonra sterilite kontrolleri yapmak için kanlı agara ekim yapıldı ve testte kullanılmak üzere -80°C'lik derin dondurucuda saklandı. Çevreye herhangi bir zarar vermemek için tüpün içerisinde kalan diğer kısımlar ise tıbbi atık poşetleri yardımı ile uzaklaştırıldı.

Şekil 2.1. Araştırmada otopsi yapılan PPRV şüpheli bir keçi





Şekil 2.2. Otopside elde edilen mezenteriyel lenf yumrusu

2.2.2.4. Real Time RT-PCR

Viral teşhis amacıyla alınan örnekler PPRV yönünden N proteinini kodlayan gen bölgesi hedef alınarak real time RT-PCR ile Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'nde test edildi.

2.2.2.4.1. RNA Ekstraksiyonu

Hazırlanan lökosit, svap ve doku örneklerinden 200 µl alınarak izolasyon işlemine başlandı. Hazırlanan örnekler ile pozitif kontroller birlikte ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu.

Toplanan örnekler temin edilen hazır ticari kit yardımı ile RNA ekstraksiyonuna tabi tutuldu. Bu amaçla üretici firmanın uygulama yönergesi takip edildi. İşlem bittikten sonra elution tüplerindeki örnekler kaydedilerek hemen kullanılmayacaksa -80 ºC'de saklandı.

2.2.2.4.2. One step real time RT-PCR RNA Amplifikasyonu:

Temin edilen hazır ticari kitler yardımı ile ekstraksiyonları gerçekleştirilen örnekler yine ticari real time RT-PCR (Roche, Light Cycler RNA Amplification Kit,

Ref: 12015145001, Almanya) kiti kullanılarak PCR aşaması test prosedürüne uygun olarak yapıldı. Kit kullanılıncaya kadar -20 ºC'de saklandı.

Real time RT-PCR'da kullanılan primerler Bao ve ark (2008) tarafından bildirilen;

Forward primer (5'- CAC AGC AGA GGA AGC CCA ACT-3')

Reverse primer (5'- TGT TTT GTG CTG GAG GAA GGA-3')

Taqman prob ise; (FAM-5'-CTC GGA AAT CGC CTC GCA GGC T- 3'-TAMRA) kullanıldı.

Yukarıda belirtilen kit, primerler ve prob kullanılarak Çizelge 2.4.'de yer alan PCR karışımı (master mix) hazırlandı. Master mix hazırlanırken tüm reagentler çözüldü ve iyice vorteksle (Biosan, Letonya) karıştırıldı. Master mix hazırlanırken tüm reagentlar ve ekstraksiyon ürünleri soğuk blok (Roche, Almanya) üzerinde tutuldu. Listedeki tüm komponentler eklendikten sonra vortexle karıştırıldı. Master Mix, pipetasyonda oluşabilecek kayıplar düşünülerek en az bir reaksiyonluk fazla hazırlandı. Her kapiller tüpe 19 µl. master mix, 1 µl. örnek RNA eklendi ve totalde hacim 20 µl.'ye ayarlandı. Nükleik asitlerin amplifikasyonları real time PCR cihazı (Roche LightCycler 2.0, Almanya) kullanılarak reverse transcription (55 ºC'de 10 dk.), ön inkübasyon (hot star Taq DNA polimeraz aktivasyonu için, 95 ºC'de 30 sn.) her bir siklusu denatürasyon (95ºC'de 5 sn), anneling (60ºC'de 15 sn.) ve uzama (95ºC de 1 sn)'dan oluşan 40 siklusluk bir amplifikasyon programı uygulandı ve negatif kontrol olarak RNase free su kullanıldı.

Çizelge: 2.4. Master mix karışımı

Master Mix	**Hacim** (µl.)
LightCycler RT PCR Reaction mix HybProbe	4,0
$MgCI_2$	2,4
LightCycler RT PCR Enzyme mix	0,4
Primer F (10 µM)	1,0
Primer R (10 µM)	1,0
TaqMan probe (4 µM)	1,0
H_2O (RNase free su)	9,2
TOTAL	**19,0**

2.2.2.5 Hücre kültüründe Virus İzolasyonu

Virus izolasyon çalışmaları için Vero hücre kültürleri (Şekil 2.3.) kullanılmış olup araştırmanın bu bölümünde Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı laboratuarı olanaklarından yararlanıldı. Vero hücre kültürleri 250 ml'lik flasklarda (Corning, ABD) DMEM vasatı ve %10 FDS kullanılarak CO_2'li etüvde 37°C'de inkubasyona bırakılarak çoğaltıldı. Her gün doku kültürü mikroskobu (Olympus, Tokyo) ile hücreler kontrol edildi. Flaskın en az % 80'ini kaplayınca tripsin (Biological Industries, İsrail) ile kaldırıldı. DMEM ile 300.000 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. Hücreler 24 gözlü mikropleyte geçildi.



Şekil 2.3 Virus izolasyonu için kullanılan Vero hücre kültürü (Doku kültürü mikroskobu X40)

24 gözlü mikropleytlerde çoğaltılan hücrelerin vasatları dökülerek PBS ile yıkandı. Adsorbsiyon tekniği ile uygun şekilde hazırlanan lökosit, svap ve organ

örnekleri 0,2 ml inokule edildi. Adsorbsiyon için CO_2'li etüvde 37°C'de 1 saat kadar bekletildi. Adsorbsiyon sonunda 2,5 ml serumsuz DMEM, virus üretme vasatı olarak eklendi ve tekrar 37°C'de CO_2'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Doku kültürü mikroskobu (Olympus, Tokyo) ile 5 gün hücreler kontrol edildi. CPE görülmesiyle flasklar -80°C dondurulup 37°C'de su banyosunda (Hettich, Almanya) çözdürülerek +4°C'de 3000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı bir sonraki pasajda kullanıldı. Her bir örneğin hücre kültüründe üç kör pasajı gerçekleştirildi.

2.2.3. İstatistiki analiz

Çalışmanın sonuçları ki kare (X^2) testi kullanılarak değerlendirildi (Minitab 14.1 version). $P<0,05$ değeri istatistiki açıdan önemli kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Klinik ve Nekropsi Bulguları

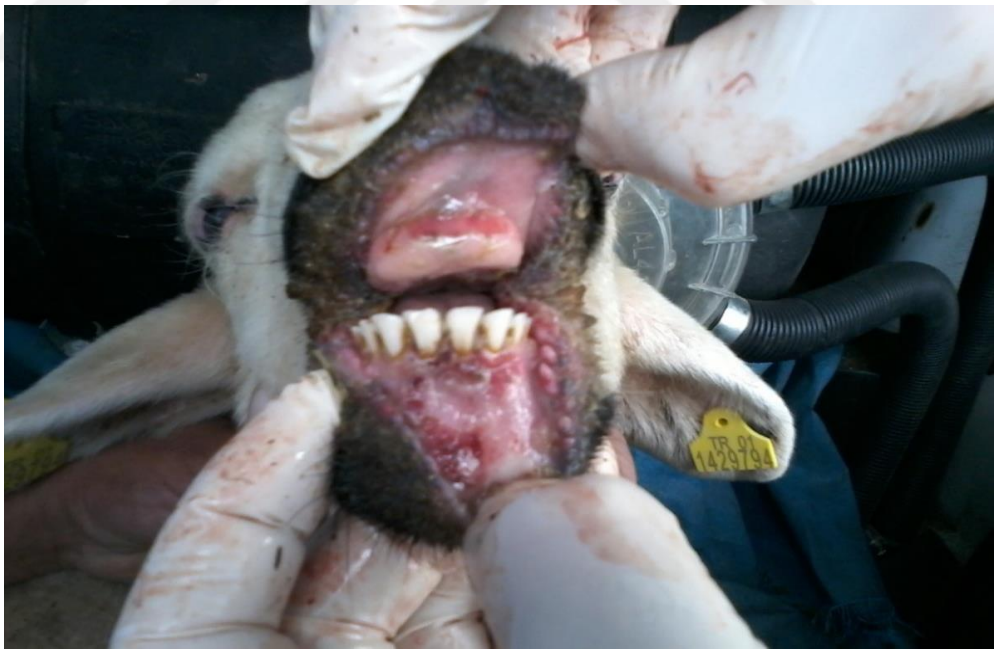
Sahada 19 lökosit ve 2 svap materyali alınan hayvanlarda yüksek ateş, durgunluk, iştahsızlık, ishal, öksürük, göz yaşı, burun akıntısı gibi solunum ve sindirim sistemi problemleri gözlendi. Ayrıca bu bulgularla beraber ek olarak otopsi yapılan 43 hayvanlardan 41 adetinde akciğerde konjesyon ve pneumoni gözlendi. 19 adet hayvanda bağırsaklarda konjesyon gözlendi. 5 adet hayvanın dil, dudak ve damağında lezyonlar gözlendi. Sahada elde edilen bulgular Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8 ile gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Koyunda alt dudak, damak ve dilde lezyonlar



Şekil 3.2. Koyunun alt dudağında erozyon



Şekil 3.3. Koyunda dudak içi lezyonlar



Şekil 3.4. Koyunda sert damakta lezyonlar



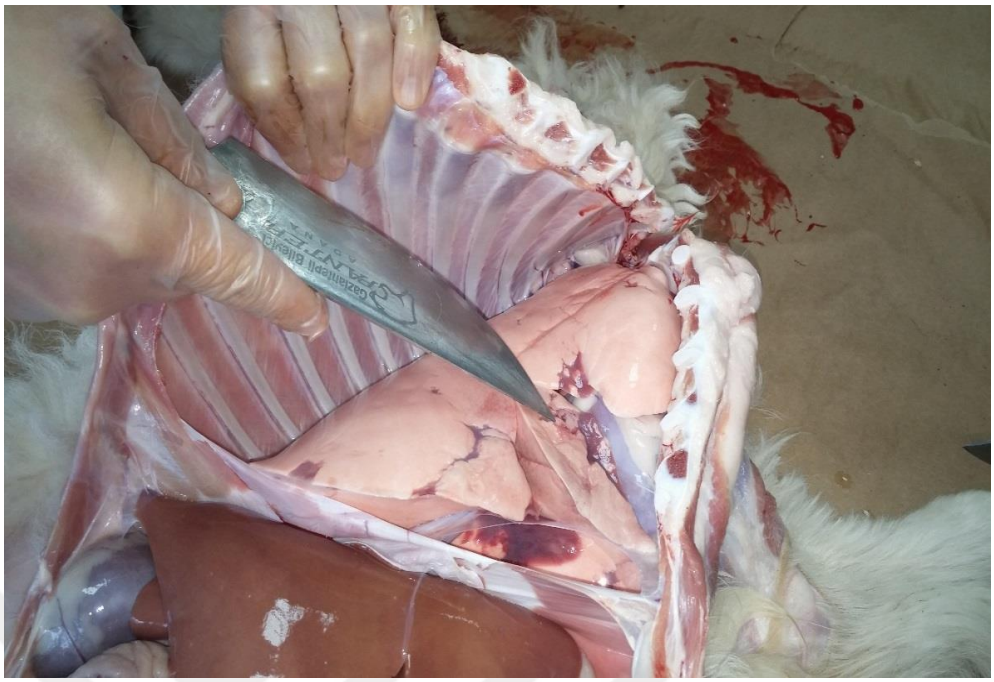
Şekil 3.5. Kuzuda burunda hiperemi, dudakta erozyon



Şekil 3.6. Kuzuda sert damakta erozyon



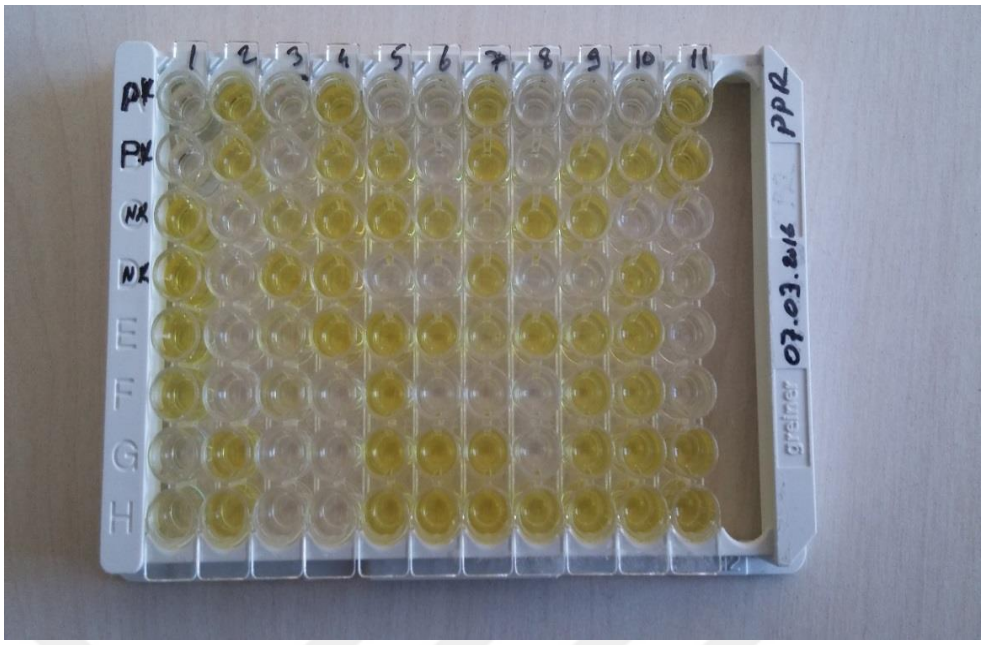
Şekil 3.7. Kuzuda dilde erozyon



Şekil 3.8. Kuzunun akciğerinde hepatizasyon

3.2. Serolojik Bulgular

Çizelge 2.2. de belirtilen illere bağlı köylerdeki işletmelerde, klinik muayenede sağlıklı görünen ve aşı yapılmadığı belirtilen toplamda 268 adet kan serum örneğinin PPR c-ELISA ile kontrolü sonucunda, Şanlıurfa ili odaklarında %41,66 (35/84) (Şekil 3.9), Mersin ili odaklarında %40,76 (75/184) oranında PPR spesifik antikor saptanırken, hayvan türü göz önüne alındığında koyun serum örneklerinde %50,31 (80/159) (Çizelge 3.1), keçi serum örneklerinde %27,52 (30/109) oranında antikor saptandı (Çizelge 3.2). Toplamda 268 serum örneğinde %41,04 (110/268) oranında PPR antikoru saptandı. Materyal sağlanan 16 odağın 2'sinde seropozitiflik saptanamadı. Antikor belirlenen çiftliklerde/ köylerde seropozitiflik oranlarının % 12,5-100 değiştiği belirlendi (Çizelge 3.3).



Şekil 3.9. C-ELISA sonuçlarının pleytteki görünümü

PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol

Results

Date and Time:	07 Mart 2016 - 15:19:42
Result Validity:	Valid
Data Validity:	Valid
Operator	DELL-PC\Dell

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,077	0,804	0,064	0,871	0,048	0,072	0,653	0,050	0,076	0,061	0,808	0,000
B	0,077	0,729	0,047	0,660	0,676	0,051	0,807	0,104	0,682	0,760	0,909	0,000
C	1,028	0,055	0,421	0,790	0,826	0,538	0,203	0,832	0,688	0,052	0,059	0,000
D	1,034	0,064	0,845	0,732	0,057	0,060	0,627	0,094	0,105	0,754	0,181	0,000
E	0,762	0,058	0,237	0,836	0,888	0,768	0,326	0,772	0,629	0,817	0,092	0,000
F	0,689	0,051	0,241	0,067	0,860	0,069	0,123	0,051	0,701	0,700	0,153	0,006
G	0,087	0,764	0,056	0,057	0,843	0,871	0,817	0,055	0,719	0,830	0,805	0,000
H	0,240	0,672	0,052	0,052	0,744	0,850	0,852	0,664	0,767	0,780	0,733	0,000

Çizelge 3.1. Koyun kan serumu sonuçları

İl	İlçe	Köy	Pozitif serum	Negatif serum	Toplam serum	Seropozitiflik (%)
Mersin	Erdemli	Dağlı	3	2	5	60
Mersin	Erdemli	Çerçili	9	5	14	64,28
Mersin	Erdemli	Çiriş	0	3	3	0,0
Mersin	Mut	Hamam	5	6	11	45,45
Mersin	Mut	Fakırca	9	9	18	50
Mersin	Silifke	İmamlı	0	6	6	0,0
Mersin	Silifke	Kavak	0	2	2	0,0
Mersin	Tarsus	Taşçılı	13	0	13	100
Mersin	Tarsus	Topaklı	7	4	11	63,63
Şanlıurfa	Siverek	Kamışlı	10	11	21	47,61
Şanlıurfa	Siverek	Ediz	9	8	17	52,94
Şanlıurfa	Siverek	Çevirme	9	12	21	42,85
Şanlıurfa	Siverek	Tanrıverdi	6	11	17	35,29
TOPLAM			**80**	**79**	**159**	**50,31**

Çizelge 3.2. Keçi kan serumu sonuçları

İl	İlçe	Köy	Pozitif serum	Negatif serum	Toplam serum	Seropozitiflik (%)
Mersin	Erdemli	Elvanlı	0	17	17	0,0
Mersin	Erdemli	Çiriş	6	8	14	42,85
Mersin	Mut	Çamlıca	9	15	24	37,5
Mersin	Mut	Hamam	3	7	10	30
Mersin	Silifke	İmamlı	2	8	10	20
Mersin	Silifke	Kavak	0	17	17	0,0
Mersin	Silifke	Sabak	6	0	6	100
Mersin	Tarsus	Topaklı	3	0	3	100
Şanlıurfa	Siverek	Ediz	0	4	4	0,0
Şanlıurfa	Siverek	Tanrıverdi	1	3	4	25
TOPLAM			**30**	**79**	**109**	**27,52**

Çizelge 3.3. Örnekleme yerlerine göre seroprevalans

Köy	**Toplam**	**Pozitif**	**Negatif**	**Seropozitiflik (%)**
Elvanlı	17	-	17	0,0
Dağlı	5	3	2	60
Çerçili	14	9	4	64,28
Çiriş	17	6	11	35,29
Çamlıca	24	9	15	37,5
Hamam	21	8	13	38,09
Fakırca	18	9	9	50
İmamlı	16	2	14	12,5
Kavak	19	-	19	0,0
Sabak	6	6	-	100
Taşçılı	13	13	-	100
Topaklı	14	10	4	71,42
Kamışlı	21	10	11	47,61
Ediz	21	9	12	42,85
Çevirme	21	9	12	42,85
Tanrıverdi	21	7	14	33,33
TOPLAM	**268**	**110**	**158**	**41,04**

3.3. Virolojik Bulgular

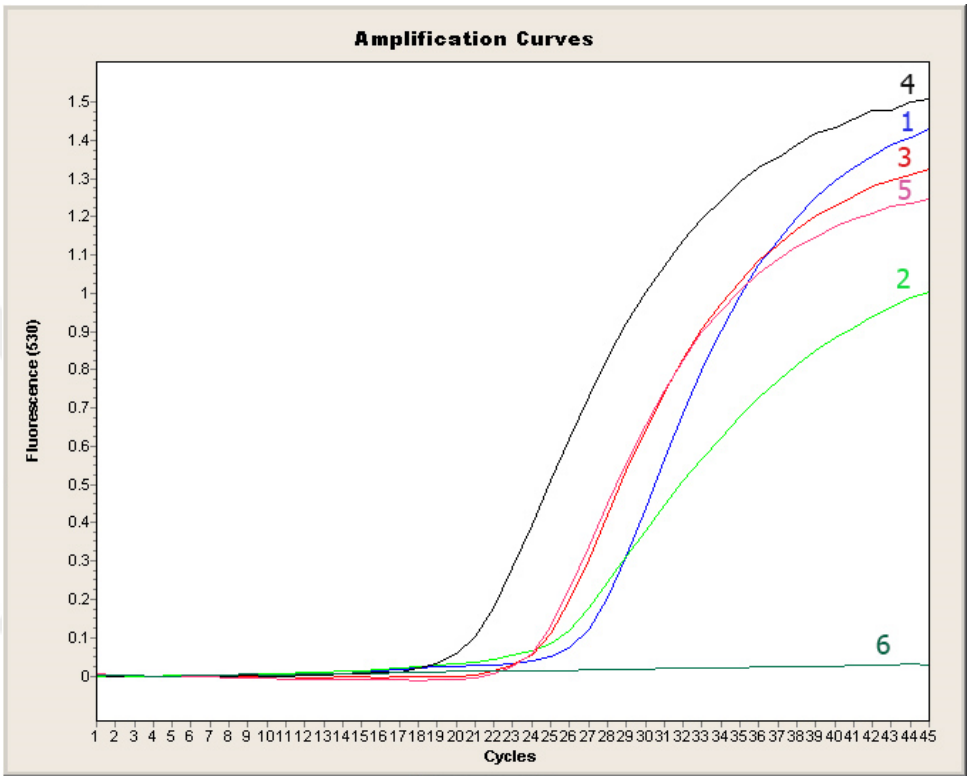
3.3.1. Real time RT-PCR

Real time RT-PCR ile incelenen PPRV şüpheli toplam 64 hayvandan (keçi, oğlak, koyun ve kuzu) elde edilen 134 izolasyon materyalinin (lenf yumrusu, dalak, akciğer, lökosit, dudak svap ve dil) 44'ünde PPR'ye özgü viral nükleik asit pozitif olarak tespit edildi (Şekil 3.10).

Test edilen lenf yumrusu örneklerinde %26,31 (5/19), dalak örneklerinde %28 (7/25), akciğer örneklerinde %43,90 (18/41), lökosit örneklerinde %30,55 (11/36), dudak örneklerinde %60 (3/5) oranında viral nükleik asit yönünden pozitif sonuç saptanırken svap ve dil örnekleri negatif olarak belirlendi (Çizelge 3.4).

Test sonuçları izolasyon materyali ve hayvan türü bazında değerlendirildiğinde, örneklenen izolasyon materyallerinin %32,83 (44/134)'ünde, örneklenen hayvanların ise %45,31 (29/64)'inde pozitif sonuç elde dildi (Çizelge 3.5). Örneklenen koyunların %35,71 (5/14)'sinde, keçilerin %43,33 (13/30)'ünde,

kuzuların %52,94 (9/17)'ünde pozitif sonuç saptanırken, örneklenen oğlakların %66,66 (2/3)'sında pozitif sonuç belirlendi (Çizelge 3.6). Ayrıca koyunların izolasyon materyallerinde %25 (10/40) (Çizelge 3.7), keçilerin izolasyon materyallerinde %32,75 (19/58) (Çizelge 3.8), kuzuların izolasyon materyallerinde %48,14 (13/27) (Çizelge 3.9) ve oğlakların izolasyon materyallerinde %22,22 (2/9) (Çizelge 3.10) oranlarında pozitif sonuç bulundu (Çizelge 3.11).



Şekil 3.10. Bazı örneklerde real-time RT-PCR sonuçları

1: Lenf Yumrusu örneği 2: Lökosit örneği 3: Dalak örneği 4: Akciğer örneği 5: Pozitif Kontrol 6: Negatif Kontrol

Çizelge 3.4. İzolasyon materyallerinin real time RT-PCR sonuçları

Genel	Örnek sayısı	Pozitif	Negatif	%
Lenf yumrusu	19	5	14	26,31
Dalak	25	7	18	28
Akciğer	41	18	23	43,90
Lökosit	36	11	25	30,55
Dudak	5	3	2	60
Svap	5	0	5	0,00
Dil	3	0	3	0,00
TOPLAM	**134**	**44**	**90**	**32,83**

Çizelge 3.5. Real-time RT-PCR sonuçlarının örnek ve hayvan türüne göre dağılımı

Hayvan No	Lökosit	Akciğer	Dalak	Lenf Yumrusu	Svap	Dudak	Dil	Hayvan Türü
1	N				N			Keçi
2	N							Keçi
3	N	N	N	N				Koyun
4	N							Keçi
5	P							Keçi
6	P							Keçi
7	P							Keçi
8	P							Keçi
9	P							Keçi
10	N							Kuzu
11	P							Koyun
12	P							Keçi
13	N							Keçi
14	P	P	P	P				Koyun
15	N	N	N	N				Koyun
16	N	P	P	P				Koyun
17	N							Kuzu
18	N	N	N	N				Keçi
19	N	N						Koyun
20	P							Keçi
21	N	P	P	P				Keçi
22	N							Koyun
23	N							Keçi
24	P							Keçi
25	P							Keçi
26	N							Keçi
27	N							Keçi
28	N							Keçi
29		N	N	N				Koyun
30		N	N	N				Keçi
31		P						Keçi
32		N	N	N				Keçi
33		P	P	P		P		Keçi
34		N	N	N				Koyun
35		N	N	N				Koyun
36		P	P	P		P	N	Kuzu
37		N	N	N				Keçi

Çizelge 3.5.(Devam) Real-time RT-PCR sonuçlarının örnek ve hayvan türüne göre dağılımı

38		N	N	N				Keçi
39		P						Kuzu
40		P						Kuzu
41	N	P	N	N	N	N		Koyun
42	N				N			Koyun
43	N	N		N	N			Keçi
44	N	N	N	N	N			Keçi
45		N	N					Koyun
46		N	N					Keçi
47		N	N					Keçi
48		N	N					Kuzu
49		N	N					Oğlak
50		N						Kuzu
51		P						Oğlak
52		P	P					Kuzu
53		P						Koyun
54		N						Kuzu
55		N						Kuzu
56		P						Kuzu
57		P						Kuzu
58		P	P					Keçi
59		P						Kuzu
60		P						Kuzu
61	N	N						Kuzu
62	N	N						Kuzu
63	N	P	N	N		N	N	Oğlak
64	N					P	N	Kuzu

N: negatif, P: pozitif

Çizelge 3.6. Hayvan türlerine göre real time RT-PCR sonuçları

Hayvan Turü	**Pozitif**	**Negatif**	**Toplam**	**%**
Koyun	5	9	14	35,71
Keçi	13	17	30	43,33
Kuzu	9	8	17	52,94
Oğlak	2	1	3	66,66
TOPLAM	**29**	**35**	**64**	**45,31**

Çizelge 3.7. Koyun izolasyon materyallerinin real time RT-PCR sonuçları

Koyun	**Pozitif**	**Negatif**	**Toplam**	**%**
Lökosit	2	7	9	22,22
Akciğer	4	7	11	36,36
Dalak	2	7	9	22,22
Lenf yumrusu	2	6	8	25
Svap	0	2	2	0,0
Dudak	0	1	1	0,0
DİL	0	0	0	0,0
TOPLAM	**10**	**30**	**40**	**25**

Çizelge 3.8. Keçi izolasyon materyallerinin real time RT-PCR sonuçları

Keçi	**Pozitif**	**Negatif**	**Toplam**	**%**
Lökosit	9	12	21	42,85
Akciğer	4	9	13	30,76
Dalak	3	8	11	27,27
Lenf yumrusu	2	7	9	22,22
Svap	0	3	3	0,0
Dudak	1	0	1	100
Dil	0	0	0	0
TOPLAM	**19**	**39**	**58**	**32,75**

Çizelge 3.9. Kuzu izolasyon materyallerinin real time RT-PCR sonuçları

Kuzu	**Pozitif**	**Negatif**	**Toplam**	**%**
Lökosit	0	5	5	0,0
Akciğer	8	6	14	57,14
Dalak	2	1	3	66,66
Lenf yumrusu	1	0	1	100
Svap	0	0	0	0,0
Dudak	2	0	2	100
Dil	0	2	2	0,0
TOPLAM	**13**	**14**	**27**	**48,14**

Çizelge 3.10. Oğlak izolasyon materyallerinin real time RT-PCR sonuçları

Oğlak	Pozitif	Negatif	Toplam	%
Lökosit	0	1	1	0,0
Akciğer	2	1	3	66,66
Dalak	0	2	2	0,0
Lenf yumrusu	0	1	1	0,0
Svap	0	0	0	0,0
Dudak	0	1	1	0,0
Dil	0	1	1	0,0
TOPLAM	**2**	**7**	**9**	**22,22**

Çizelge 3.11. Hayvan türlerinden elde edilen izolasyon materyallerinin real time RT-PCR sonuçları

Hayvan Türü	Örnek sayısı	Pozitif	Negatif	%
Keçi	58	19	39	32,75
Koyun	40	10	30	25
Kuzu	27	13	14	48,14
Oğlak	9	2	7	22,22
TOPLAM	**134**	**44**	**90**	**32,83**

3.3.2. Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu

Toplam 134 organ numunesinin hücre kültürlerine pasajlanması sonrasında 28 örnekte CPE gözlenirken (Şekil 3.11) real time RT-PCR sonuçlarına göre pozitif olarak belirlenmiş 16 örnekte CPE görülememiştir. İzolasyon çalışmalarında toplam 64 hayvandan (keçi, oğlak, koyun ve kuzu) elde edilen 134 izolasyon materyalinin (lenf yumrusu, dalak, akciğer, lökosit, dudak svap ve dil) 3 kez Vero hücre kültürlerine pasajlanması sonrasında sadece 21 nolu keçinin akciğer numunesinin 3. pasajın 3. gününde, diğer CPE meydana getiren örneklerin ise 3. pasajın 5. gününde CPE meydana getirdiği belirlenmiştir.

Hücre kültüründe pasajı gerçekleştirilen izolasyon materyallerinde %20,89 (28/134) oranında pozitiflik bulundu. Test edilen lenf yumrusu örneklerinde %10,52 (2/19), dalak örneklerinde %12 (3/25), akciğer örneklerinde %29,26 (12/41), lökosit

örneklerinde %27,77 (10/36), dudak örneklerinde %20 (1/5) oranında virus izole edilirken svap ve dil örneklerinde virus izole edilemedi (Çizelge 3.12).

Test sonuçları izolasyon materyali ve hayvan türü bazında değerlendirildiğinde; örneklenen hayvanların toplam %34,37 (22/64)'sinde virus izole edilirken, koyunların %28,57 (4/14)'sinde, keçilerin %30 (9/30)'unda, kuzuların %41,17 (7/17)'sinde, oğlakların ise %66,66 (2/3)'sında virus izole edildi (Çizelge 3.13). Ayrıca örneklenen toplam izolasyon materyallerinde %20,89 (28/134), koyunların izolasyon materyallerinde %22,5 (9/40), keçilerin izolasyon materyallerinde %15,51 (9/58), kuzuların izolasyon materyallerinde %29,63 (8/27) ve oğlakların izolasyon materyallerinde %22,22 (2/9) oranlarında virus izole edildi (Çizelge 3.14).



Şekil 3.11. Vero hücre kültüründe 3. pasajda PPRV pozitif akciğer materyalinin meydana getirdiği CPE (Doku kültürü mikroskobu X40)

Çizelge 3.12. İzolasyon materyallerine göre virus izolasyonu sonuçları

Genel	Örnek sayısı	Pozitif	Negatif	%
Lenf yumrusu	19	2	17	10,52
Dalak	25	3	22	12
Akciğer	41	12	29	29,26
Lökosit	36	10	26	27,77
Dudak	5	1	4	20
Svap	5	0	5	0,0
Dil	3	0	3	0,0
TOPLAM	**134**	**28**	**106**	**20,89**

Çizelge 3.13. Hayvan türlerine göre virus izolasyonu sonuçları

Hayvan Türü	Pozitif	Negatif	Toplam	%
Koyun	4	10	14	28,57
Keçi	9	21	30	30
Kuzu	7	10	17	41,17
Oğlak	2	1	3	66,66
TOPLAM	**22**	**42**	**64**	**34,37**

Çizelge 3.14. Hayvan türlerinden elde edilen izolasyon materyallerine göre virus izolasyonu sonuçları

Hayvan Türü	Örnek sayısı	Pozitif	Negatif	%
Keçi	58	9	49	15,51
Koyun	40	9	31	22,5
Kuzu	27	8	19	29,63
Oğlak	9	2	7	22,22
TOPLAM	**134**	**28**	**106**	**20,89**

3.4. İstatistiki Analiz

C-ELISA ile incelenen Şanlıurfa ve Mersin illerinden koyun ve keçilere ait serumlardan elde edilen sonuçlar Ki-kare testi (Minitab 14.1 version) ile incelendi. Analize göre PPRV'nin antikor varlığı yönünden koyun ve keçi serumlarında istatistiki açıdan fark tespit edilirken (Çizelge 3.15), Şanlıurfa ve Mersin illerinden elde edilen serumlarda istatistiki açıdan bir fark tespit edilmedi (Çizelge 3.16).

Çizelge3.15. Hayvan türlerine göre C-ELISA sonuçları.

	Pozitif	Negatif	Toplam	%
Koyun	80	79	159	50,31[a]
Keçi	30	79	109	27,52[b]

[a,b]: aynı sütundaki değerler arasında farklı harf taşıdıklarından istatistiki açıdan fark önemlidir (P<0.05).

Çizelge 3.16. İllere göre C-ELISA sonuçları.

	Pozitif	Negatif	Toplam	%
Mersin	75	109	184	40,76[a]
Şanlıurfa	35	49	84	41,66[a]

[a]: aynı sütundaki değerler arasında aynı harf taşıdıklarından istatistiki açıdan herhangi bir fark tespit edilmedi.

Hayvan türlerinde izolasyon materyallerinin real time RT-PCR ile elde edilen sonuçları Ki-kare testi ile incelendi. Ki-kare testine göre oğlak ile keçi arasında istatistiki açıdan fark elde edilemez iken koyun ile kuzu arasında istatistiki açıdan fark tespit edildi. Enfeksiyonun kuzularda görülme sıklığı daha yüksek olarak belirlendi (Çizelge 3.17).

Çizelge 3.17. Hayvan türlerinde izolasyon materyallerinin real time RT-PCR sonuçları

Hayvan Türü	Örnek sayısı	Pozitif	Negatif	%
Kuzu	27	13	14	48,14[a]
Keçi	58	19	39	32,75[ab]
Koyun	40	10	30	25,00[b]
Oğlak	9	2	7	22,22[ab]

[ab]:aynı sütundaki değerler arasında aynı harf taşıdıklarından istatistiki açıdan herhangi bir fark tespit edilmez iken (P>0,05), [a,b,ab]: aynı sütundaki değerler arasında farklı harf taşıdıklarından istatistiki açıdan fark önemlidir (P<0,05).

İzolasyon materyallerinin real time RT-PCR ile elde edilen sonuçları ki kare testi ile incelendi. İstatistiksel analize göre dudak materyallerinde diğer materyallere

göre istatistiki açıdan fark görülür iken diğer izolasyon materyallerinde istatistiki açıdan bir fark görülemedi (Çizelge 3.18).

Çizelge3.18. İzolasyon materyallerine göre real time RT-PCR sonuçları

Genel	Örnek sayısı	Pozitif	Negatif	%
Dudak	5	3	2	60[a]
Akciğer	41	18	23	43,90[b]
Lökosit	36	11	25	30,55[b]
Dalak	25	7	18	28[b]
Lenf yumrusu	19	5	14	26,31[b]
Svap	5	0	5	0,0[b]
Dil	3	0	3	0,0[b]

[a,b]: aynı sütundaki değerler arasında farklı harf taşıdıklarından istatistiki açıdan fark önemli iken (P<0,05). [b]: aynı sütundaki değerler arasında aynı harf taşıdıklarından istatistiki açıdan herhangi bir fark tespit edilmedi(P>0,05).

Hayvan türlerine göre real time RT-PCR ile elde edilen sonuçlar ki kare testi ile incelendi. Ki kare testine göre türler arasında istatistiki açıdan bir fark bulunmadı (Çizelge 3.19).

Çizelge 3.19. Hayvan türlerine göre real time RT-PCR sonuçları

Hayvan Türü	Pozitif	Negatif	Toplam	%
Oğlak	2	1	3	66,66[a]
Kuzu	9	8	17	52,94[a]
Keçi	13	17	30	43,33[a]
Koyun	5	9	14	35,71[a]

[a]: aynı sütundaki değerler arasında aynı harf taşıdıklarından istatistiki açıdan herhangi bir fark tespit edilmedi (P>0,05).

Vero hücre kültüründe 3 kez pasajlanması sonucunda elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde hayvan türlerinden elde edilen izolasyon materyallerine ve hayvan türlerine göre virus izolasyon sonuçları arasında istatistiki açıdan herhangi bir fark bulunamadı.

4.TARTIŞMA

Endemik alanlarda klinik ve postmortem bulgular PPR'ın tanısı için yeterli olabilmesine rağmen, kesin teşhis için laboratuar tanısı gerekmektedir. PPR ve onun büyük ruminantlardaki akrabası sayılan RPV üzerine dünyada ve ülkemizde yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır.

Tatar ve Kabaklı (2006) Türkiye'de üretilen PPR aşısının bağışıklık süresinin tespiti için Manisa, Antalya ve Mardin illerinden 972 adet koyun ve keçiden örnekleme yaptıkları saha çalışmasında, aşılanmayı takiben 1 yıl sonra toplam 742 hayvanın %78'ini C-ELISA ile PPR seropozitif olarak bulmuşlardır. Yine aynı çalışmada aşısız kontrol grubu olarak seçilen hayvanlarda ise Antalya ve Manisa illerinde %100, Mardin ilinde %25 oranında seronegatiflik belirlemişlerdir.

Gümüşova ve Memiş (2014) Samsun çevresinde yetiştirilen, PPR aşısı uygulanmış keçilerde aşılama sonrası antikor varlığının belirlenmesi ve antikor varlığının keçi ırklarına göre farklılık gösterip göstermediğini incelenmek amacıyla yaptıkları çalışmada, PPR aşısı yapılan 368 adet keçiyi (142 Kıl keçisi, 124 Malta keçisi ve 102 Saanen keçisi) C-ELISA ile seropozitiflik yönünden incelemişlerdir. PPR yönünden seronegatif olarak bildirilen bütün keçilerin aşılama sonrası antikor varlığı %72,55 (267/368) olarak belirlenirken, ırklarına göre seropozitiflik Kıl, Malta ve Saanen keçilerinde sırasıyla, %72,53, %72,58 ve %69,60 olarak saptamışlar ve ırklar arasındaki dağılımlarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadığını ifade etmişlerdir.

Mehmood ve ark (2009) Pakistan'ın kuzeybatı sınır alanlarında keçi ve koyunlardaki PPRV seroprevalansını belirlemek amacıyla C-ELISA yöntemini kullanmışlar, 26 bölgeye ait toplam 4548 adet serum örneği işlenmiş, %18,20 oranında seroprevalans ile 828 örnek PPR antikoru yönünden pozitif olarak belirlenmiştir. 337 (%24,90) koyun örneğini ve 491 (%15,36) keçi örneğini pozitif bulmuşlardır.

Khan ve ark (2007) Pakistan'ın Punjab ilinde 660 (232 koyun, 428 keçi) serum örneğini PPRV'ye spesifik antikor yönünden C-ELISA ile incelemişler,

seropozitifliği keçilerde %39,02, koyunlarda %51,29 belirlerken, küçük ruminantlarda PPRV'nin genel seroprevalansını %43,33 bulmuşlardır.

Özkul ve ark (2002) Türkiye'de PPR'ın konakçı aralığı, dağılımı ve prevalansını belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, 18 farklı çiftlikte yetiştirilen toplam 1607 hayvanı RPV ve PPRV'ye karşı antikor varlığı yönünden incelemişlerdir. Sadece iki çiftlikte her iki virusa spesifik antikor belirleyememişlerdir. PPRV prevalansının sürülerde %0,87- %82,6 aralığında değiştiğini ve koyunlarda (%29,2) keçilerden (%20) daha yüksek olduğunu saptamışlardır. En yüksek seroprevalansı ise %82,6 ile Sakarya ilindeki keçilerde bulmuşlardır. PPRV ve RPV için antikor prevalansları sırasıyla %22,4 ve %6,28 olarak bulunmuştur. Ayrıca PPRV enfeksiyonunun ortaya çıkışı ile coğrafi konumu arasında önemli bir ilişki olduğu ortaya konulmuştur.

Albayrak ve Alkan (2009) yapmış oldukları çalışmada, Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinde yer alan 8 ildeki koyunculuk işletmelerinde, klinik muayenelerde sağlıklı görünen ve rastgele seçilen 6 aylıktan büyük toplam 892 koyundan aldıkları kan serum örneklerini PPR C-ELISA ile incelemişler toplam 133 serum örneğinde (%14,95) PPRV'ye karşı antikor varlığı tespit etmişlerdir. İllere göre seropozitiflik oranlarının %3,5-38,2 arasında olduğu saptanmıştır.

Abubakar ve ark (2008) Pakistan'ın farklı bölgelerindeki atık yapmış keçi sürülerinde PPR'ın mortalitesi ve prevalansı üzerine yapmış oldukları çalışmada Pakistan'ın 3 farklı bölgesinde 185 adet hayvan ölümünün (Mortalite oranı: %28) olduğu ve 650 adet hayvanın oluşturduğu popülasyonda yer alan 140 hayvandan örnek toplandığını, gebe olan bu hayvanların 58 adedinin atık yaptığını belirtmişlerdir. Enfeksiyondan etlkilenmiş daha sonra iyileşmiş veya sağlıklı görünen 110 hayvandan toplanan serum örnekleri C-ELISA ile PPR antikor varlığı yönünden incelenmiş, 84 hayvanda PPR antikoru pozitif bulunmuştur. Ayrıca ölen hayvanlardan toplanan 24 adet doku örneği (akciğer, dalak ve lenf yumrusu) ve atık fötustan toplanan 6 adet doku örneği (akciğer) immunocapture ELISA ile PPR antijen varlığı yönünden incelenmiş ve 19 doku örneği PPR antijeni yönünden pozitif belirlenirken atık akciğer dokuları negatif olarak tespit edilmiştir. Yapmış oldukları bu çalışmada atık yapmış sürülerde PPR antikor pozitiflik oranı ile keçilerdeki

yüksek atık oranını PPR hastalığının prevalansı ve mortalitesi ile ilişkilendirmişlerdir.

El Arbi ve ark (2014) 1904 serum örneği (1190 koyun, 714 keçi) ile Moritanya'da yaptıkları çalışmada prevalans oranını %43 olarak bulmuşlardır. PPRV prevalans oranlarını %3 (Guerou) ile %98 (Kobeni) aralığında belirlemişlerdir. Prevalans oranları ile hayvanların yaş ve ırkları arasında istatistiki bir fark tespit edememişler, fakat prevalans oranlarının kuzeyden güneye doğru artış gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Kuzeyden güneye doğru artan prevalans oranları Güney Moritanya'daki sürü yoğunluğuna ayrıca Mali ve Senegal (2 güney ülkesi) ile Moritanya arasındaki hayvan hareketliliğine bağlı olabileceğini ifade etmişlerdir.

Wang ve ark (2009) yaptıkları çalışmada, Temmuz 2007'den Kasım 2007'ye kadar Tibet'in Ngari bölgesi ve komşu ilçelerini 3 gruba ayırmışlar, 1. gruptan 718 hayvan, 2. gruptan 298 hayvan ve 3. gruptan 520 hayvan olmak üzere toplam 1536 hayvanı C-ELISA ile incelemişlerdir. Toplamda 271 (%17,6) hayvanı seropozitif olarak bildirmişlerdir. Ngari bölgesindeki 763 keçiden 263 (%34,5)'ünü pozitif saptarlarken Ngari bölgesindeki en yüksek prevalansı Rutog ilçesindeki keçilerde (%61,1, 121/198) bulmuşlardır. Ngari bölgesinde 73 koyunun sadece 8 adedini (%11) pozitif olarak belirlediklerini bildirmişlerdir.

Wang ve ark (2015) 25 Mart- 5 Mayıs 2014 tarihleri arasında Çin'in Heilongjiang ilinin 13 ilçesinde 141 şüpheli sürüde (41 adedi ithal hayvan içeren sürü) yer alan klinik olarak sağlıklı hayvanlardan 1887 serum toplamışlar ve C-ELISA ile incelediklerini bildirmişlerdir. Serum örneklerinin %17 (312/1887)'si ve ithal sürülerin %76 (31/41)'sını PPRV'ye karşı antikor pozitif olarak tespit etmişlerdir. 5 ilçede (Zhaodong, Hulan, Huachuan, Nenjiang ve Baoqing) bulunan yerli sürülerde %29 (29/100) oranında seropozitiflik belirlemişler ve bu bölgelerde ithal sürüler ile yerli sürülere PPRV'nin taşındığını ortaya koymuşlardır.

Lembo ve ark (2013) Tanzanya'da 2011 yılının ortalarında 3 yaşından büyük fakat 2008 salgınında 2 yaşından küçük olan ve RPV ile PPRV'ye karşı aşı uygulaması yapılmamış sığırlardan topladıkları serumlar ile Tanzanya'da Serengeti Ulusal Parkı ve Ngorongoro Koruma alanında yer alan bufalolardan elde ettikleri

serumları C-ELISA ile incelemişler toplam 150 adet bufalo örrneğinde seropozitiflik belirleyemez iken, 266 sığırın 46'sında (%17,3) antikor tespiti yapmışlardır.

Singh ve ark (2004b) yaptıkları çalışmada koyun ve keçi serumlarında PPRV antikorlarını belirlemek için geliştirdikleri C-ELISA ile VNT'ini karşılaştırmak amacıyla toplam 1668 adet koyun ve keçi serumu ile 32 sığır serumunu incelemişlerdir. C-ELISA testinin spesifitesini %98,4 ve sensivitesini %92,4 olarak belirlemişlerdir. Pozitif serum örneklerinin çoğunu aşılamadan 21 gün sonra topladıklarını bildirmişlerdir. Aşılanmamış hayvanlarda sahada doğal enfeksiyon çalışmalarında C-ELISA'nın sensivitesinin %95,4'e kadar ulaştığını belirlemişlerdir. Deneysel olarak aşılanmış 4 adet keçide 1 yıl boyunca PPRV antikorlarını tespit etmişlerdir. Ayrıca C-ELISA testini VNT ile 64 serum örneğinde karşılaştırmışlar, C-ELISA'nın VNT'ine göre antikor belirleyebilen son nokta değerlerini (1-3 $\log_2$) daha düşük olarak bulmuşlardır. Sonuç olarak serum örneklerinde PPRV antikorlarının tespiti ve serosurvey çalışmalarında VNT yerine C-ELISA testinin rahatlıkla kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Ali ve ark (2014) Sudan'ın Nil nehri ve Khartoum bölgelerinde 2008 yılında meydana gelen salgınlarda hayvanlarda gastroenterit ve pneumoni bulguları görmüşler ve hayvanların aşısız olduğunu bildirmişlerdir. Bu salgınlarda yaptıkları çalışmada Khartoum bölgesindeki Soba'nın güney kesiminde %100 morbidite ve mortalite oranına sahip 9-15 aylık 20 koyunluk bir sürü bildirmişlerdir. Nil nehri bölgesinin ElDamer şehrinde toplam 3500 koyun popülasyonunda %17,1 (600 hayvan) mortalite, %31,4 (1091) morbidite oranı ve vaka ölüm oranını %54,6 olarak bildirmişlerdir. Bu salgınlarda yaptıkları I-ELISA ile 6 hayvandan alınan 21 örnekten (akciğer, dalak ve lenf yumrusu) 7 tanesini (akciğer) pozitif bulmuşlar ve bu pozitif örnekleri RT-PCR ile desteklemişlerdir.

Bu çalışmada seropozitiflik, Mehmood ve ark (2009)'nın keçi ve koyunlarda, Albayrak (2007)'ın koyunlarda yaptıkları çalışmalardan yüksek bulunmuştur. Ayrıca Albayrak (2007) tarafından yapılan çalışmada illerdeki seropozitiflikten yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada toplam prevalans Wang ve ark (2009, 2015)'dan yüksek bulunurken, keçilerde (%27,52) daha düşük koyunlarda daha yüksek (%50,31) olarak belirlenmiştir.

C-ELISA, *Morbillivirus* ailesinde yer alan birçok virusa karşı oluşan antikorların belirlenmesinde tercih edilen testlerden bir tanesidir (Libeau ve ark 1995, OIE 2012). Bu araştırmada kullanılan C-ELISA kitinde pleytler PPR rekombinant N proteinine spesifik antijenle kaplanmış olup konjugat anti-N-HRP'den oluşmakta idi. Kit protokolünde herhangi bir oran verilmemekle beraber yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu belirtilmiş, protokolde referans araştırma olarak verilen Libeau ve ark (1995) tarafından gerçekleştirilen araştırmada virus nötralizasyon testi ile kitin çalışma prensibinin temelini oluşturan yöntemin karşılaştırılması sonucu sensitivitenin %94,5, spesifitenin ise %99,4 olduğu vurgulanmıştır. Yine aynı temele dayanan bir başka araştırmada (Choi ve ark 2005) ise sensitivite %93,4, spesifite %98,5 olarak tespit edilmiştir. Araştırmamızda adı geçen yönteme dayalı hazır kitin ercih edilmesinde, belirtilen bu yüksek oranların etkisi olmuştur. Bu araştırmada örnekleme yapılan köylere göre seropozitiflik oranının %0 (Elvanlı, Kavak) ile %100 (Sabak, Taşçılı) arasında değiştiği belirlenmiş, ortalama ise %41,04 olarak saptanmıştır. Elde edilen bu oran daha önce ülkemizde Özkul ve ark (2002) tarafından belirlenen %22,4, Singh ve ark (2004b)'nın Hindistan'da %33, Banik ve ark (2008)'nın Bangladeş'te %26, Munir ve ark (2012)'nın Pakistan'da %34,2 olarak belirledikleri oranlardan yüksek olduğu görülmektedir. Nitekim OIE'nin son verilerine göre ülkemizde 2016 yılı içinde 50 adet salgın bildirimi yapılmış olması, virusun sahada dolaşımının bir kanıtı olan aşılanmamış hayvanlarda seropozitivitenin yüksek olmasını açıklamaktadır. Bununla birlikte PPRV'ye karşı antikor prevalansının ülkelere ve bölgelere göre değişiklik göstermesi; coğrafik bölgelere bağlı olarak yetiştirme yöntemlerindeki farklılıklar, hayvanların bireysel immunite durumları, teşhiste tercih edilen yöntemler, örnekleme metotları ve örnekleme yapılan bölge veya ülkelerde hastalığın endemik veya epidemik durumundan kaynaklanabileceği unutulmamalıdır.

Sahada PPRV'nin çabuk teşhis edilebilmesi, salgınlardan kaynaklanabilecek ciddi ekonomik kayıpların önüne geçebilmek için enfeksiyonun etkili bir biçimde kontrolünde önemli bir unsurdur. Bu nedenle PPRV'nin teşhisinde hızlı, spesifik ve duyarlılığı yüksek yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Diallo ve ark 1995). Hücre kültürlerinde virus izolasyonu, teknik olarak zor ve zaman alıcı olduğundan dolayı rutin teşhis yöntemi olarak çok tercih edilmemektedir. 1995'ten günümüze PPRV'nin hızlı ve spesifik teşhisi için çeşitli RT-PCR teknikleri geliştirilmiştir

(Forsyth ve Barrett 1995, Couacy-Hymann ve ark 2002, Balamurugan ve ark 2006). Ancak bu klasik RT-PCR tekniklerinin laboratuvarda yoğun bir çaba gerektirmesi, teknik sonucunda elde edilen PCR ürünlerinin ortaya konulması için zorunlu olan elektroforez işlemleri sırasında kontaminasyon riskinin olması gibi nedenlerden dolayı kullanımları kısıtlanmaktadır. Bütün bunların aksine real time RT-PCR tekniğinde amplifikasyon ve analiz işlemlerinin tek bir kapalı sistem içerisinde yapılıyor olması bir çok avantaj sağlamakta, kontaminasyon riskini oldukça azaltmakta, istenildiğinde elde edilen RNA miktarının ölçülmesine izin vermekte, daha hızlı ve güvenilir sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. TaqMan temeline dayanan one-step real time RT-PCR tekniği son yıllarda ülkemiz de dahil PPR salgını gözlenen ülkelerde sahadan elde edilen örneklerin incelenmesinde tercih edilen bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Enfeksiyonun teşhisi için günümüzde kullanılan RT-PCR yöntemlerinde amplifikasyon amacıyla hedef olarak PPRV'nin füzyon, nükleokapsid ve matriks protein adı verilen üç farklı geni tercih edilmektedir (Forsyth ve Barrett 1995, Couacy-Hymann ve ark 2002, Balamurugan ve ark 2006,). Couacy-Hymann ve ark (2002) ile Bao ve ark (2008) kullandıkları metotta *Morbillivirus* enfeksiyonlarında oldukça fazla miktarda transkribe edilen mRNA'ya sahip N geni fragmentini amplifiye etmeyi amaçlamışlardır. Virusun mutasyona uğrayabilmesinden dolayı PPR'nin RT-PCR ile teşhisinde kullanılan primerlerin dizaynı sırasında iki farklı strateji tavsiye edilmektedir. Bunlardan bir tanesi iki farklı fragmenti amplifiye etmek için iki primer setinin kullanılması, diğeri ise değişik orijinlerden elde edilen farklı suşlardaki sekans varyasyonları göz önünde bulundurularak primer setlerinin sentezlettirilmesidir. Bao ve ark (2008) farklı orijinlere sahip 8 PPRV suşunun N genini hedeflemişler, kullandıkları primer ve probları yüksek oranda korunmuş bölgeler için dizayn etmişlerdir.

Şevik ve Sait (2015) tarafından gerçekleştirilen araştırmada, saha örneklerinde viral RNA tespiti için F genine spesifik primerler kullanılarak Forsyth ve Barrett (1995) ile N geni için spesifik primerler kullanılarak Kerur ve ark (2008) tarafından geliştirilen iki farklı RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Araştırmada N geni temeline dayalı primerlerin F geni temeline dayalı primerlerden daha fazla sayıda örnekten PPRV'yi belirlediği ortaya konulmuştur. N genine spesifik primerlerin duyarlılığının daha fazla olduğu birçok araştırmada bildirilmiştir (Couacy-Hymann

ve ark 2002; Kerur ve ark 2008). N proteini virusa karşı koruyucu immuniteyi uyarmadığı (Diallo ve ark 2007) N geni transkriptlerinin F geni transkriptlerine oranla enfekte dokularda daha fazla gözlendiği, bu yüzden N genine spesifik primerlerin F geni temelli primerlerden daha duyarlı olduğu belirtilmektedir (Ghosh ve ark 1995).

Singh ve ark (2004a) yaptıkları çalışmada, deneysel ve doğal olarak enfekte hayvanlardan alınan doku ve svap örneklerini kullanarak PPR'ın N proteinine karşı spesifik antikor olarak 4G6 MAb kullanarak geliştirdikleri bir sandviç ELISA kiti ile ticari olarak elde ettikleri immuno-capture ELISA kitini karşılaştırmışlardır. Mart 2000 ile Temmuz 2001 tarihleri arasında Hindistan'ın 9 bölgesinde 27 salgından alınan 259 materyal ile deneysel olarak 231 materyal olmak üzere toplamda 490 materyali incelemişlerdir. İncelenen 127 adet nazal svabın 14 (%56)'ünü, 39 lenf yumrusunun 18 (%46,1)'ini, 50 dalağın 14 (%35)'ünü, 38 akciğerin 22 (%57,9)'sini pozitif olarak belirlemişlerdir. Ayrıca 49 adet bukkal svabın 13 (%56,5)'ünü, 104 göz svabının 5 (%45,5)'ini, 25 adet bağırsak numunesinin 12 (%48)'sini, 20 adet dokudan 4 (%20)'ünü, 23 adet bilinmeyen dokudan 9 (%39,1)'unu pozitif olarak bildirmişlerdir. Her iki testinde klinik örneklerden PPRV enfeksiyonunun teşhisinde etkili olduğunu bulmuşlardır.

Albayrak ve Alkan (2009) yapmış oldukları çalışmada, PPR enfeksiyonundan şüpheli 4 ildeki 34 enfeksiyon odağında bulunan 57 hayvandan (koyun, kuzu ve atık) elde ettikleri 164 izolasyon materyalinin 26'sında (%15,85) PPRV nükleik asiti tespit etmişlerdir. 57 tane hayvandan, 18 tanesini (%31,5) ve 34 adet sürüden, 15 tanesini (%44,1) pozitif olarak bulmuşlardır. Canlı hayvanlardan aldıkları bütün lökosit ve oral svap örneklerini RT-PCR ile negatif belirlerken, nazal svap örneklerinde %25 (5/20), konjuktival svap örneklerinde %10 (2/20) oranlarında pozitiflik tespit etmişlerdir. Nekropsi yaptıkları hayvanlardan topladıkları dokuların RT-PCR sonucuna göre lenf nodüllerinde %50 (5/10), akciğer örneklerinde %17,03 (7/41) ve dalak örneklerinde %22,58 (7/31) oranlarında PPRV nükleik asit pozitifliği saptamışlardır. Vero hücre kültüründe yaptıkları virus izolasyon çalışmasında 3 pasaj sonrası CPE oluşumu gözleyememişler fakat bu 26 materyalde hücre pasaj sıvılarını RT-PCR ile viral nükleik asit yönünden kontrol etmişler ve 25 no'lu sürüden alınan 1 kuzuya ait akciğerin birinci hücre pasaj sıvısında RT-PCR ile viral nükleik asit

varlığı saptamışlardır. Aynı materyalin ikinci ve üçüncü pasaj sıvılarını ise PPRV nükleik asidi yönünden negatif bulmuşlardır.

Wang ve ark (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, PPRV şüpheli Tibetin Ngari bölgesinden (Ge'gyani 33, Zada 7, Gerze 5, Rutog 4) 49 koyun ve keçiden elde ettikleri materyalleri (lenf yumrusu, dalak, akciğer, bağırsak ve svap) 2 farklı RT-PCR (N RT-PCR, F RT-PCR) ve yeni geliştirdikleri ve valide ettikleri real time kantitatif RT-PCR (qRT-PCR) ile incelemişlerdir. N RT-PCR ile 28 örnek, F RT-PCR ile 27 örnek, qRT-PCR ile 37 örnek viral nükleik asit yönünden pozitif belirlenmiştir. Her 3 metota göre 31 hayvanı pozitif olarak bildirmişlerdir. Keçi örneklerinde %77 (23/30), koyun örneklerinde %29 (2/7) pozitiflik oranı bildirilmiştir.

Wang ve ark (2015) PPR salgınlarının gözlendiği bölgelerden alınan hasta veya ölmüş hayvanlardan 285 nazal svap ve 28 doku örneğini (lenf yumrusu, dalak, akciğer ve bağırsak) RT-PCR ile inceledikleri nde nazal svap örneklerini %14 (39/285) ve doku örneklerini %89 (25/28) pozitif olarak bildirirlerken; bütün örneklerde PPRV nükleik asit pozitif oranını %20 (64/313) olarak bildirmişlerdir. Serolojik ve moleküler teşhis metotlarının kombine sonucu olarak şüpheli sürülerde %43 (60/141) pozitif olarak bulduklarını ifade etmişlerdir. 11 adet pozitif olarak buldukları örnekleri sekanslamışlar ve soy II ve soy IV'e ait olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada incelenen tüm materyallerde %32.83 (44/134) oranında pozitiflik bulundu. Bu oranın Wang ve ark (2015) tarafından yapılan araştırmada belirlenen düzeyden düşük olmasının sebebi olarak salgın olup olmadığı bilinmeyen bölgelerden PPR ve PPR benzeri klinik bulgular gösteren enfeksiyonlardan şüpheli hayvanlardan örnek toplanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ularamu ve ark (2012) Nijerya'nın Adamawa eyaletine ait Yola'da klinik olarak hasta koyun ve keçiden alınan 3 organ (akciğer, dalak ve lenf yumrusu) ile 30 adet (26 nazal ve 4 lakrimal svap) svap olmak üzere toplamda 33 adet örnekten 9 adedini RT-PCR ile PPRV nükleik asit pozitif olarak bulmuşlardır. 8 adet koyun nazal svabında pozitif sonuç bulamadıklarını belirtmişlerken, keçilere ait 18 nazal svabın 3 adedi pozitif, keçilere ait 4 adet lakrimal svabın 3 adedini ayrıca yine keçilere ait 1 er adet akciğer, dalak ve lenf yumrusu örneğini pozitif olarak

bulduklarını belirtmişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada keçilerden toplanan örneklere göre koyunlardan toplanan örneklerde pozitifliğin daha düşük çıkması, Ularamu ve ark (2012)'nın yapmış oldukları çalışma ile paralellik göstermektedir.

El Arbi ve ark (2014) N genini hedefleyen RT-PCR ile 2012 yılının Ocak-Mart ayları arasındaki 3 PPR şüpheli salgın yerinden toplamda 43 hayvandan topladıkları svap örneklerini incelemişler, 2 salgın yerinde 12 hayvanı pozitif olarak bulmuşlar, 12 pozitif örneği sekanslamışlar ve soy 1 ve 2'ye ait olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada svap örneklerinde antijen tespiti yapılamamış olmasına rağmen N genini hedefleyen real time RT-PCR ile diğer teşhis materyallerinde PPRV nükleik asit varlığı ortaya konulmuştur.

Gürçay ve ark (2012) Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki 11 farklı ilde yetiştirilen 28 farklı sürüdeki keçilerden (n=38) alınan toplam 98 materyalin 50'sinde RT-PCR tekniğiyle PPRV nükleik asidi belirlemişlerdir. Örnek toplanan illerin %45,4 (5/11)'ünde, incelenen sürülerin %39,2 (11/28)'sinde ve örneklenen hayvanların %44,7 (17/38)'sinde PPRV nükleik asit varlığı tespit etmişlerdir. Ayrıca PPRV enfeksiyonunun teşhisinde kullandıkları materyallerde lenf yumrusu %54,2 (13/24), nasal ve oral svap %66,6 (4/6), kan %45 (9/20), akciğer %46,2 (12/26) ve dalak %46,2 (12/26) olarak bulmuşlardır. Gürçay ve ark (2012) yapmış oldukları çalışmada enfeksiyonun Doğu Anadolu'da yaygın olduğunu göstermişler, RT-PCR'ın PPRV nükleik asit varlığını teşhis etmede duyarlı ve güvenilir bir metot olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Güler ve ark (2014) PPR'dan şüpheli koyun ve keçilerde F gen bölgesine dayalı RT-PCR ile 2008-2012 yılları arasında İç Anadolu, Akdeniz bölgesine ait (Konya, Aksaray, Antalya, Afyonkarahisar, Burdur, Isparta, Karaman ve Niğde) illerde Akkaraman koyunu ve kıl keçisi ırklarında yaptıkları çalışmada 190 hayvandan (147 koyun, 43 keçi) aldıkları örneklerden 65 küçük ruminantta (51 koyun, 14 keçi) PPRV RNA'sını pozitif olarak belirlemişlerdir. 22 koyun ve 4 keçiye ait aborte fötusun dalak, lenf yumrusu, akciğer, karaciğer ve iç organ örneklerini incelemişlerdir. 1 yaşından küçük 14 keçinin 8'ini (%57,1) ve 51 adet koyunun 41'ini (%80,3) pozitif olarak bulmuşlardır. 15 hayvanın akciğer, dalak, karaciğer ve lenf yumruları ayrı ayrı test edilmiş PPRV ile enfekte 10 adet hayvanın incelenen

bütün dokularında pozitif sonuç bulunurken 5 adet PPR negatif hayvanın incelenen bütün dokularında negatif sonuç bulmuşlardır. PPRV'nin Türkiye'nin bütün bölgelerinde endemik olduğundan bahsetmişlerdir. Koyun atık fötusunu RT-PCR ile pozitif bulmuşlar ve virus izolasyonu ile bu pozitifliği doğrulamışlardır. Viruslardan biri koyun abort fötusuna ait olmak üzere toplam 16 adet virusun filogenetik analizi yapılmış ve bu virusların lineage IV'e ait olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada toplamda %45,31 (29/64) oranında pozitiflik belirlenirken, bu oran koyunlarda %35,71 (5/14), kuzularda %52,94 (9/17), keçilerde %43,33 (13/30) ve oğlaklarda %66,66 (2/3) olarak bulundu. Bu bulgular Güler ve ark (2014) tarafından PPR enfeksiyonlarının Türkiye'nin bütün bölgelerinde endemik olduğu konusundaki görüşünü desteklemektedir.

Kwiatek ve ark (2011) Sudan'da topladıkları örnekleri önce I-ELISA ile incelemişler daha sonra RT-PCR'a tabi tutmuşlardır. RT-PCR ile koyunlarda %80 (21/26), keçilerde %100 (5/5), develerde %77,6 (38/49) olmak üzere toplamda 80 hayvanın 64'ünü pozitif olarak bulmuşlardır. Fas'ta ise 36 örneğin 16'sını pozitif olarak bildirmişlerdir. Ayrıca Sudan'da buldukları 64 tane pozitif örneğin 26 adet deveye ait izolatını ve Fasta saptadıkları 16 pozitiften 6 adet koyun izolatını sekanslamışlar ve soy IV olarak bildirmişlerdir.

Kwiatek ve ark (2010) PPRV' nin 4 soyunu da TaqMan teknolojisi ile tespit etmek için PPRV'nin N genini hedef alan one-step real time RT-PCR geliştirmişlerdir. Referans ve saha suşları kullanarak konvansiyonel RT-PCR ile bu testi karşılaştırmışlardır. Standart eğriyi N PPR gen plazmid'den RNA transkripsiyonu Cote d'Ivoire 89 (CI89) suş'undan 10 kat seri dilüsyon (10^{-10}) kullanarak elde etmişlerdir. CI89 suş (soy I) RNA'sından elde edilen nükleik asitleri konvansiyonel RT-PCR ile yaklaşık $1,5x10^3$ RNA kopya/µl. miktarında tespit ederken, one- step real time RT-PCR ile $2,4x10^2$ RNA kopya/ µl. olarak tespit etmişlerdir. Diğer üç soy (Nijerya 75/1 saha suşu (soy II), Mielik suşu (soy III) ve Hindistan 94/1 suşu (soyIV) kullanarak one-step real time RT-PCR'ın, konvansiyonel RT-PCR'a göre minimum teşhis limitinin 1/3 oranında daha düşük olduğunu ifade etmişlerdir. Tespit sınır noktasında Ct değeri 34,2 ±2 olarak bulmuşlardır. Kantitasyonunda en düşük bulma limiti Ct değeri 39'a karşılık gelen minimum reaksiyon başına 32 kopya RNA olarak bulmuşlardır. Ct değeri ve RNA

konsantrasyonu ilişkisi 32-3,2 X 10^8 aralığında doğrusal olarak elde etmişlerdir. PPR viral RNA miktarını reaksiyon başına $1,7x10^4$- $6,9x10^8$ kopya aralığında olduğunu tahmin etmişlerdir. One-step real time RT-PCR ile konvansiyonel RT-PCR'ı PPR salgınlarında sahadan topladıkları 72 adet değişik klinik örnekle karşılaştırmışlardır. Örnekleri 2007'de Tibetteki salgında 15 adet keçiden, 2008 Fas salgınında 37 adet koyundan ve 2004 ile 2009 yılları arasında Sudandaki salgında 5 koyun, 5 keçi ve 10 deveden olmak üzere konjunktival, oral ve nazal svap, akciğer, dalak, lenf yumrusu, bağırsak ve kan almışlardır. Toplamda 72 adet örnekten konvansiyonel RT-PCR ile 26 adet örnek pozitif iken, one-step real time RT-PCR'da 40 adet örneği pozitif olarak bulmuşlardır. One-step real time RT-PCR ile koyun kan örneklerinde (3/11), koyun doku örneklerinde (20/31), keçi doku örneklerinde (11/20), deve doku örneklerinde (6/10) pozitif bulmuşlardır. One-step real time RT-PCR ile konvansiyonel RT-PCR'a göre saha örneklerinde %20 daha fazla pozitif bulmayı başarmışlardır.

Rahman ve ark (2004) 250 mezenterik lenf yumrusunu 2003 yılı Nisan Ağustos aylarında Dera Ismail Khan mezbahanesinde (100 Tedy ve 150 Damani ırkı) keçilerden toplanmışlardır. Süpernatantları immunoelektroforez ile incelemişlerdir. 250 örnekten Damanilerin % 47,34 (71/150) ve Teddylerin %43 (43/100)' ünü PPR pozitif bulmuşlardır. Her iki ırkta, %47,05 erkek ve %42,50 dişi pozitif olarak bulduklarını belirtmişlerdir. Hayvanların yaşı göz önüne alındığında genç hayvanlarda yaşlılardan daha yüksek pozitiflik belirlendiği, bu pozitifliğin 7 ay ile 1 yıl arasındaki yaşlarda en yüksek oranda (%46,67) olduğunu vurgulamışlardır. PPR antijeni 1 yaşından büyük keçilerde (%45,45) yüzdeyle tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar ile her iki ırkın PPRV'ye eşit derecede duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. PPR pozitif keçilerin her üç yaş grubunda mevcut olduğunu ifade etmişlerdir. Pozitif sonuç yüzdesinin yaş artışı ile azaldığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlarla PPR'ın genç hayvanlarda daha yaygın olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada keçilerde %43,33 (13/30) ve oğlaklarda %66,66 (2/3) oranında bulundu. Bu bulgu Rahman ve ark (2004) belirttiklerine benzer biçimde genç hayvanlarda PPR enfeksiyonunun görülme yüzdesinin daha fazla olduğunu destekleyen bir bulgudur. Rahman ve ark (2004) tarafından yapılan çalışmada lenf yumrularında viral nükleik asit pozitiflik sonuçları ve bu çalışmada incelenen koyun lenf yumrusunda %25 (2/8), kuzu lenf yumrusunda %100 (1/1), keçi lenf yumrusunda %22,22 (2/9) oranında olmak üzere

toplamda %26,31 (5/19) oranında pozitiflik göz önüne alındığında PPRV teşhisi için lenf yumrusunun çok önemli bir teşhis materyali olduğu görülmektedir.

Batten ve ark (2011) manuel ekstraksiyona göre insan hatalarını ve çarpraz kontaminasyonu azaltmak amacıyla robotik RNA ekstraksiyonu kullanarak, spesifik ve duyarlı bir real time RT-PCR geliştirmek üzere bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. PPRV'nin N genini hedef alarak, topladıkları okuler svap, nazal svap ve kan örneklerinde PPRV'nin 4 soyunu araştırdıklarını ifade etmişlerdir. Bu testin performansını, trizol reagent kullanarak hücre kültürü süpernatantlarından elde edilen total RNA ile değerlendirmişlerdir. Spesifik RNA'da *Morbillivirus* varlığını agaroz jelli RT-PCR testi kullanarak teyit etmişlerdir. 12 hastalık odağından koyun ve keçilerden alınmış 212 (134 EDTA'lı kan, 38 ağız, burun ve göz svabı, 40 akciğer dalak ve lenf yumrusu) doku örneği real time RT-PCR ile incelenmiş ve 125 örneği pozitif olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca her bir odağı RT-PCR ile de test etmişler, 11 odakta PPRV'nin soy I, III ve IV'ten kaynaklandığını ortaya koymuşlardır. Real time RT-PCR'ın oldukça spesifik bir metot olduğunu ve RPV yada diğer Morbilliviruslarla çarpraz reaksiyon göstermediğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada 134 materyalden 44 adedinde viral nükleik asit pozitif olarak bulundu. Nitekim bulduğumuz bu bulgular Batten ve ark (2011)'nın robotik RNA ekstraksiyonu kullanılarak yapılan real time RT-PCR'ı PPR'ın teşhisinde duyarlı ve hızlı bir metot olduğu görüşünü desteklemektedir.

Bao ve ark (2008) hızlı ve spesifik TaqMan temelli, one step real time quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR) ile PPRV'nin teşhisini gerçekleştirmek üzere bir çalışma yapmışlardır. Primer ve probu N protein genine göre dizanyn etmişlerdir. PPRV'nin çok farklı suşlarını (PPR Bangledeş, PPR Umman, PPR Nijerya, PPR Dorcas ve PPR Yemen) qRT-PCR amplifikasyonu için seçmişler ve özel amplifikasyon sinyallerini bulmuşlardır. Ayrıca sahadan alınan 1 lenf yumrusu dokusundan elde edilmiş RNA'nın 10 katlı dilüsyonlarını ile real time qRT-PCR'ı konvansiyonel RT-PCR ile karşılaştırmışlar, real time qRT-PCR, Ct değeri 35,53±0,49 ile 10^{-5} örnek dilüsyonu tespit etmişler. Konvansiyonel RT-PCR'da ise 10^{-4} dilüsyonu tespit etmişlerdir. Real time qRT-PCR'ın konvansiyonel RT-PCR'a göre bir logaritma ünite ile daha duyarlı bir test olduğunu ifade etmişlerdir. Bu testin teşhis limitini Ct değeri 37,26 ± 1,27, karışımda 8,1 RNA

kopya/ reaksiyon olarak bulmuşlardır. Viral RNA'nın saptanması için 2007 yılında Tibet'te toplamda 30 saha örneği real time qRT-PCR ile paralel konvansiyonel RT-PCR ile PPRV'nin varlığı yönünden incelemişlerdir. Konvansiyonel RT-PCR'da 14 örnek pozitif bulunurken real time qRT-PCR'da 22 örneği pozitif olarak belirlemişlerdir. Real time qRT-PCR testi ile lenf yumrusu (15/21), akciğer (1/1), rektum (2/2), küçük bağırsak parçası (1/1), dalak (1/1), karaciğer (1/1), göz svabı (1/2) ve dışkı (0/1) örneklerinde pozitif olarak saptamışlardır. Real time qRT-PCR testinin sahadan elde edilmiş doku örneklerinde PPRV'nin laboratuar teşhisinde duyarlı, spesifik ve hızlı bir metot olduğunu ifade etmişlerdir.

Munir ve ark (2012) N geni için spesifik real time RT-PCR ile kan emdirilmiş filtrelerde 13/15 (%87) örnekte viral RNA belirlemişler ve bu örneklerden 10 tanesini sekanslamayı başararak soy 4'e ait olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada 36 adet lökosit örneği incelendi ve 11 adeti (%30.55) viral nükleik asit pozitif olarak bulundu. Bu bulgular lökosit örneklerinin canlı hayvanlarda ateşli dönemde alındıkları takdirde PPRV'nin teşhisinde iyi bir teşhis materyali olduğunu ortaya koymaktadır.

Luka ve ark (2012) yaptıkları çalışmada svap, lökosit ve çeşitli dokularda (dalak, karaciğer, akciğer, lenf yumrusu ve barsak) PPRV'nin teşhisi amacıyla kullanılan PCR tekniğinde F ve N genlerine özgü primerlerin kullanımı göstermiştir ki organ türünün ve primerlerin seçiminin koyun ve keçilerde PPR'nin teşhisin optimize edilmesinde hayati öneme sahip olduğu bildirilmiş, lökosit örneklerinin moleküler teşhis için en iyi numuneler olduğu ileri sürülmüştür. N genine spesifik primerlerin teşhisin duyarlılığını arttırdığı bunun sebebi olarak enfekte organlarda nükleoprotein gen transkriptlerinin F geni ekspresyonuna göre daha yüksek seviyede gerçekleştiğinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Ghosh ve ark 1995). Lökositlerin PCR için alınabilecek en iyi örneklerden birisi olmasının nedeninin PPRV'nin özellikle ciddi lökopeni ve immunsupresyona liderlik eden lenfoid ve epiteloid dokularda çoğalma eğilimine sahip olmasına bağlı olabileceği (Luka ve ark 2012) bu durumun aynı zamanda sekonder ve fırsatçı enfeksiyonlara yol açabileceği bildirilmiştir (Appel ve Summers 1995). Bütün bunların yanında primerlerin virusu tespit edebilme kabiliyetlerinin enfeksiyonun safhasına ve örnekleme zamanına göre değişebileceği de unutulmamalıdır (Aleyas 2002).

Bu araştırmada real-time RT-PCR sonuçlarının hayvan türlerine göre dağılımları incelendiğinde viral antijenin keçilerden alınan örneklerde (%43,33) koyunlardan alınan örneklere (%35,71) göre, oğlaklarda da (%66,66) kuzulardan (%52,94) alınan örneklere göre daha yüksek oranda saptandığı gözlendi. Alemu (2014) tarafından yapılan bir çalışmada antijen-ELISA ve RT-PCR yöntemiyle keçilerden toplanan örneklerde koyunlardakine kıyasla oldukça yüksek oranda viral antijen ve viral nükleik asit tespiti yapılırken, Abraham (2005) salgınlar sırasında patojenitenin koyunlarda çok sınırlı olduğunu ve bunun sahada seyreden PPRV suşlarının koyunlar için virulenslerini kaybetmeleri ya da lokal koyun ırklarının bu suşlara karşı direnç kazanmaları sonucu ortaya çıkabileceğini öne sürmüştür. Benzer bir biçimde Abubakar ve ark (2008) Pakistan'da, Ularami ve ark (2012) Nijerya'da meydana gelen PPRV salgınlarında keçilerin koyunlardan çok daha fazla etkilendiğini, Mahajan ve ark (2013) PPR enfeksiyonlarının insidensinin keçilerde koyunlara göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Virus izolasyonu çalışmalarında virusun hücre adaptasyonunun zor olduğu, çok sayıda kör pasaj gerektirdiği ve bu nedenle izolasyon başarısının düşük olduğu rapor edilmiştir (OIE 2012). Yapılan çalışmalarda Vero hücre kültürü ile izolasyonun inokulasyonu takiben en erken 3. günde (Özkul ve ark 2002) en geç ise 2. kör pasajın sonunda 22. günde (Nanda ve ark 1996) sağlandığı bildirilmiştir. Şu ana kadar izolasyona yönelik çalışmalarda, toplam örnek sayısı göz önüne alındığında izole edilebilen örnek sayısı çok düşüktür. Couacy-Hymann ve ark (2005) deneysel olarak enfekte ettikleri ve enfeksiyona bağlı ölen 23 keçiye ait toplam 95 adet akciğer ve lenf dokusundan sadece 2 dokuda 2. kör pasaj sonucunda virus izole edebildiklerini bildirmişlerdir. Özkul ve ark (2002) 328 örnekten sadece 2 adet burun svabından virus izole ettiklerini rapor etmişlerdir.

Albayrak ve Alkan (2009) yapmış oldukları çalışmada elde edilen 164 izolasyon materyalini Vero hücre kültüründe 3 kez pasajlama sonrasında virus izole edilemediğini bildirmişlerdir. Özkul ve ark (2002) toplamda 328 örneği Vero hücrelerine inokule etmişler Sakarya ilinden alınan iki nazal svap örneğinin (Sakarya 1 ve Sakarya 2) inokule edildiği Vero hücrelerinde inokulasyon sonrası 3. günde CPE gözlemişlerdir. Housawi ve ark (2004), Suudi Arabistanın doğu'sunda 70 adet yetişkin hayvandan alınan örnekleri virus izolasyonu amacıyla Vero ve BHK-21

monolayer hücre kültürlerinde inokule ettikten 5 gün sonra hücrelerde yuvarlaklaşma belirlemişler, CPE'leri her iki hücre kültürlerinde de gözlemişlerdir. Güler ve ark (2014) yaptıkları çalışmada, hücre kültüründe bir koyun atık fötusunun dokularından virusu izole etmişlerdir. İnokulasyondan 5 gün sonra CPE gözlemişler ve RT-PCR ile bu virusun varlığını doğrulamışlardır. RT-PCR'da zayıf bant gördükleri 5 fötus örneğinde virus izole edememişlerdir. Bu örnekleri tekrar RT-PCR tetine tabi tuttuklarında negatif sonuç elde etmişlerdir. Kwiatek ve ark (2011)'de yaptıkları çalışmada, Sudan'dan elde ettikleri 3 deve ve 2 koyun akciğeri örneğini MDBK hücrelerine inokule etmişler ve virusu izole etmişlerdir. Fas'tan koyun akciğer örneğini Vero hücresine ekmişler ve virus izole ettiklerini bildirmişlerdir. İzole ettikleri örnekleri sekansladıklarını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada izolasyon amacıyla toplam 64 hayvandan (keçi, oğlak, koyun ve kuzu) elde edilen 134 izolasyon materyalinin (lenf yumrusu, dalak, akciğer, lökosit, dudak svap ve dil) 3 kez Vero hücre kültürlerine pasajlanması sonrasında 21 nolu keçiden elde edilen akciğer numunesinin 3. günden itibaren CPE meydana getirdiği, diğer CPE meydana getiren örneklerin 5. günde CPE meydana getirdiği belirlenmiştir. Toplam 134 izolasyon materyalinin pasajlanması sonrasında real time RT-PCR sonuçlarına göre pozitif olarak belirlenmiş 44 örnekten 28'inde virus izole edilirken (Şekil 3.11), 16 örnekte ise virus izolasyonu gerçekleştirilememiştir. Pasajlanan izolasyon materyallerinin %20,89 (28/134)'unda, örneklenen hayvanların %34,37 (22/64)'sinde virus izole edildi. Diğer çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da Vero hücre kültürünün virus izolasyonu için uygun bir hücre kültürü olduğu ortaya konuldu. Ayrıca real time RT-PCR ile pozitif bulunan ve virus izole edilen lenf yumrusu, dalak, akciğer, lökosit ve dudak örneklerinin PPRV'nin teşhisinde ve PPR virusunun izolasyonunda kullanılabilecek ugun materyaller olduğu ortaya konuldu. Ancak araştırmada CPE gözlenen hücre kültürleri süpernatantlarından tekrar PPRV'ye ait antijen veya nükleik asit tespitine yönelik herhangi bir test yapılmamış olması ve örneklerden virus izolasyon oranının diğer araştırmalara göre yüksek bulunmuş olması, klinik bulguları PPR enfeksiyonuna benzerlik gösteren diğer viral enfeksiyonların işe karışmış olabileceğini akla getirmektedir.

Ülkemiz coğrafik durumu gereği hastalığın endemik olarak seyrettiği ülkelerle sınır komşusudur. Güneydoğu ve Doğu Anadolu Bölgeleri arazi yapısı açısından hayvan haraketlerinin kontrolünde zorluklara neden olmakta, aynı zamanda

bu bölgelerle sınır komşusu ülkeler arasında küçük ruminant ticareti söz konusu olabilmektedir. Bu durum ve ülkemizde elde edilen suşlar üzerine daha önceden gerçekleştirilen çalışmalar (Özkul ve ark 2002, Kul ve ark 2007, Toplu ve ark 2012 Sait 2013) neticesinde Irak, İran, Pakistan, Nepal, Bangladeş, Mısır, Fas, Kuveyt, Suudi Arabistan, Hindistan ve Çin'de seyreden genetik hat IV grubu içerisinde yer almış olmasının tespiti enfeksiyon kaynağının komşumuz olan Ortadoğu ülkelerinden birisi olabileceği şüphesine yol açmaktadır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Hayvan hastalıkları ile mücadele ve hayvan hareketleri kontrolü programı gereği ülkemizde 2017 yılı itibarı ile Trakya bölgesinde aşılama yapılmaması ve Anadolu'da hastalığın gözlendiği bölgelerdeki tüm hayvanlar, salgın görülmeyen bölgelerde ise daha önce aşılanmamış ya da aşı yapıldığından şüphe edilen erişkin hayvanlar ile 2017 yılında yeni doğmuş genç hayvanların 3. aydan itibaren aşılanması, ithal edilen damızlık hayvanlara da PPR aşısı uygulama mecburiyeti söz konusudur. Bu konuda büyük titizlik gösterilmesinin, OIE ve FAO'nun enfeksiyonu dünya üzerinden tamamen eradike etmeyi hedeflediği 2030 yılından çok daha önce ülkemizde eradike edilmesi imkanını sağlaması açısından oldukça önemli bir unsur olduğu düşünülmektedir. Hastalığın kontrolü için aşılama programlarının çok daha katı bir biçimde uygulanması, PPR aşısı kullanılan ve yüksek risk içeren bölgelere stratejik olarak daha fazla önem gösterilmesi teşvik edilmelidir. PPRV enfeksiyonlarının özellikle doğu ve güneydoğu bölgelerimizdeki resmi veya resmi olmayan hayvan ticareti sonrası ortaya çıktığı ve enfekte hayvanlarla ortak meraların kullanılması sonucu yayıldığı göz önüne alınırsa hastalığın kontrolü için yapılacak ilk iş sınır ve endemik bölgelerden hayvan hareketlerinin sınırlandırılması ve katı karantina kurallarının uygulanması olacaktır. Hastalığın etkili bir kontrolü için enfeksiyonun ortaya çıktığı mihrakların sınırında yer alan özellikle hareketli göçer sürülerde kesintisiz aşılama ile birlikte PPR'nin serolojik ve virolojik olarak izlenmesi önemlidir.

Ülkemizde yabani hayvanlarda PPR virus varlığı üzerine çalışmaların olmaması yaban hayatında virus varlığı konusunda şüphelere yol açmaktadır. Bu durumda aşı çalışmalarında yabani hayvanların da düşünülmesi ve yetiştiricilerin bu konuda bilgilendirilmeleri önemli hale gelmektedir.

Araştırmada her ne kadar virusun N genine karşı hazırlanmış primerler kullanılsa da farklı hedef genlerin seçilerek, bunların test sensitivite ve spesifitesine etkileri, farklı primer ve problar kullanılarak sekans analizine gidilmeksizin virusun soy grubunun varlığını ortaya koyabilecek real-time RT-PCR denemelerinin yapılması önerilebilir.

PPRV'nin hücre kültüründe izolasyon çalışmalarında Vero hücre kültürleri haricinde virusun üretilmesine uygun olduğu belirtilen hücre hatlarında da çalışmaların planlanması hem izolasyonda hücre hassasiyetlerinin karşılaştırılması olanağını hem de ileride yapılacak araştırmalarda kullanılmak üzere izolat elde etme ihtimalini arttırabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Abubakar M, Ali Q, Khan HA**,** 2008. Prevalence and mortality rate of peste des petits ruminant (ppr): possible association with abortion in goat. Trop Anim Health Prod, 40, 317-21.

Abubakar M, Ashiq S, Zahoor AB, Arshed MJ, Banyard AC, 2011a. Diagnosis and Control Strategies for Peste Des Petits Ruminants Virus: Global and Pakistan Perspectives. Pak Vet J, 2074-64.

Abubakar M, Khan HA, Arshed MJ, Hussain M, Ali Q, 2011b. Peste des petits ruminants (PPR): Disease appraisal with global and Pakistan perspective. Small Rumin Res, 96, 1-10.

Abraham G, 2005. Epidemiology of peste des petits ruminants virus in Ethiopia and molecular studies on virulence. PhD Thesis, Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

Albayrak H, 2007. Karadeniz Bölgesinde Koyunlarda Peste Des Petits Ruminants (PPR) İnfeksiyonunun Epidemiyolojisi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Albayrak H, Alkan F, 2009. PPR virus infection on sheep in blacksea region of Turkey: Epidemiology and diagnosis by RT-PCR and virus isolation. Vet Res Commun, 33, 241-49.

Alçığır G, VuraL SA, Toplu N, 1996. Türkiye'de Kuzularda Peste Des Petits Ruminants Virus Enfeksiyonunun Patomorfolojik ve İmmunhistolojik İlk Tanımı. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 43, 181-89.

Aleyas AG**,** 2002. Comparative evaluation of different gene targets for PCR diagnosis of PPR. MVSc thesis. Deemed University-Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar.

Ali YH, Intisar KS, Khalafalla AI, 2014. Outbreaks of Peste des petits ruminants in two different locaties in Sudan. J Vet Med Anim Health, 6(6), 174-77.

Anonim, 2016. T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Gıdaa ve Kontrol Genel Müdürlüğü Hayvan Hastalıkları ile Mücadele ve Hayvan Hareketleri Kontrolü 2016/02 Genelgesi. Erişim tarihi: 10.05.2016. Erişim adresi, http://tvhb.org.tr/duragan/d/dosya/genelgeler/HayHast_Muc_Kontrol_Genelge_2016-2.pdf

Appel MJG, Summers BA, 1995. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. Vet Microbiol, 44, 187-91.

Aytekin İ, 2008. Bir Kuzuda Saptanan Subkilinik Küçük Ruminant Vebası (Peste Des Petits Ruminants, Ppr) Vakası. Atatürk Üniv Vet Bil Derg, 3, 8-10.

Aytekin İ, Mamak N, Ulucan A, Kalınbacak A, 2011. Clinical, Haemotological, Biochemical and Pathological Findings in Lambs with Peste des Petits Ruminants. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 17(3), 349-55.

Balamurugan V, Sen A, Saravanan P, Singh RP, Singh RK, Rasool TJ, Bandyopadhyay, SK, 2006. One-step multiplex RT-PCR assay for the detection of peste des petits ruminants virus in clinical samples. Vet Res Commun, 30, 655–66.

Balamurugan V, Singh RP, Saravanan P, Sen A, Sarkar J, Sahay B, Rasool TJ, Singh RK, 2007. Development of an Indirect ELISA for the Detection of Antibodies against Petse-des-petit-ruminants Virus in Small Ruminants. Vet Res Commun, 31, 355-64.

Banik SC, Podder SC, Samad MA, Islam MT, 2008. Sero-surveillance and immunization in sheep and goats against peste des petits ruminants in Bangladesh. Bangladish Journal of Veterinary Medecine, 6 (2), 185–90.

Bao J, Li L, Wang Z, Barrett T, Suo L, Zhao W, Liu Y, Liu C, Li J, 2008. Development of one-step real-time RT-PCR assay for detection and quantitation of peste des petits ruminants virus. Journal of Virological Methods, 148, 232–36.

Batten CA, Banyard AC, King DP, Henstock MR, Edwards L, Sanders A, Buczkowski H, Oura CCL, Barrett T, 2011. A real time RT-PCR assay for the spesific detection of Peste des petits ruminants virus. J Virol Methods, 171, 401-04.

Burgu İ, Akça Y, 1998. Viroloji-II ders Notları. Ankara.

Chauhan HC, Chandel BS, Kher HN, Dadawala AI, Agrawal SM, 2009. Pesti Des Petits Ruminants Virus Infection in Animals. Vet World, 2(4), 150-55.

Choi KS, Nah JJ, Choi Cu, Ko YJ, Sohn HJ, Libeau G, Kang SY, Joo YS, 2003. Monoclonal antibody-based competitif ELISA for simultaneous detection of sığır vebası virus and peste des petits ruminants virus antibodies. Vet Microbiol, 96, 1-16.

Choi K, Nah J, Ko Y, Kang S, Jo N, 2005. Rapid competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay for detection of antibodies to Peste des Petits Ruminants virus. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 12(4), 524-47.

Couacy-Hymann E, Roger F, Hurard C, Guillou JP, Libeau G, Diallo A, 2002. Rapid and Sensitive Detection of Petse Des Petits Ruminants virus by a Polimerase Chain Reaksion Assay. J Virol Methods, 100, 17-25.

Couacy-Hymann E., Bodjo C., Danho T., Libeau G., Diallo A, 2005. Surveillance of wildlife as a tool for monitoring rinderpest and peste des petits ruminants in West Africa. Rev Sci Tech, 3, 869-77.

Couacy-Hymann E, Bodjo C, Danho T, Libeau G, Diallo A, 2007. Evaluation of the virulence of some strains of peste-des-petits-ruminants virus (PPRV) in experimentally infected West African dwarf goats. TheVet Journal, 173, 178–83.

Dhar P, Sreenivasa BP, Barrett T, Corteyn M, Singh RP, Bandyopadhyay SK, 2002. Recent epidemiology of peste des petits ruminants virus (PPRV). Vet Microbiol, 88(2), 153-59.

Diallo A, 1988. Rinderpest and peste des petits ruminants; constant threats to animal farming in many developing countries. Impact Sci Society, 150, 179-92.

Diallo A, Libeau G, Couacy-Hymann E, Barbron M, 1995. Recent developments in the diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants. Vet Microbiol, 44, 307–17.

Diallo A, Minet C, Le Goff C, Berhe G, Albina E, Libeau G, Barrett T, 2007. The threat of peste des petits ruminants: progress in vaccine development for disease control. Vaccine, 25, 5591–97.

El Arbi AS, El Mamy AB, Salami H, Isselmou E, kwiatek O, Libeau G, Kane Y, Lancelot R, 2014. Peste des Petits Ruminants Virus, Mauritania. Emerg Infect Dis, 20(2), 334-36.

Epikmen ET, 2009. Doğal küçük ruminant vebası (peste des petits ruminants)'nın tanısında patolojik ve immunohistokimyasal incelemeler. Doktora tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Et ve Süt Kurumu, 2013. Sektör değerlendirme raporu. http://www.ukon.org.tr/raporlar/pdf/etvesutkurumu2013yilisektoreldegerlendirmeraporu.pdf.

Ezeibe MCO, Wosu LO, Erumaka IG, 2004. Standardisation of the haemagglutination test for Peste Des Petits Ruminants (PPR), Small Rum Res, 51, 269-72.

Forsyth MA, Barrett T, 1995. Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. Virus Res. 39, 151–63.

Ghosh A, Joshi VD, Shaila MS, 1995. Characterization of an in vitro transcription system from rinderpest virus. Vet Microbiol. 44, 165–73.

Gürçay M, Kızıl O, Baydar E, 2012. Petse Des Petits Ruminants (PPR) Virus Infections in goats in the Easstern Anatolia of Turkey. Kafkas Univ Vet Fak Dergisi, 8006.

Gül Y, Kızıl Ö, İssi M, 2006. Bir Kuzuda Saptanan Subklinik Küçük Ruminant Vebası (Peste Des Petits Ruminants, Ppr) Olgusu. F Ü Sağlık Bil Dergisi, 20(3), 245-47.

Güler L, Şevik M, Hasöksüz M, 2014. Phylogenetic analysis of peste des petits ruminants virus from outbreaks in Turkey during 2008-2012.Turk J Biol, 38, 671-78.

Gülyaz V, Özdemir S, 2010. Kombine Hazırlanan Koyun Çiçek ve Koyun-Keçi Vebası Aşısının Bağışıklık ve Zararsızlığının Saptanması. Pendik Vet Mikrobiyol Derg, 37(1), 1-7.

Gülyaz V, Özkul A, 2005. Pathogenicity of a Local Peste des Petits Ruminants Virus Isolate in Sheep in Turkey. Trop Anim Hlth Prod, 37, 541-47.

Gümüşova S, Memiş YS, 2014. Bazı keçi Irklarında küçük ruminant Vebası Aşısı Sonrası Antikor Dağılımı. Kocatepe Vet J, 7(1), 53-55.

Hosamani M, Singh SK, Mondal B, Sen A, Bhanuprakash V, Bandyopadhyay SK, Yadav MP, Singh R K, 2006. A Bivalent Vaccine against Goat Pox and Peste Des Petits Ruminants Induces Protective Immune Response in Goats. Science Direct. 24, 6058-64.

Housawi FMT, Abu Elzein EME, Mohamed GE, Gamel AA, Al-Afaleg AI, Hegazi A, Al-Bishr B, 2004. Emergence of Petse Des Petits Ruminants in Sheep and Goats in Eastern Saudi Arabia. Revue Elev Med Vet Pays Trop, 57(1-2), 31-34.

Kabaklı Ö, Hancı İ, Yöndem S, 2006. Liyofilize Attenue Koyun - Keçi Vebası Aşısı Raf Ömrünün Belirlenmesi. Etlik Vet Mikrob Derg, 17, 23-28.

Kerur N, Jhala MK and Joshi CG, 2008. Genetic characterization of Indian peste des petits ruminants virus (PPRV) by sequencing and phylogenetic analysis of fusion protein and nucleoprotein gene segments. Res Vet Sci, 85(1), 176-83.

Khan AH, Sıddıque M, Arshad MJ, Khan QM, Rehman SU, 2007. Sero-prevalance of Petse Des Petits Ruminants (PPR) Vırus in Sheep And Goats In Punjab Province of Pakistan. Pak Vet J, 27(3), 109-12.

Kul O, Kabakci N, Atmaca HT, Özkul A, 2007. Natural peste des petits ruminants virus infection: novel pathologic findings resembling other morbillivirus infections. Vet Pathol, 44, 479–86.

Kwiatek O, Keita D, Gıl P, Fernandez-Piero J, ClaVero MAJC, Albina E, Libeau G, 2010. Quantitative one-step real-time RT-PCR for the fast detection of the four genotypes of PPRV. J Virol Methods, 165, 168-77.

Kwiatek O, Ali YH, Saeed IS, Khalafalla AI, Mohamed OI, Obeida AA, Abdelrahman MB, Osman HM, Taha KM, Abbas Z, Harrak ME, Diallo YLA, Lancelot R, Albina E, Libeau G, 2011. Asian Lineage of Peste des Petits Ruminants Virus, Africa. Emerging Infectious Diseases, 17(7), 1223- 31.

Lembo T, Oura C, Parida S, Hoare R, Frost L, Fyumagwa R, Kivaria F, Chubwa C, Kock R,Cleaveland S, Batten C, 2013. Peste des Ruminants Infection among Cattle and Wildlife in Northern Tanzania. Emerg Infect Dis, 19(12), 2037-40.

Libeau G, Prehaud C, Lancelot R, Colas F,Guerre L, Bishop DHL, Diallo A, 1995. Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein. Res Vet Sci, 58, 50-55.

Luka PD, Ayebazibwe C, Shamaki D, Mwiine FN, Erume J, 2012. Sample type is vital for diagnosing infection with peste des petits ruminants virus by reverse transcription PCR. J Vet Sci, 13(3), 323-5.

Mahajan, S., Agrawal, R., Kumar, M., Mohan, A. and Pande, N, 2013. Incidence of Peste des petits ruminants in nomadic sheep and goat of Jammu region. Vet World, 6(7), 384-387, doi:10.5455/vetworld.2013. 384-87.

Manoharan S, Jayamumar R, Govindarajan R, Koteeswaran A, 2005. Haemaglutination as a Confirmatory test For Peste Des Petıts Rumınants Diagnosis. Small Rumin Res, 59, 75-78.

Mehmood A, Qurban A, Javaid AG, Salman AM, Syed IS, 2009. Detection of Peste Des Petits Ruminants (PPR) Virus Antibodies in Sheep and Goat Populations of The North West Frontier Province (NWFP) of Pakistan by Competitive ELISA (cELISA). Vet World, 2, 9, 333-36.

Milli ÜH, Haziroğlu R, 1997. Veteriner Patoloji I. Cilt, Küçük Ruminant Vebası (Peste Des Petits Ruminants). 9.

Munir M, Zohari S, Suluku R, LeBlanc N, Kanu S, Sankoh FAR, Berg M, Barrie ML, Stahl K, 2012. Genetic Characterization of Peste des Petits Ruminants virus, Sierra Leone. Emerg Infect Dis, 18(1), 193-95.

Nanda YP, Chatterjee A, Purohit AK, Diallo A, Innui K, Sharma RN, Libeau G, Thevasagayam JA, Bruning A, Kitching RP, Anderson J, Barrett T, Taylor WP, 1996. The isolation of peste des petits ruminants virus from northern India. Vet Microbiol, 51, 3-4, 207-16.

Nettleton PF, Entrican G, 1995. Ruminant pestiviruses. Br Vet J, 151(6), 615–41.

OIE, 2012. Peste Des Petits Ruminants. Chapter 2.7.11.

OIE, 2017a. Erişim tarihi 09 Mayıs 2017. Erişim Adresi, http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/semestrial/review?year=2016&semester=2&wild=0&country=TUR&this_country_code=TUR&detailed=1.

OIE, 2017b. Weekly Diseases Information, Erişim tarihi 09 Mayıs 2017. Erişim Adresi, http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/WI.

Özkul A, Yılmaz A, Alkan F, Barrett T, Karaoğlu T, Dağalp SB, Anderson J, Yeşilbağ K, Çokçalışkan C, Gencay A, Burgu İ, 2002. Prevalence, Distribution, and Host Range of Petse Des Petits Ruminants Virus, Turkey. Emerg Infect Dis, 8(7), 708-12.

Öztürk A, 2000. Pratik Koyunculuk, T.C.Tarım ve Köyisleri Bakanlıgı Lalahan Hayvancılık Merkez Arastırma Enstitüsü Yetistirici Brosürleri, 9, 1–18.

Rahman A, Ashfaque M, Rahman SU, Akhtar M, Ullah S, 2004. Peste Des Petıts Rumınants Antıgen In Mesenterıc Lymph Nodes Of Goats Slaughtered At D. I. Khan. Pak Vet J, 24(3), 159-60.

Raj GD, Nachimuthu K, Nainar AM, 2000. A simplifed objective method for quantification of peste des petits ruminants virus or neutralizing antibody. J. Virol Methods, 89, 89-95.

Sağlam YS, Temur A, 2009. Immunohistochemical Detection of Peste des Petits ruminants (PPR) Viral Antigen from the Cases of Naturally Occurring Pneumonia in Sheep. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 15(3), 423-28.

Sait A, 2013. Peste des Petits Ruminants Virus (PPRV) enfeksiyonunun epidemiyolojisinin N ve F genlerine dayalı farklı PCR teknikleri ile araştırılması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Scott GR, 1990. Peste des petits ruminants (Goat plaque) virus. In: Virus Infections of Ruminants. Eds: Z. Dinter, B. Morein, Elsevier Science Publisher, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, chapter 33, 355-61.

Şevik M, Sait A, 2015. Genetic characterization of peste des petits ruminants virus, Turkey, 2009-2013. ResVet Sci, 101, 187-95.

Singh RP, Sreenivasa BP, Dhar P, Bandyopadhyay SK, 2004a. A sandwich-ELISA for the diagnosis of Peste des petits ruminants (PPR) infection in small ruminants using anti-nucleocapsid protein monoclonal antibody. Arch Virol, 149, 2155–70.

Singh RP, Sreenivasa BP, Dhar P, Shah LC, Bandyopadhyay SK, 2004b. Development of a monoclonal antibody based copetitive-ELISA for detection and titration of antibodies to peste des petits ruminants (PPR) virus. Vet Microbiol, 98, 3-15.

Sumption K J, Aradom G, Libeau G, Wilsmore AJ, 1998. Detection of peste des petits ruminants virus antigen in conjunctival smears of goats by indirect immunofluorescence. Vet Rec, 142 (16), 421-24.

Tarakçı EA, 2014. Koyunlarda ve sığırlarda küçük ruminant vebası virusunun virolojik, serolojik ve moleküler yönden araştırılması ve soyağacı oluşturulması. Doktora. Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Tatar N, Alkan F, 1999. Koyun ve keçilerde küçük ruminantların vebası (peste des petits ruminants) ve sığır vebası enfeksiyonlarının serolojik ve virolojik olarak araştırılması. Etlik Vet Mikrob Derg, 10(2), 35-60.

Tatar N, Kabaklı Ö, 2006. Türkiye'de Üretilen PPR Aşısının Bağışıklık Süresinin Tespiti. Etlik Vet Mikrob Derg, 17, 13-22.

Taylor WP, 1984. The distribution and epidemiology of peste des petits ruminants. Prev Vet Med, *2*, 157-66.

Toplu, N., Oğuzoğlu, T.Ç., Albayrak, H., 2012. Dual infection of foetal and neonatal small ruminants with border disease virus and peste des petits ruminants virus (PPRV): neuronal tropism of PPRV as a novel finding. J Comp Pathol, 116, 289–96.

Truong T, Boshra H, Embury-Hyatt C, Nfon C, Gerdts V, Tikoo S, Babiuk LA, Kara P, Chetty T, Mather A, Wallace DB, 2014. Peste des Petits Ruminants Virus Tissue Tropism and Pathogenesis in Shep and Goats following Experimental Infection. PLOS ONE, 9(1), 1-13. Erişim tarihi, 13.05.2016 Erişim adresi, http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0087145.

Tüik, 2016. Erişim tarihi, 24.03.2016. Erişim adresi, http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=21822.

Ularamu HG, Owolodun OA, Woma TY, Audu BJ, Aaron GB, Chollom SC, Shamaki D**,** 2012. Molecular Diagnosis of Recent Suspected outbreaks of Petse Des Petits Ruminants (PPR) in Yola, Adamawa State, Nigeria. Afr J Biotechnol, 11(5), 1158-62.

Wang Z, Bao J, Wu X, Liu Y, LiC Suo L, Xie Z, Zhao W, Yang N, Li J, Wang S, Wang J, 2009. Peste des Petits Ruminants Virus in Tibet. China. Emerg Infect Dis, 15(2), 299-01.

Wang J, Wang M, wang S, Liu Z,Shen N, Si W, Sun G, Drewe JA, Cai X, 2015. Peste des Petits Ruminant Virus in Heilongjiang Province, China, 2014. Emerg Infect Dis, 21(4), 677-80.

7.EKLER

EK A: Etik Kurul Belgeleri

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ
ETİK KURUL (SÜVFEK) KARARLARI

Toplantı Tarihi	17.06.2013	Toplantı Sayısı	2013/07	Karar Sayısı	2013/032

S.Ü. Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK tarafından sunulan **"Koyu Keçi Vebası (PRR)'nın Virus İzolasyonu, C-ELISA ve Real Time RT-PCR Teşhis Metotları ile Karşılaştırılmalı Teşhisi"** başlıklı Tez Projesi başvurusu değerlendirilmiştir.

Projede en az 50 koyun veya keçiden alınacak kan, svap ya da organ materyali kullanılacak olup, serolojik çalışma için en az 200 kan serumu örneği alınacağı bildirilmektedir.

Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından **"Uygun olduğuna"** oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Nurcan DÖNMEZ Başkan	Doç. Dr. Ercan KURAR Başkan Yardımcısı
Prof. Dr. Mutlu SEVİNÇ Üye	Ayşegül KURTBEYOĞLU Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi

Doç. Dr. Serdar İZMİRLİ Raportör Üye	Doç. Dr. Uğur USLU Üye	Salih Zeki ALPTEKİN Sivil Üye (Katılmadı)

8. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Osmaniye'de doğdu. 1991 yılında Gazi İlkokulu'nu bitirdi. 1994 yılında Kurtuluş Ortaokulu'nu bitirdi. 1997 yılında İskenderun Lisesi'nden mezun oldu. 2004 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden mezun oldu. 2006 ile 2009 yılları arasında Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Konya Veteriner Kontrol Enstitü Müdürlüğü'nde görev yaptı. 2009 yılından bu yana Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Adana Veteriner Kontrol Enstitü Müdürlüğü'nde görev yapmaktadır.